

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

VAN YÖRESİNDE HEPATİT B VİRÜS GENOTİP DAĞILIMI VE
PREKOR/BAZAL KOR PROMOTER MUTASYON ANALİZİ

Dr. Öznur ÖZTÜRK
Uzmanlık Tezi

TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. Görkem YAMAN

VAN-2010

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

VAN YÖRESİNDE HEPATİT B VİRÜS GENOTİP DAĞILIMI VE
PREKOR/BAZAL KOR PROMOTER MUTASYON ANALİZİ

Dr. Öznur ÖZTÜRK
Uzmanlık Tezi

TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. Görkem YAMAN

VAN-2010

Bu çalışma Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Başkanlığı tarafından 2008-TFU-045 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR:	i
ÖZET:	ii
SUMMARY:	iii
1. GİRİŞ VE AMAÇ:	1
2. GENEL BİLGİLER:	3
2.1. Tarihçe:	3
2.2. Sınıflandırma:	4
2.3. Genel Özellikler:	5
2.4. Genom Yapısı:	8
2.5. Replikasyon:	10
2.6. Virüs Proteinleri:	14
2.7. HBV Serotip ve Genotipleri:	17
2.8. HBV Mutasyonları:	23
2.9. Epidemiyoloji, Bulaş Yolları ve Korunma:	28
2.10. Patogenez:	34
2.11. Klinik:	36
2.12. Tanı:	41
2.13. Tedavi:	49
3. GEREÇ VE YÖNTEM:	52
3.1. Gereç:	52
3.2. Çalışma Yöntemi:	53
4. BULGULAR:	62
5. TARTIŞMA VE SONUÇ:	70
6. KAYNAKLAR:	79
7. ÖZGEÇMİŞ:	88

TEŞEKKÜR

Tıbbi Mikrobiyoloji uzmanlık eğitimim ve tez çalışmam süresince her yönden destek olan, bilgi ve yardımlarıyla katkıda bulunan, öncelikle Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Mustafa BERKTAŞ olmak üzere, tez danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Görkem YAMAN ve Anabilim Dalı öğretim üyemiz Sayın Yrd. Doç. Dr. Hüseyin GÜDÜCÜOĞLU'na, projeye destek ve katkılarından dolayı YYÜ Bilimsel Araştırma Proje Başkanlığı'na, tez istatistiğinde yardımcı olan Halk Sağlığı Anabilim Dalı Öğretim üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Aktan KARAHAN'a, tezimde emeği olan çalışma arkadaşlarım ve Mikrobiyoloji laboratuvarının tüm çalışanlarına, her zaman yanımda olan eşim Dr. Tahir ÖZTÜRK'e sonsuz teşekkür ederim.

ÖZET

Akut hepatit ve asemptomatik taşıyıcılık, kronik taşıyıcılık, karaciğer sirozu ve hepatosellüler karsinom gibi kronik karaciğer hastalığının değişik formlarına sebep olan hepatit B virüsü (HBV), tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de çok önemli bir toplum sağlığı problemi oluşturmaktadır. HBV genotipleri ve mutasyonları da hastalık seyrini ve tedavisini etkilemektedir.

Bu çalışmada, Van yöresinde HBV genotiplerini ve prekor/bazal kor promoter mutasyonlarını tespit etmek amaçlanmıştır. Bu amaçla, Mart 2008-Ocak 2009 tarihleri arasında toplanan, hepatit B serolojik belirleyicileri (AXSYM, Abbott) ve HBV DNA'sı (Cobas Taqman, Roche) pozitif 54 hasta serumu çalışmaya dahil edilmiştir. Bu serumlarda DNA izolasyonu (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen) sonrası revers hibridizasyon metodu (INNO-LiPA, Innogenetics) kullanılarak genotiplendirme ve mutasyon analizi yapılmıştır.

Çalışma sonucunda, 54 hastanın tümünde (% 100) genotip D tespit edildi. 54 hastanın 5'i, mutasyon analizi için amplifikasyon sonrasında agaroz jel elektroforezde DNA bandı oluşmadığı için mutasyon analizi çalışmasından çıkarıldı ve çalışma 49 hasta ile yapıldı. Bu hastalarda G1896A prekor mutasyonu ve BKP mutasyonu sırayla % 40.9 ve % 34.7 olarak bulundu. Bu hastaların HBeAg durumları ile tespit edilen mutasyonlar değerlendirildiği zaman, HBeAg negatif hastalarda prekor mutasyonu % 75.0, bazal kor promoter mutasyonu % 57.9 olarak tespit edildi. 49 hastanın % 22.4'ü, HBeAg negatif hastaların ise % 50'si prekor ve BKP mutasyonlarının her ikisine de sahipti.

Çalışmada çıkan sonuçlar irdelendiğinde, Akdeniz ve komşu Asya ülkelerinde olduğu gibi Türkiye'de Van yöresinde de HBV D genotipi dominanttır. Prekor ve BKP mutasyon analizi sonuçlarına bakıldığında ise, hepatit B hastalarının yaklaşık yarısı prekor mutasyonuna, üçte biri ise BKP mutasyonuna sahipti. Bu mutasyonlar HBeAg salınımını durdurmakta veya önemli ölçüde azaltmaktadır. Ülkemizde HBV'ye ait genotip ve mutasyonlara ait bu epidemiyolojik verilerin, HBV enfeksiyonuna sahip hastaların tanısında, izlenmesinde ve tedavi stratejisinde klinisyenlere yardımcı olacağı kanısına varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Hepatit B virüs, genotip, mutasyon, HBeAg, Van.

SUMMARY

Hepatitis B virus (HBV) that causes acute hepatitis and various forms of chronic liver diseases like asymptomatic and chronic carrier state, liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma, constitutes a major public health problem in the world and also in our country. HBV genotypes and mutations affect the course and treatment of the disease.

In this study, we aimed to detect HBV genotypes and precore/basal core promoter (BCP) mutations in Van region. For this purpose, serums of 54 patients which were positive for hepatitis B serological markers and HBV DNA (Cobas Taqman 48, Roche), were collected between March 2008 and January 2009. Genotypes and mutations were determined with reverse hybridization method (INNO-LiPA, Innogenetics) after HBV DNA isolation by Qiagen kit (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen).

As a result of this study, all 54 patients (100 %) had genotype D. After amplification for mutation analysis, DNA bands of 5 samples were not visible in agarose gel electrophoresis; therefore they were excluded. A total of 49 samples were studied. The rates of G1896A precore mutation and BCP mutation were 40.9 % and 34.7 %, respectively. When HBeAg status of these patients and the mutations were evaluated, precore mutation was 75.0 % and BCP mutation was 57.9 % in HBeAg negative patients. 22.4 % of 49 patients and 50.0 % of HBeAg negative patients had both precore and BCP mutations.

When the results of this study were scrutinized, HBV genotype D was dominant in Van region of Turkey as in the Mediterranean and neighbouring Asia countries. In terms of the precore and BCP mutation results, approximately one-half of our patients have precore mutation and one third of patients have mutations of BCP. These mutations decrease or inhibit the secretion of hepatitis B e-antigen. This epidemiological data about HBV genotypes and mutations in our country will help to clinicians in diagnosing, monitoring and treatment of patients with HBV infection.

Key Words: Hepatitis B virus, genotype, mutation, HBeAg, Van

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hepatit B virüsü başlıca parenteral yoldan bulaşan, *Hepadnaviridae* ailesine ait bir DNA virüsüdür. Hepatit B virüsü'nün (HBV) neden olduğu enfeksiyon, özellikle gelişmekte olan ülkelerde önemli bir sağlık ve ekonomik sorundur. HBV, sistem aracılı doku hasarı ve hepatosit ölümüne neden olabilir. Ailenin diğer üyeleri içinde, insanlarda enfeksiyon oluşturan ve ayrıca “revers transkriptaz” enzimi sayesinde, RNA aracılı replike olan tek DNA virüsüdür (1).

Tüm dünyada, çoğu gelişmekte olan ülkelerde yaşayanlar olmak üzere yaklaşık 400 milyon kişide kronik hepatit B (KHB) enfeksiyonu olduğu düşünülmektedir. Dünya nüfusunun yaklaşık üçte birinin (iki milyar insanın) bu virusla karşılaştığının serolojik delilleri bulunmaktadır. Her yıl bir milyondan fazla insan HBV'ye bağlı kronik karaciğer hastalıklarından (siroz ve hepatosellüler karsinom) ölmektedir. Ülkemizde de yaklaşık 3-4 milyon insanın bu virüsü taşıdığı bilinmektedir (2). Ülkemizde HBsAg pozitifliği bölgeden bölgeye değişmektedir. Batıda % 1 iken doğu illerinde % 14'e kadar yükselmektedir (3). Bu durumun sebebi, Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgelerindeki kalabalık ailelerde horizontal geçiş, doğurganlığın yüksek olması ile vertikal geçiş ve hijyen sorunudur (4).

HBV enfeksiyonu çeşitli biçimlerde klinik göstermektedir. Olguların % 90'ında klinik hiçbir belirti ortaya çıkmamakta ve kişinin virüs ile karşılaştığı ancak bir tarama sırasında serumunda antikorların gösterilmesi ile anlaşılmaktadır. HBV ile temas eden kişilerin % 10'unda 2-6 aylık inkübasyon süresini takiben çeşitli klinik ve biyokimyasal belirtilerle seyreden akut viral hepatit tablosu oluşur. Semptomatik olguların % 0.1'inde fulminan hepatit gelişir. Virüs ile enfekte yetişkinlerin % 10'unda hastalık kronikleşir. Bu oran yenidoğanlarda ise % 80-90'dır. Kronikleşmeye gidişin nedeni tam olarak aydınlatılamamıştır ama yetersiz immun cevabın rol aldığı kabul edilmektedir. Kronik enfekte olguların % 15 ile 20'sinde siroz gelişmekte ve bu olguların da ancak % 55-85'i beş yıldan uzun bir süre yaşamaktadır (5).

HBV, nükleotid dizilimlerinde % 8 ve üzerindeki değişikliklere göre 8 farklı genotipe ayrılmaktadır. Genotipler coğrafik olarak farklı dağılım göstermektedir. HBV enfeksiyonunun kliniği ve tedaviye cevabı genotiplere göre değişebilmektedir. Yapılan çalışmalarda ülkemizde dominant olarak genotip D enfeksiyonu olduğu görülmüştür. A genotipi kronik karaciğer hastalığına daha sık yol açmasına karşın, D genotipine göre

interferona daha iyi cevap vermektedir (6). İlk bulgulara göre genotip B ve C'de daha agresif seyirli bir klinik (Kronik hepatit B ve hepatosellüler karsinoma riskinin fazla olduğu) bildirilmektedir (7). HBV genotiplendirilmesi, hastalığın yönetiminde önemli olabilir (8).

HBV genomunda klinik seyir sırasında birçok mutasyon ortaya çıkabilir. HBV ile enfekte hastalarda sık karşımıza çıkan mutasyonlar, hastaların klinik gidiş ve tedavisinde dikkate alınması gereken durumları ortaya çıkarmaktadır. Pre-kor/kor geni mutasyonuna bağlı olarak HBeAg sentezinin bloke edildiği kronik hepatit B (KHB) hastalarının aktif karaciğer hastalığına sahip olduğu ve tedaviye direnç gösterdiği bildirilmiştir. HBeAg negatif KHB hastaları tüm dünyada giderek artarken ülkemizde sıklık % 70'ler düzeyindedir (9). Ayrıca HBV genomu bazal kor promoter bölgesinde, X geni bölgesinde, pre-S ve polimeraz geninde de mutasyonlar oluşabilmektedir.

HBV genotipler ve prekor, kor promoter mutasyonlarının dağılımı coğrafik olarak bölgeden bölgeye değişmektedir. Ülkemizde, bu konuda çok çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Fakat HBV insidansının ülke ortalamasının üzerinde olduğu Van yöresinde bu konuda henüz bir araştırma yapılmamıştır. Van, sınır bölgesinde olması ve çevreden yoğun göç alması nedeniyle ayrı bir öneme sahiptir.

Bu çalışmada, Mart 2008-Ocak 2009 tarihleri arasında laboratuvarımıza gelen kan örneklerinde Hepatit B virüs enfeksiyonu tanısı almış 54 hasta, genotip dağılımı ve prekor, bazal kor promoter (BKP) mutasyonu yönünden araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Viral hepatit tarihi bir hastalık olup, ilk olarak MÖ 460-370 yıllarında Hipokrat tarafından tanımlanmıştır. Yıllar boyunca kullanılacak olan “kataral ikter” teriminden ilk Virchow 1865 yılında söz etmiştir. İlk bilinen sarılık epidemisi Napoleon’un Mısır seferi sırasında (10, 11). Daha sonra, Almanya Bremen’de 1883 yılında insan lenf sıvısı kullanılarak hazırlanan su çiçeği virüs aşısı yapılan gemi çalışanlarında kan kaynaklı hepatit salgını görülmüştür (3, 8). Denizcilerin % 15’i birkaç hafta ile 8 ay içerisinde sarılık hastalığı geçirmişlerdir (3).

20. YY’ın ilk yarısında kızamık ve kabakulak immün profilaksisi amacıyla plazma verilen kişiler ile insan serumu içeren sarı humma aşısı yapılan askeri personelde ve kontamine iğnelerin kullanıldığı cinsel yolla bulaşan hastalık kliniklerinde tedavi gören hastalarda sarılık salgınları görülmeye başlanmıştır; II. Dünya Savaşı sırasında kan transfüzyonu yapılan askerlerde ciddi sorunlara neden olmuştur (12).

Virüslerin keşfinden önce, epidemiyolojik gözlemlere dayalı olarak 2 türlü hepatit bulaşı olduğu ayırdedilmiştir. Tip A’nın, çoğunlukla fekal-oral yolla bulaştığı, Tip B’nin ise parenteral olarak bulaştığı düşünülmüştür (13). 1947 yılında Maccallum ve Bauer enfeksiyöz hepatit için hepatit A ve serum hepatiti için hepatit B terimini kullanmışlardır. Bu iki hastalığın epidemiyolojisinin farklı olduğu saptanmıştır. 1973 yılında Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), hepatitin iki farklı etkenini birbirinden ayırmak için hepatit A ve hepatit B terimlerini önermiştir (8).

HBV kan yoluyla bulaşan sarılık etkeni olarak ilk defa Blumberg ve Alter’in 1965 yılında “Avustralya antijeni”ni bulmasıyla tanımlanmıştır. Avustralya kökenli lösemili bir hastanın serumunda immünopresipitasyon ile HBV yüzey antijenini gösterdikleri ve “Avustralya antijeni” şeklinde isimlendirdikleri bu maddenin B tipi hepatit ile ilişkisi ortaya konulmuştur ve bu buluşu nedeniyle araştırmacılar Nobel ödülü kazanmıştır (3, 5).

1970 yılında Dane ve arkadaşları, immün elektron mikroskopisi tekniğini kullanarak inceledikleri hasta serumlarında yüzeylerinde aynı antijeni taşıyan virüs-like partikülleri saptamışlar; ve bu partiküllerin Hepatit B virüsü olduğunu ileri sürmüşlerdir

(5). 1971 yılında Krugman ısı ile inaktive edilen Hepatit B yüzey antijeni pozitif serumların immünojenik olduğunu ve aşı olarak kullanılabileceğini gösterdi. 1979'da ise virüsün DNA'sı klonlanarak tam nükleotid dizisi çıkarıldı. Virüs DNA'sının PCR yöntemi ile çoğaltılması ile HBV'nin moleküler biyolojisi, epidemiyolojisi, patogenezi, tanı ve tedavisi ile korunma yönünden çok önemli gelişmeler yaşanmıştır (3).

Etkenin doku kültürlerinde üretilmesinin mümkün olmaması ve hayvan deneylerinin sadece belirli maymun türleri ile kısıtlı olması, HBV konusundaki çalışmaların 1980'li yıllara kadar kısıtlı kalmasına yol açmıştır. Ancak bu tarihten sonra çeşitli hayvanlarda HBV'ye benzer virüslerin neden olduğu enfeksiyonların gösterilmesi ve nihayet moleküler biyoloji konusundaki ilerlemeler, bu virüs ile ilgili hızlı bilgi birikimini sağlamıştır (5).

Okamoto ve arkadaşları tarafından 1988 yılında HBV'nin tüm genomunun dizisi belirlenip, genomlar arasında en az % 8 veya daha fazla farklılık gösterenler ayrı ayrı gruplandırılarak A'dan D'ye 4 genotip tanımlanmıştır. 1992 yılında Norder ve arkadaşları E ve F olmak üzere 2 yeni genotip daha tanımlamışlardır (14). Genotip G 2000 yılında, genotip H ise 2002 yılında tanımlanmıştır (3).

2.2. Sınıflandırma

Hepadnavirus terimi, *hepa* hepatotropik kelimesinden, *dna* DNA genomundan gelmektedir (15). HBV, düzenli olarak büyüyen *Hepadnaviridae* ailesinin prototip bir üyesidir (16).

Hepadnaviruslar memelilerde ve kuşlarda olmak üzere iki farklı cinse ayrılırlar. Orthohepadnaviruslar memelilerde, avihepadnaviruslar ise kuşlarda görülür (16). Orthohepadnavirus üyeleri; insanları, dağ sıçanlarını (*Marmota monax*), yer sincaplarını (*Spermophilus lateralis*), Arktik sincapları (*Spermophilus parryii*), yünlü maymunları, orangutanları, şempanzeleri ve gibbon türü maymunları enfekte etmektedir. Avihepadnavirus üyeleri ise ördek, gri balıkçıl (*Ardea cinerea*), küçük kar kazı (*Anser rossii*), kar kazı (*Anser caerulescens*) ve beyaz leyleklerde bulunmaktadır. Memeli ve kuş hepadnavirusları genomik yapıları birbirine benzemektedir (17).

HBV, Orthohepadnavirus üyesi olup sadece insanları ve şempanzeleri enfekte etmekte, diğer hayvan virüsleri ise insanı enfekte edememektedir. Aynı ailede yer alan ördek hepatit B virüsü (DHBV) ve ağaçkakan hepatit B virüsü (WHBV) % 70'e varan dizi benzerlikleri nedeniyle, HBV'nin replikasyonu ve persistansını incelemek için uygun modeller olarak kullanılmaktadır (3).

Primatları enfekte eden hepadnaviruslar HBV'ye çok benzerler ve HBV genotipi olarak kabul edilebilirler. Özellikle yünlü maymun hepatit B virüsü, genotip F'ye çok büyük benzerlik göstermektedir (18). HBVcpz ve HBVoru şempanze ve orangutanlarda görülen HBV'leridir ve genotip gibi sınıflandırılmışlardır (16).

Memeli hepadnavirusları birbiri ile ilişkilidir ve geniş nükleotid dizilerini paylaşırlar. HBV ve WHBV % 60 nükleotid benzerliğine sahiptir. Tüm bilinen Hepadnaviridae ailesi üyeleri 3000-3300 bp arası DNA genomuna sahiptir (20). Bilinen tüm hepadnaviruslar hepatotropiktir, karaciğer hücrelerini enfekte ederler ve kendi konaklarında hepatit oluştururlar (15). Memeli hepadnavirusları L, M ve S olarak 3 yüzey proteinini kodlarken, kanatlı hepadnaviruslar L ve M olarak 2 adet yüzey proteinini kodlamaktadır. Orthohepadnavirus DNA'sı ek olarak HBx proteinini de kodlamaktadır (20). HBV'nin onkojenik olduğu tam olarak aydınlatılamamasına rağmen WHBV'nin dağ sıçanlarında karaciğer kanseri yaptığı bilinmektedir (21). Kanatlı hepatit virüslerinde viral DNA tam iken memelilerin viral DNA'sı tamamlanmamıştır (22).

2.3. Genel Özellikler

HBV, 42 nm çapında yuvarlak ve zarflı bir virüstür. 3200 bp uzunluğunda, kısmen çift sarmallı olan halkasal DNA genomu içerir. Virüs kapsidi 27 nm çapında ve ikozahedral simetridedir (3). HBV, revers transkriptaz aktivitesi özelliğini taşıyan DNA polimeraza sahiptir (8). DNA virüsü olmasına rağmen, revers transkriptaz enzimi içeren RNA virüsleri gibi, RNA aracılığı ile replike olduğu bilinen tek DNA virüsüdür. Hepadnaviridae ailesinin üyeleri içinde insanlarda enfeksiyon oluşturan tek türdür (23).

HBV'nin yapısını araştırmak amacıyla, akut ve kronik hepatit B hastalarının serumları ultrasantrifüjasyon işlemini takiben elektron mikroskopunda incelendiğinde üç farklı partikülün varlığı saptanmıştır.

- HBV yüzey antijeni (HBsAg) içeren tüm serumlarda, ortalama 22 nm çapında (16-25 nm) küresel partiküller görülür. Bu partiküller non-enfeksiyözdür ve serumda en çok bulunan partiküllerdir.

- Özellikle replikasyonun olduğu olgularda küresel partiküller dışında tubuler yapıda, yine 22 nm çapında yapılar bulunur. 22 nm çaplı partiküller tamamen HBsAg'den oluşmaktadır.

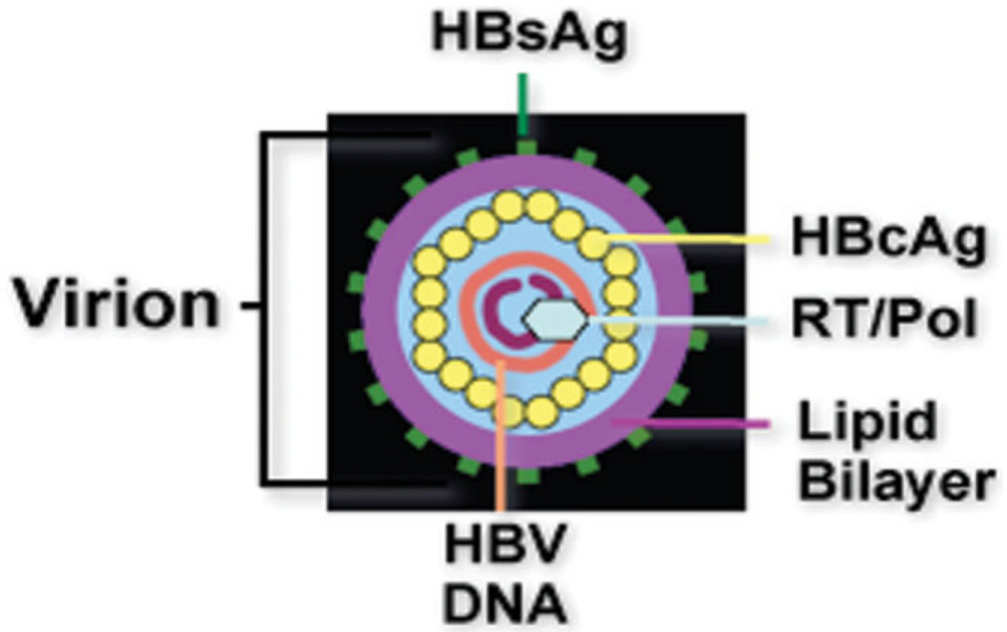
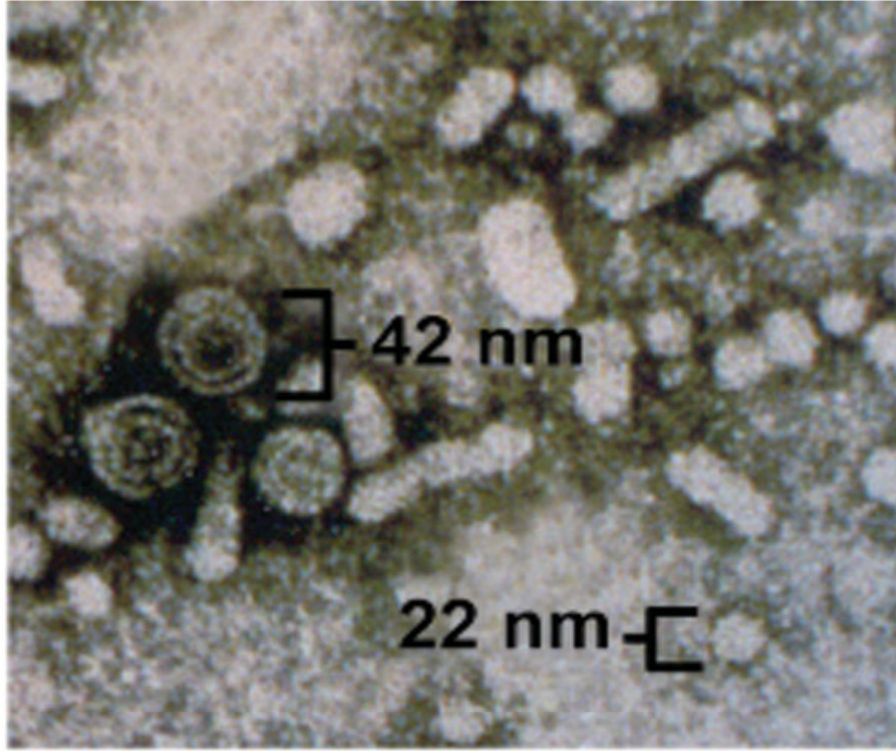
- İncelenen bazı serum örneklerinde bu yapılara ek olarak iç içe geçmiş iki bölgeden meydana gelen 42 nm çapında büyük partiküllere rastlanır. Günümüzde hepatit B virionu olarak tanımlanan kompleks yapıdaki 42 nm'lik bu partiküller, ilk kez 1970 yılında Dane tarafından gösterilen yapılardır. Araştırmacının adı ile isimlendirilen Dane partikülleri 25-27 nm'lik bir kor (çekirdek) ve onu çevreleyen 7 nm'lik lipid yapıda bir dış zarfdan oluşmaktadır (Şekil 1) (24). Dane partiküllerinin sayısı her zaman diğerlerine oranla daha azdır.

Enfekte hastaların serumları ml de 10^{10} düzeyinde enfeksiyöz virion içermektedir. B hepatitinin bulaşmasının Dane partikülleri ile olduğu saptanmıştır (5, 8).

HBV'nin stabilitesi her zaman HBsAg'nin stabilitesi ile paralel değildir. Eter, asit (pH 2.4)'de en az 6 saat ve ısı (98 °C de 1 dakika, 60 °C de 10 saat) ile immünojenite ve antijenik özellik kaybolmadığı halde enfektivite kaybolmaktadır. Eğer virüs yoğunluğu çok fazla ise bu işlemler sonucu inaktivasyon tam olamamaktadır. HBsAg % 2.5 sodyum hipoklorit varlığında 3 dakikada antijenik özelliğini ve enfektivitesini yitirir. Serumda enfektivite doğrudan kaynatmakla 2 dakikada, 121 °C'de 0.5 atm. basınç altında 20 dakikada, 160 °C'de kuru sıcak havada 1 saatte kaybolur. Son çalışmalar HBV'nun sodyum hipoklorit ile 10 dakikada, % 0.1-2 aköz glutaraldehid, % 70 izopropil alkol, % 80 etil alkolde 2 dakikada inaktive olduğunu göstermiştir. HBV, 30-32 °C'de saklandığında en az 6 ay, -20 °C'de 15 yıl enfektivitesini yitirmemektedir (25).

HBV, onkogenik bir virüs gibi görünmektedir. Hepatosellüler karsinom (HCC) gelişiminde HBV'yi işaret eden ilk bulgular, WHBV modellerinde gösterilmiştir (26). Pek çok çalışma, konak genomu ile en sık entegre olan ORF'in HBx proteini olduğunu ve hepatokarsinogenezde kritik bir rol oynadığını göstermektedir (27).

Şekil 1. HBV partiküllerinin elektron mikroskopik görüntüsü ve Dane partikülü şematik görünümü (24)



2.4. Genom Yapısı

HBV, 3020 ile 3320 arasında nükleotid içeren kısmen çift sarmallı sirküler bir DNA'ya sahiptir. Sirküler sarmalların hiçbirisi kovalent olarak kapalı değildir. Genom, “birbiri içine geçen” genler içeren biçimde kendine has özellikte organize olmuştur (8). Virüs proteinlerini kodlayan uzun zincir (L veya – negatif zincir) 3200 nükleotid taşır ve 5' ucunda terminal bir protein içerir. Daha kısa olan zincir (S veya + pozitif zincir) 1800-2700 arası değişken uzunlukta nükleotid içermektedir. Pozitif zincir her zaman tamamlanmamıştır ve sabit bir 5' ucu bulunur fakat 3' uç değişkendir. HBV DNA'nın çember şeklindeki yapısal bütünlüğü, her iki zincirin 5' uçlarından birbirine tutunması ile gerçekleşir (5).

Her iki zincirin 5' ucu arasında kısa (HBV'de 220 baz çifti) bir yapıştırıcı üst üste gelen bölüm bulunur. Her iki zincir 5' ucunda, 10-11 nükleotidlik iki direk-tekrar dizisi (DR-Direct Repeats, DR1 ve DR2) içerirler (Şekil 2) (28).

Viral polimeraz, negatif zincire fosfotrozin bağı ile kovalent olarak bağlanmıştır. Pozitif zincirin 5' ucunda, pregenomik RNA'dan artık kalan pozitif zincir sentezi için primer görevi gören kısa bir RNA oligomeri kovalent bağlıdır, 3' ucu ise değişkendir. Buna karşılık, negatif zincirin 5' ucunda kovalent olarak bağlı P proteini bulunmaktadır. Bu yapılar viral replikasyon için mutlaka gereklidir (29, 30).

Genom üzerinde 4 adet genom olabilecek DNA bölgesi (protein kodlayabilecek nükleik asit dizisi, open reading frame-ORF) tanımlanmıştır. Bu ORF'ler, 6 start kodonu, 2 transkripsiyon enhancer (güçlendirici) element (Enh1, Enh2), 4 promoter, çoklu adenilasyon işaret modeli ve pek çok DNA replikasyon sinyalleri ile negatif zincir tarafından kodlanırlar. HBV DNA'sında bu dört gen bölgesi arka arkaya ve birbirinden ayrı bölgelerde bulunmazlar, aksine HBV genleri birbirleri ile içi içedirler ve aynı nükleotidler, farklı bölgelerden okumanın başlaması ile, farklı proteinlerin şifrelenmesinde rol oynarlar. Genomdaki nükleotid dizilerinin yarısı, birden fazla mRNA sentezi için kullanılır (3, 5, 29).

HBV'ünün gen bölgeleri:

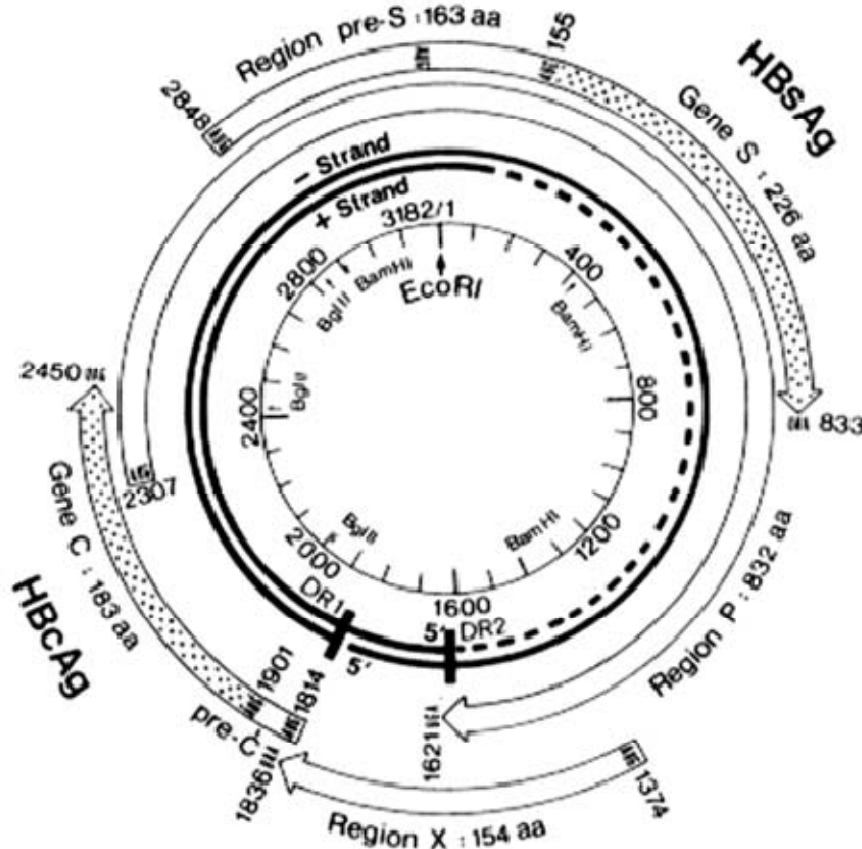
- **S geni:** Virionu çevreleyen kılıf proteinlerini kodlar. Pre-S1, Pre-S2 ve S bölgelerini içerir. PreS1+preS2+S dizisi büyük (39 kd) yüzey proteinini, preS2+S dizisi orta (31 kd) ve S dizisi küçük (24 kd) yüzey proteinlerini kodlarlar.

- **C geni:** Kor ve prekor bölgelerinden oluşur. İki ayrı protein sentezletir. Eğer sentez prekor kısmında yer alan AUG'den başlarsa 212 aminoasitlik translasyon ürünü ortaya çıkar, bu da HBeAg'nin prekürsör molekülüdür. Eğer translasyon olayı kor bölgesindeki AUG'den hareket ederse 183 aa'lık daha kısa bir polipeptid olan HBcAg sentezlenir.

- **X geni:** 154 aminoasitlik HBx proteinini kodlar. Şu ana kadar X proteinin rolü tam olarak anlaşılamamıştır. Yapısal olmayan, karaciğerde bulunan, replikasyonda rol oynayan bir antijendir. İn vivo çalışmalarda HCC oluşumunda rol oynadığı gösterilmiştir. Anti-HBxAg antikorlarının erken tanı belirteci olabileceği öne sürülmüştür.

- **P geni:** DNA polimeraz, revers transkriptaz ve RNaz H aktivitesine sahip olan viral polimeraz enzimini kodlar (3, 5, 29).

Şekil 2. Hepatit B virüsü genomik yapısı (28)



2.5. Replikasyon

HBV replikasyonu genomun asimetrik yapısı, endojen polimeraz ve revers transkriptaz reaksiyonları nedeniyle özellik gösterir. DNA replikasyonu bir RNA kalıbı aracılığı ile revers transkripsiyonla olur. Viral replikasyon sitoplazmada gerçekleşir ve negatif zincir RNA aracından, pozitif zincir negatif zincirden sentezlenir (25).

Prodüktif enfeksiyon çok kısıtlı hücrede gerçekleşir ve HBV'nin tek kanıtlanmış enfeksiyon bölgesi hepatositlerdir. Safra kanalı epitel hücreleri, pankreasın bazı endokrin ve ekzokrin hücreleri, böbrek ve lenfoid doku da replikasyon bölgesi olabilir. Fakat hepatosit dışı replikasyon bölgelerinin viral patogeneze rolü olmadığı düşünülmektedir (3). Laboratuvar ortamında insan hepatosit hücre kültürlerinde replikasyon kanıtlanmıştır, fakat maalesef karaciğer tümörlerinden elde edilen hücre gruplarının hiçbirisi HBV virionları ile enfekte edilememiştir. Hepadnavirusların replikasyonu ile ilgili bildiklerimizin çoğu ya HBV DNA ile transfeksiyon ya da hayvan hepadnavirusları ile enfeksiyon oluşturulmuş hücre kültürlerinden elde edilmiştir (25).

HBV replikasyonu şu basamaklarda gerçekleşir:

1) Virüslerin hücre içine girmesi ve çekirdekte çift iplikcikli DNA'nın tamamlanması:

a) Tutunma: HBV'nin hepatositlere tutunması HBsAg glikoproteinleri aracılığıyla olmaktadır. Bu bağlanmada polimerik IgA, transferrin reseptörü, asialoglikoprotein reseptörü ve insan karaciğer annexin 5 proteini gibi pek çok karaciğer hücre reseptörü ortaya atılmıştır. Girişin mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Virüsün bağlanma bölgesi L proteini üzerindedir (19, 32). Viral tutunma ve hücre içine giriş için hepatosit reseptörü ile virüsün preS proteini etkileşir. PreS1 ve preS2 proteinlerinin karaciğere özgü bölümleri tanımlanmıştır. PreS1 proteininin 3. ve 77. aa'leri viral enfektivite ile ilişkilidir. PreS2 ayrıca serum albuminine bağlanır ve hepatosite bağlanmada albumini aracı olarak kullanmaktadır (3).

b) Hücre içine giriş: Viral tutunmayı takiben membran füzyonu ile nükleokapsid sitoplazmaya girer, pasif difüzyon veya tubuler taşınım ile çekirdeğe taşınır (3). HBV kapsidi nükleer porlardan geçerek nükleusa girmektedir. Bu olayın nasıl gerçekleştiği net değildir. Nükleer por içinde mi soyulma olduğu yoksa sitoplazmadan nükleusa kapsid içererek mi salındığı tam olarak bilinmemektedir (32).

c) cccDNA'nın oluşumu: Viral replikasyonun başında viral polimeraz enzimi, pozitif zincirin 5' ucuna tutunmuş olan kısa RNA dizisinden başlayarak pozitif zinciri tamamlar (3). Kovalent bağlı proteininin, negatif zincir ucundaki 9 bazlık fazlalık ve artı uçtaki RNA ayrılmasından sonra DNA tamamen çift-iplikli, kovalentli kapalı dairesel (ccc) DNA'ya çevrilir (28). Bütün bu virüs genomundaki değişikliklerin konak enzimleri ile mi yürütüldüğü yoksa, bazılarında virüs P proteininin mi rol aldığı kesin değildir (19). Bu cccDNA viral pgRNA için kalıp görevi gördüğünden enfeksiyonun başladığını gösterir. Virüs enfeksiyonundan 24 saat sonra karaciğerde cccDNA oluşumu gösterilmiştir (3).

2) Pregenomik ve subgenomik RNA'ların sentezi: cccDNA transkripsiyon için bir şablondur. HBV genomunda 4 adet promoter bölgesi bulunmaktadır, bunlar sırasıyla preS1, preS2, X ve preC dir. DNA'ya bağlanmaması ve bu nedenle tipik bir transkripsiyon faktörü olmamasına rağmen yine de virüs protein X'in de transkripsiyon faktörü olduğu düşünülmektedir. Çekirdekte hücresel RNA polimeraz II enzimi kullanılarak, cccDNA'dan 4 tip RNA sentezlenir (19). Kor promoter bölgesi viral replikasyonun merkezidir ve negatif zincirden pregenomik RNA (pgRNA) olarak adlandırılan 3.5 kb'lık en büyük RNA'yı sentezletir. PgRNA, hem revers transkripsiyonla viral genom sentezi için kullanılır, hem de diğer mRNA'lar gibi translasyona uğrayarak HBcAg, HBeAg ve polimeraz proteinlerini sentezletir (3).

Sentezlenen mRNA'lar şunlardır:

- **3.5 kb'lık mRNA:** Genomdan daha büyük olan bu mRNA, hem genom replikasyonu için kalıp görevi görür, hem de HBeAg, HBcAg ve polimeraz proteinlerini sentezletir.

- **2.4 kb'lık mRNA:** Üç ayrı başlangıç kodonu aracılığı ile küçük, orta ve büyük yüzey proteinlerini sentezletir. mRNA'nın amino terminalindeki başlangıç kodonundan başlayan sentez ile preS1, preS2 ve S proteinlerini içeren L yüzey proteini oluşturulur. M yüzey proteini ise ikinci okuma kodonundan başlayarak sentezlenir. PreS2 ve S proteinlerini içerir. S proteini en küçük protein olup, üçüncü başlangıç kodonundan başlayarak sentezlenir.

- **2.1 kb'lık mRNA:** Sadece preS2 ve S proteinlerini sentezletir.

- **0.7 kb'lık mRNA:** HBx proteinini sentezletir (3).

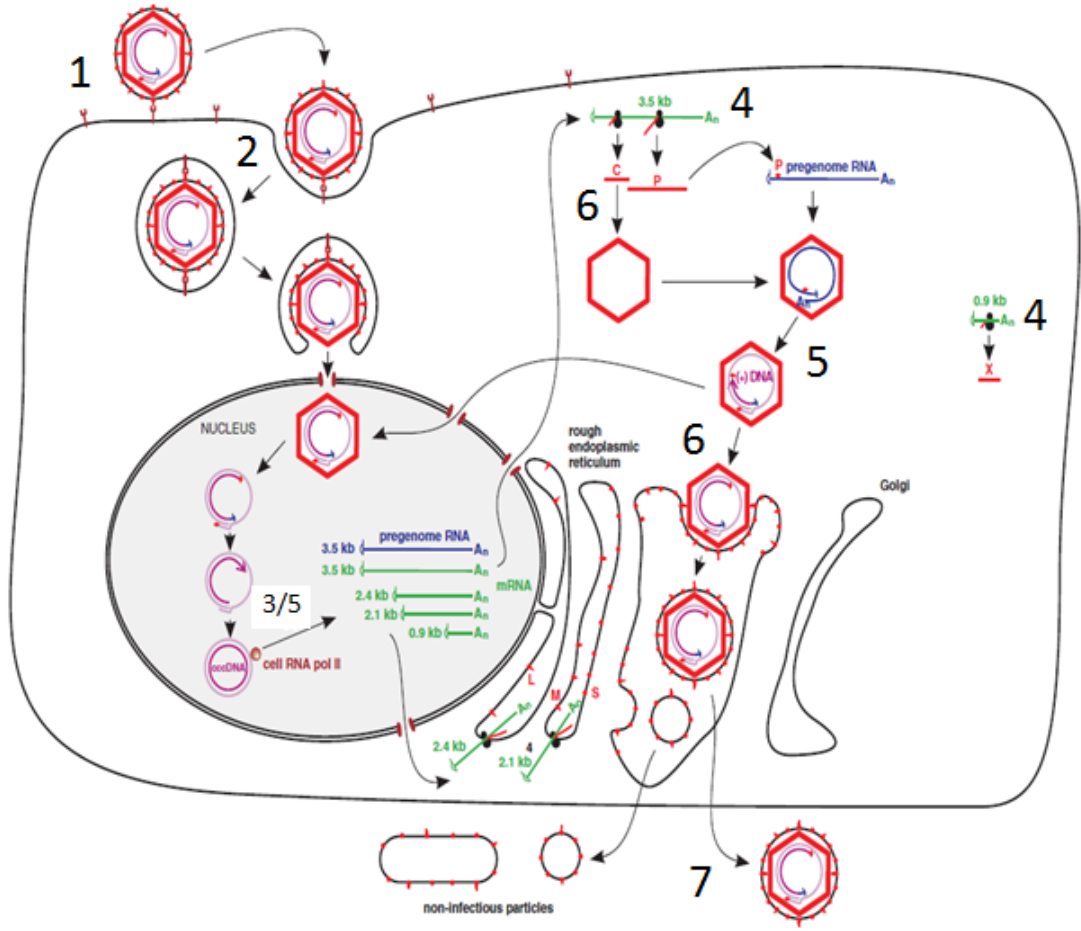
Bu transkriptler çoklu adenilasyona uğrarlar ve sitoplazmaya taşınırlar (33). Sonra viral proteinleri oluşturmak üzere translasyona uğrarlar. HBcAg, HBeAg, Pol protein, viral zarf proteinleri ve hepatit X proteinini (HBx) oluştururlar (34).

3) Viral kapsidin sentezi ve genomun replikasyonu:

Virüs replikasyonu ile ilişkili transkript tüm genomu ve ek olarak terminal artığı kuşatan pregenomik RNA'dır (30). PgRNA önce 200-300 molekül HBcAg sentezletir, sonra polimeraz sentezine izin verir. Polimeraz sentezi pgRNA'nın kor bölgesi içinde kalan bir başlangıç kodonundan başlar. Polimerazın sentezlenmesi pgRNA sentezini durdurur. PgRNA'nın 5' ucunda bulunan enkapsidasyon dizisi (e-dizisi) viral polimeraz enzimini bağlar ve viral korun yapımı başlar. HBcAg ikiye ikiye bir araya gelir, disülfid bağları ile stabilize olur. Bu birimlerden 180-240 tanesi bir araya gelerek ikozahedral kapsidi oluşturur. E dizisi, çekirdek proteinin C terminali ile etkileşir ve pgRNA kapsid içine yerleşir ve pgRNA'dan revers transkripsiyon ile negatif DNA iplikciğinin sentezi, viral kapsit içinde, sitoplazmada gerçekleşir (3). Negatif DNA sentezlendikten sonra viral polimerazın RNaz H aktivitesi ile pgRNA yıkılır ve DNA polimeraz aktivitesi ile 5' ucundaki RNA primeri kullanılarak pozitif iplikcik sentezlenir. Pozitif DNA sentezi sırasında, nükleokapsid ya cccDNA havuzunu arttırmak için nükleusa göç eder, ya da virüs zarf proteinleri içeren membran içinden tomurcuklanmasını sağlayan maturasyon olaylarına uğramaktadır. Nükleokapsid sitoplazmadaki nükleotid havuzundan kesildiğinde, DNA sentezi tomurcuklanma sırasında durur. Bu pozitif DNA'nın virionda neden tamamlanamadığını anlatmaktadır (19). Pozitif iplikciğin sentezi tamamlanmaz ve eksik olarak kalır. Her iki iplikcik 5' uçlarından bağlanarak rcDNA sentezi tamamlanmış olur (3).

4) Zarfın kazanılması ve hücreden salınma: İçinde DNA sentezi süren viral kapsit endoplazmik retikulumdan geçerken yüzey proteinlerini taşıyan zarfla kaplanır. Zarfın kazanılması için büyük yüzey proteini (L protein) gereklidir. L proteini endoplazmik retikulum zarına yerleşir, zarın iç kısmında kalan bölümleri çekirdek proteinleri ile bağlanarak tomurcuklanırlar (3). Virionlar dışarı salınacakları hücre yüzeyine taşınırlar. Bu transportun plazma membranı ile birleşerek ekzositoz ile virionları dışarı salan veziküller aracılığı ile olduğu düşünülmektedir. Ayrıca enfeksiyöz olmayan küresel ve filamentöz yapılar da hücreden salınmaktadır (19).

Şekil 3. HBV replikasyonu basamakları (19)



1) Bağlanma

2) Hücre içine giriş

3) Transkripsiyon

4) Translasyon

5) Genom replikasyonu

6) Zarf kazanma

7) Hücreden çıkış

2.6. Virüs Proteinleri

2.6.1. Yüzey proteinleri

HBV zarfı 3 benzer viral yüzey proteini içerir. Hepsi translasyon için 3 başlama alanı ve genotipe göre değişen 389 veya 400 kodon içeren E olarak anılan tek ORF'den eksprese edilirler. Kullanılan translasyon başlatma alanına göre oluşan yüzey proteini değişmektedir. Eğer okuma işlemi, birinci kodondan başlar ise S geninin ön kısmındaki PreS1+PreS2+S bölgeleri okunur ve sonuçta büyük protein (Large protein-L) şeklinde tanımlanan ürün sentezlenir. Okuma ikinci başlangıç kodonundan harekete geçer ise PreS2+S bölgelerine ait ürün olan orta protein (middle protein-M) oluşur. Eğer okuma üçüncü kodondan başlar ise, bu kez major protein olan S proteini (Small protein) sentezlenir (5). Kısa transkriptlerin translasyonu ile 281 aa uzunluğunda orta büyüklükte M proteininin ve 226 aa'lık küçük S proteininin oluşmasına neden olmaktadır (35). Yüzey proteinleri 2.1 ve 2.4 kb'lık subgenomik mRNA'lerden sentezlenirler ve nükleokapsidin zarfını kazanması için gereklidir. S-HBsAg major S gen ürünü, L ve M proteinleri ise minör türleridir. Her üç yüzey proteini de S domeninde glikozilasyon alanı içerirler ve Dane partikülünde yer alırlar (3).

S proteini: Küçük yüzey proteini 24 kDa moleküler ağırlığa sahiptir ve 4 veya 5 helikale sahip, aynı büyüklükte glikozile ve glikozile olmayan şeklinde 2 formda görülen yüzey proteinidir. 226 aa'den oluşmaktadır. HBsAg'nin % 80'i S formundadır (36). Büyük ve orta yüzey proteinleri Dane partikülünde eşit miktarda bulunur, küçük yüzey proteini (S) Dane partikülünde en fazla bulunan yüzey proteinidir. Yalnız başına sferik partikülleri oluşturmaktadır (3).

M proteini: 281 aa'den oluşmaktadır. Tam olarak görevi bilinmemektedir. Yapısında preS2 ve S bölgelerini içerir. Orta yüzey proteini ile birlikte küçük yüzey proteini filamentöz partikülleri oluştururlar (3, 33).

L proteini: Büyük yüzey proteini 39 kDa moleküler ağırlığa sahiptir ve preS1, preS2 ve S bölgelerini içerir. Büyük mRNA ürünlerinin translasyonu, 389-400 aa'den oluşan L proteinleri oluşumunu sağlar. Viral döngüde ve enfektivitede önemli rolü vardır. Büyük yüzey proteini hücreden dışarı salınmaz ve fazla sentezlendiğinde hücre içinde birikir ve toksik etki yapar. Böyle hücreler özellikle özgül tanı yöntemleri gelişmeden önce

kronik hepatitlerde erken belirti olarak kabul edilen “buzlu cam hücreleri” görünümü verirler (3, 33).

Üç yüzey zarf glikoproteini değişik HBV partikül tipleri arasında düzgün bir şekilde dağılmamıştır. 22 nm’lik subviral partikülleri ağırlıklı olarak S proteininden oluşurken, değişik oranda M proteini ve çok az oranda L proteini içermektedir, bazen L proteini içermez. Virüs partikülleri L proteini yönünden zengindir. L proteini, yüzey proteinlerine elverişli bağlanmayı sağlayan reseptör tanıma domeni taşırlar (33). HBV yüzey proteinleri endoplazmik retikulumda sentezlenirler. Oldukça kompleks bir yapı kazanırlar (35).

2.6.2. Kor proteinleri

HBcAg: Eğer kor bölgesindeki translasyon AUG’dan başlarsa 183 aa’lık kısa bir polipeptid sentezlenir. Bu HBcAg’dır ve sadece kanda Dane partikülleri içinde bulunur, hepatositlerde ise nükleusta yer alır. Son yıllarda yapılan bazı çalışmalarda HBcAg’nin çok kısa bir süre için serbest halde serumda gösterilebildiği kanıtlanmışsa da, antijenin süratle spesifik antikorları ile kompleksleşme özelliği, rutin tanı yöntemi olarak incelenmesinin yararlı ve kolay olmadığını göstermiştir (5).

HBcAg virüsün çekirdekle ilişkili antijenlerindendir ve aktif viral replikasyonun göstergesidir. Çekirdekte birikimi sonucu rutin kesitlerde hepatosit çekirdeğinde kumlu bir görünüme (sandy nucleus) neden olur. İmmünohistokimyasal olarak HBcAg, çekirdek ve sitoplazmada gösterilebilir (37).

HBeAg (Enfektivite proteini): Kor bölgesine ait ORF’de iki başlangıç kodonu bulunmaktadır, eğer sentez pre-C kısmında yer alan AUG’dan başlar ise 212 aa’lık translasyon ürünü ortaya çıkar, bu ürün HBeAg’nin prekürsör molekülüdür (5). Precore bölgesi bu proteini endoplazmik retikuluma yönlendiren sinyali taşır. Endoplazmik retikulumda konak proteazları, proteinin karboksi terminalini ayırır ve HBeAg oluşur. HBeAg’nin tam fonksiyonu bilinmemektedir. Replikasyon için gerekli değildir. HBcAg’nin sadece karaciğer dokusu içinde saptanmasına karşın HBeAg hücreden dışarı salınır. HBcAg ile çapraz immünoreaktivitesi nedeniyle, konak immün yanıtını virüsle enfekte hücrelerden uzak tutma görevini üstlendiği düşünülmektedir. HBeAg

sentezleyemeyen mutant virüslerle oluşan enfeksiyonlarda daha ağır hepatik hasar görülmesi de bu şekilde açıklanabilir. HBeAg, viral DNA sentezi için kalıp olarak kullanılan pgRNA'dan sentezlendiği için HBeAg'nin yüksek miktarda olması fazla miktarda pgRNA sentezlendiğini, yani aktif replikasyonu gösterir (3).

2.6.3. X proteini (HBxAg)

X geni, HBV genomunda 1376 ile 1838. nükleotidler arasında yer alan en küçük gen bölgesidir. X geni, transkripsiyonel transaktivatörler olarak görev yapan iki protein sentezler. Bu gen tarafından sentezlenen HBxAg, 154 aminoasitten meydana gelmiş, 16 kDa molekül ağırlığında, küçük, bazik bir proteindir. Viral siklus ve HBV patobiyolojisinde bu proteinin fonksiyonu (veya fonksiyonları) henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (12). X geni ürünü olan 154 aa'lık X proteini, yapısal olmayan, karaciğerde bulunan ve replikasyonda rol oynayan bir antijendir (5). Doğal enfeksiyondaki rolü tam bilinmemesine karşın virüs replikasyonu için gereklidir. İn vitro olarak, viral genleri ve konak MHC genlerini aktive ettiği gösterilmiştir. Viral genom transkripsiyonu için gerekli olan X proteini, hepatosellüler karsinom gelişmesinden de sorumlu tutulmaktadır. HBx, birçok promoter bölgeyi aktive etmekte, viral RNA'nın stabilitesini sağlamakta, hücre büyümesini ve apoptotik hücre ölümünü etkilemektedir. Sitoplazmada mitojenik sinyal yolunu aktive etmekte, çekirdekte ise transkripsiyon faktörlerini etkileyerek hepatokarsinogenezi desteklemektedir (3).

2.6.4. P proteini

P geni revers transkriptaz aktivitesine sahip DNA polimeraz enzimini kodlar (23). P proteininin immunojen özelliği vardır. P geni, HBV genomunun yaklaşık 3/4'ünü kaplayan en uzun gendir. Nükleotid 2309 ile 1623 arasında yer alır ve 832 aminoasitten (bazen 845 aminoaside kadar uzar) oluşmuş 92 kDa molekül ağırlığında bir protein sentezler. P proteini; revers transkriptaz, endonükleaz (RNaz H) ve hem DNA hem de RNA'ya bağımlı

polimeraz aktivitesine sahiptir. Genetik analizler sonucunda aminoterminal uçtan karboksiterminal uca doğru düzenlenmiş değişik fonksiyonel domenler tanımlanmıştır.

1) Terminal protein; negatif DNA sarmalının sentezlenmesinde RNA pregenomunun revers transkripsiyonu için "primer" olarak hizmet verir.

2) Spacer bölge; bu bölgenin enzim aktivitesi üzerine direkt etkisi yoktur, çıkarılması durumunda aktivite kaybı olmaz.

3) DNA polimeraz/revers transkriptaz aktivitesi

4) RNaz H aktivitesi; RNA pregenomunun sindirilip yok edilmesinde endonükleaz görevi üstlenir. Ancak etkinlikleri farklı olan bu domenlerin viral bir proteaz tarafından parçalanma sonucunda mı yoksa yapının bütünlüğünün korunmasıyla mı işlev gördüğü henüz tam olarak açıklığa kavuşmamıştır (12).

2.7. HBV Serotip ve Genotipleri

2.7.1. HBV serotipleri

Subtip ve serotip terimleri, HBsAg antijenik determinantlarının ve HBV genotip subgruplarının her ikisini de tarif etmek için kullanılmaktadır. Karışıklığı önlemek ve uygunluk sağlamak için “serotip” veya “serolojik subtip” terimi HBsAg antijenik determinantlarını tanımlamak için kullanılmaktadır. Tüm HBV kökenlerinde ortak olan a determinantından başka iki determinant daha tanımlanmıştır. Biri 122. aa’de olup “d” yada “y” özgülüğünde, diğeri ise 160. aa’de ve “w” yada “r” özgülüğündedir. Bu üç determinantın kombinasyonları ile 4 ana serotip oluşmaktadır. A determinantının ilave başka subdeterminantların tanımlanması ile serolojik serotiplerinin sayısı 9’a çıkmıştır. Bunlar ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adw2, adwq, adr, adrq serotipleridir (31). HBV’nin serotipleri monoklonal antikorlarla serolojik olarak ayırt edilebilir. Bu farklı serotiplerin coğrafi dağılımı farklıdır. Kuzeybatı Avrupa, Kuzey Amerika ve Güneydoğu Asya’da en sık adw serotipi görülmektedir. Akdeniz bölgesi ve Batı Afrika’da ise ayw serotip sık görülür. Adr serotipi Polinezya ve Güneydoğu Asya’da, ayr serotipi ise Vietnam’da saptanmış daha nadir serotiplerdir. Serotiplerin saptanması enfeksiyon kaynağının belirlenmesi açısından önem taşır. Tüm HBV serotiplerinde ortak olan immünodominant a

determinantı nedeniyle, farklı serotiplerle yeniden enfeksiyon nadirdir (3). Genotipler, serotiplere göre, HBV coğrafik dağılımı ile daha fazla uyum göstermektedir ve bu yüzden moleküler epidemiyolojik çalışmalarda serotiplerden daha kullanışlıdır (31).

2.7.2. HBV genotipleri

Uzunca bir zaman sonra genom dizilimi stabil hale gelen formlara genotip terimi kullanılmaktadır ve bunlar replikasyon yeteneğine sahiptirler (31). Blumberg, 1965 yılında Avusturya antijenini keşfettikten sonra HBV üzerinde yoğun araştırmalar başlamıştır. Okamoto ve arkadaşları tarafından, 1988 yılında HBV tüm genomunun dizisi belirlenip, genomlar arasında en az % 8 veya daha fazla farklılık gösterenler ayrı ayrı gruplandırılıp A'dan D'ye 4 genotip tanımlanmıştır (14). Norder ve arkadaşları tarafından 1992 yılında, S geni dizisinin genotiplerle nasıl bağlantı içinde olduğu araştırılmış ve S geni dizileri arasında en az % 4 lük bir farklılık olduğunda genotiplerle uyumluluk gözlenmiştir. Böylece S geni incelenerek E ve F olmak üzere iki yeni genotip daha tanımlanmış ve genotip sayısı 6'ya yükselmiştir. Stuyver ve arkadaşları, genomları 3248 baz çift uzunluğunda olan ve filogenetik olarak bilinen hiçbir genotipe uymayan HBV'ler tanımlamışlar ve bunları genotip G olarak adlandırmışlardır. Bunlara ek olarak daha sonra Orta Amerika'ya özgü H genotipi de tarif edilmiştir. Böylece günümüzde HBV genomları moleküler düzeyde incelendiğinde A'dan H'ye 8 genotip altında toplanmaktadır (14).

HBV genotipleri arasında, ORF uzunlukları ve translasyona uğrayan protein ürünleri büyüklükleri açısından çeşitli farklılıklar vardır (31).

Son yıllarda hepatit C virüs enfeksiyonunda olduğu gibi HBV enfeksiyonunda da genotipler ile hastalığın klinik seyri arasında bir takım ilişkiler tanımlanmıştır. Ayrıca karışık genotip ile enfekte hastalarda (örneğin, hem A hem C genotiplerinin birlikte bulunması) replikasyon fenotipinde farklılıklar görülmekte ve tek genotip ile enfekte hastalara göre artan ciddi klinik seyir eşlik etmektedir. Yine değişik coğrafi bölgelerdeki genotiplerle oluşan farklı klinik seyirler bildirilmektedir (14).

1. HBV subgenotipleri

Komple genoma karşı aralarında % 4 ve % 8 nükleotid farkı bulunan HBV genotipleri alt gruplarını tanımlamak için, topluluk veya küme “clade” terimi de % 4’den az nükleotid farklılığı bulunan subgenotiplerin ayırımında kullanılmaktadır (31).

Genotip A ve B üzerinde yapılan çalışmalarla subgenotiplendirme düşüncesinin gelişmeye başlamasından beri, genotiplerde genetik varyasyon kapsamlı olarak araştırılmaktadır. E, G ve H dışındaki tüm genotipler subgenotiplere ayrılmaktadır (38).

Genotip A; A1, A2, A3 ve A4, genotip B B1’den B6’ya kadar 6 subgenotipe, genotip C; C1’den C5’e kadar 5 subgenotipe, genotip D; D1’den D5’e kadar 5 subgenotipe ayrılmaktadır. F genotipi ise: F1a, F1b, F1d, F2a, F2b, F3 ve F4 olarak ayrılmaktadır.

2. HBV genotiplerinin coğrafik dağılımı ve genel özellikleri

HBV genotiplerinin epidemiyolojik coğrafik dağılımı halen dünyanın değişik bölgelerinde araştırılmaktadır. Son 10 yıl boyunca genotiplendirilen HBV enfekte kişi sayısı yaklaşık 45.000 dir ve bu sayının yarıdan fazlası Doğu Asya’dadır. Çeşitli verilere göre, bazı yerlerde diğer genotipler % 5’in altında iken tek tip genotipin baskın halde bulunabildiği görülmektedir. Diğer taraftan yüksek göç düzeylerine sahip ülkelerde genotip çeşitliliği rapor edilmiştir. Avrupa ve Kuzey Amerika’da bilinen tüm genotip tipleri görülebilmektedir. Avustralya’da A, B, C ve D genotipleri eşit düzeyde bulunmaktadır (38).

Genotip A ve subgenotipleri: Genotip A, kor geni karboksil ucunda diğer genotiplerde bulunmayan 6 nükleotid eki vardır. Subgenotip A1, preS2/S sekanslarının filogenetik analizi ile Kuzey Afrika’dan HBV izolatlarından tanımlanmıştır ve Kuzey Afrika ve Malavi’den tüm genomların analizi ile komfirme edilmişlerdir. Tüm ORF’lerde ve transkripsiyonel düzenleyici elementlerde karakteristik sekans özelliklerine sahiptir (31). 1896. nükleotidde G-A yer değiştirmesi ile stop kodon meydana getiren klasik prekor mutasyonu genotip A’da bulunmamaktadır. Genotip A 1858 pozisyonunda urasil yerine sitozin içermektedir ki bu diğer pek çok genotipde de bulunmaktadır. 1858 pozisyonunda sitozin bulunması prekor döngüsünü stabilize hale getirmektedir ve 1896 G-A mutasyonu oluşmasına izin vermemektedir. Genotip A1 Sahra altı Afrika’da, A2 Kuzey Avrupa’da, A3 ise Batı Afrika’da görülmektedir (39).

Genotip B: Genotip B, 2 major gruba ayrılmaktadır. B1 ve B6 genotiplerini içeren saf genotip B olan Bj (B Japan); B2, B3, B4 ve B5 subgenotiplerini içeren, kor bölgesinde

genotip C kor bölgesi ile rekombinasyon alanına sahip Ba (B Asya). Genotip B1 Japonya’da, genotip B2-5 Doğu Asya’da, en yeni tanımlanan B6 ise yerli halkın yaşadığı Arktik bölgesinde görülmektedir. HBeAg, B1’e göre Ba ile enfekte bireylerde anlamlı derecede sık bulunmaktadır. Bazal kor promoter (BKP) mutasyonları, yüksek HCC riski ve pek çok ağır karaciğer hastalığı ile ilişkili T1762/A1764 çifte mutasyonu, B1’e göre Ba suşlarında daha sık bulunmuştur. Sonuç olarak; akut ve fulminan hepatit B1 genotipi ile daha çok ilişkilendirilmiştir (39).

Genotip C: Genotip C; C1, C2 ve C3 olmak üzere 3 gruba ayrılmaktadır. Çin, Kore, Güneydoğu Asya’da ve Güney Pasifik Ada ülkelerinde görülmektedir. Pek çok çalışmada genotip C, karaciğer enflamasyonu, hepatit alevlenmeleri, karaciğer fibrozisi ve siroz için artmış risk ile ilişkilendirilmiştir. Genotip B’ye göre genotip C ile karaciğer sirozu gelişme ihtimali anlamlı derecede yüksektir (40). Bu çalışmalar, genotip C’nin HBV genotiplerinin en ölümcül olanı olabileceğini göstermektedir. Bu bulgular için 2 muhtemel açıklama vardır. Birincisi, A1, A2, B1-6, D ve F1 genotipine göre, HBV genotip C ile enfekte kişiler uzamış HBeAg pozitifliği ile gösterdiği gibi, açıkca daha yüksek HBV DNA seviyelerine sahiptirler. İkinci olarak da, yüksek HCC riski ile ilişkili bazal kor promoter mutasyonu gibi bazı belli başlı mutasyonlar, genotip C ile enfekte hastalarda daha sık oluşmaktadır (39).

Genotip D: Genotip D, Doğu Avrupa’dan, Kuzey Afrika, Rusya, Orta Doğu, Hint yarımadasını içeren şekilde Akdeniz ve çevresi ve Arktik bölge boyunca geniş bir alana yayılmıştır (39). Genotip D preS1 bölgesinin N ucunda 33 nükleotid delesyonu ile karakterizedir (31). Genotip D en çok rastlanan ve en çok yayılmış genotiptir. 4 subgenotip (D1-D4) ve 2 subtip (ayw2, ayw3) içermektedir (41). Son karşılaştırmalı bir çalışmada, HBV genotip D ile enfekte hastaların daha ağır hastalığa sahip oldukları, HCC geliştiği ve HBV genotip A hastalarına göre daha genç oldukları görülmüştür (18). Genotip D ile enfekte kişilerde, HBeAg anti-HBe dönüşümü genelde adolesans veya erken erişkilikte görülür. Bu dönüşüm, siroz ve HCC oluşumuna neden olabilir. Birleşmiş milletlerde yapılan, akut karaciğer bozukluğu çalışmalarında, genotip D’nin fulminant hepatit için bağımsız bir faktör olduğu bulunmuştur. Hindistanda yapılan bir çalışmada da genotip D genotip A’ya göre daha genç bireylerde daha ağır karaciğer hastalığı ve HCC gelişimi ile ilişkilendirilmiştir (39).

Genotip E: Genellikle Sahra altı Afrika’da ve göçlere bağlı olarak nadir olarak Fransa ve Britanya’da görülmektedir (42). Fakat Orta ve Batı Afrika’da yayılımı giderek sınırlanmakta, Avrupa’da ise artma eğilimindedir (38). Genotip E’nin, diğer genotiplere göre insan dışı HBV izolatlarına daha yakın olduğu rapor edilmiştir (43). X ve C ORF’lerine göre genotip D’den ayıramamaktadır. Fakat preS bölgesinde amino ucunda 3 nükleotid delesyonu ve genotip E imzası amino asitleri vardır (31).

Genotip G: Genotip G dünyada sadece küçük alanlarda bulunmaktadır. USA’da , Vietnam’da, Güney Avrupa’da ve özellikle genotip A olmak üzere diğer genotipler ile ko-enfeksiyon şeklinde bulunduğu görülmektedir. Hayvan deneylerinde genotip G ile monoenfeksiyonda, HBV zayıf olarak üremekte ve serumda HBV DNA oluşmamaktadır. Genotip G’nin bulunması fibrozis için bağımsız bir risk faktörüdür. Diğer genotiplerin aksine genotip G, kor bölgesinde 1905 pozisyonunda 36 bç’lik ekleme vardır. Prekor/kor bölgesinde 2 ve 8 pozisyonlarında 2 adet translasyonel stop kodona sahiptir ve bu yüzden HBeAg sentezlemesi beklenmemektedir. Fakat, bu genotip ile enfekte hastalarda HBeAg serumda saptanmaktadır. Bu virüsün alternatif bir translasyon stratejisi kullandığını akla getirmektedir (38).

Genotip F ve H: “Yeni Dünya” genotipleri olan genotip F ve H, Alaska ve Orta ile Güney Amerika’da yerli halkda görülmektedir. Genotip F, 4 subgenotipe ayrılmaktadır. Genotip H, genotip F ile çok yakından ilişkilidir ve genotip F’nin kümesi (clade) olduğu düşünülmektedir. Genotip F diğer genotiplerden % 14 fark ile ayrılmaktadır ve insan hepadnaviral soyundan ilk bölünmeyi temsil etmektedir. Çıkarılmış amino asit sekansı, bu genotipin yüksek genotip sapmasını açığa çıkarmaktadır. Daha önce HBsAg sekans analizi ile genotip F subgenotipi olarak ayrılan ve grup III olarak kabul edilen Nicaragua izolatları, tüm genomun analizinden sonra % 7.5-9.6 oranında genotip F’den ayrıldığı görülmüştür. Bu suşların değişik bir genotipe ait olduğu gösterilmiş ve genotip H tasarlanmıştır (39).

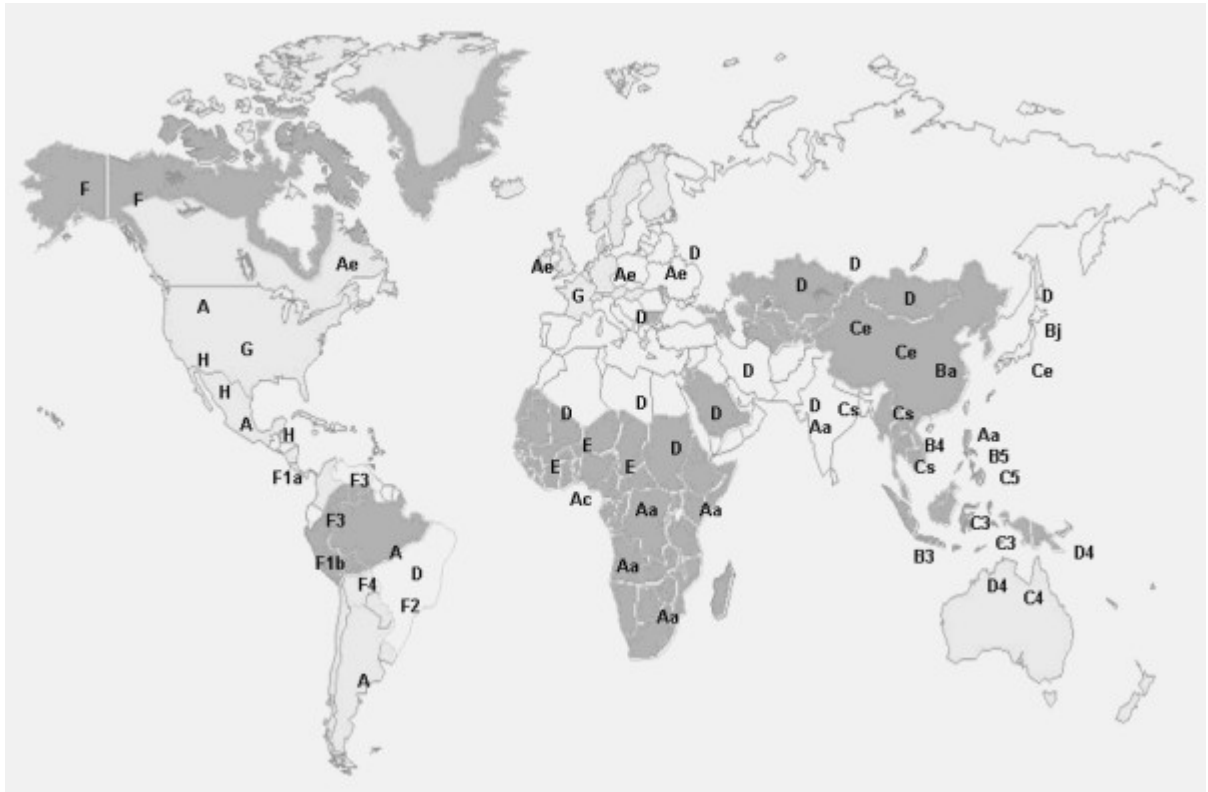
Ko-enfeksiyon: Serolojik olarak tiplendirme yapılabildiğinden beri değişik iki HBV genotipi ile çifte enfeksiyon bilinmektedir. Daha sonra, kronik HBV hastalarında aynı veya başka genotip HBV izolatları ile süper enfeksiyon bulguları tanımlanmıştır. Süper enfeksiyon, kronik hastalığın akut alevlenmesi eşliğindedir. Ek başka gözlemler interferon tedavisi alan hastalardan gelmiştir. İnterferon ile tedavi edilen hastalarda koenfeksiyon oranı bir çalışmada % 67 bulunmuştur (44). Genotip G ile enfeksiyona

her zaman genotip A koenfeksiyonunun eşlik ettiği gösterilmiştir (44, 45). Farklı HBV genotipleri ile ko-enfeksiyon değişik sıklıklarda rapor edilmektedir. Bu sıklık, çalışmaya alınan popülasyondaki endemik genotip ve coğrafik bölgeden ziyade genotiplendirme metodu ile daha güçlü ilişkili gibi gözükmemektedir (38).

Tablo 1. HBV genotipleri arasında farklılıklar, coğrafik dağılım ve klinik ilişkisi (46)

HBV genotipi	Coğrafik Dağılım	Kliniksel ilişkisi
A	Kuzey Amerika, Kuzeybatı Avrupa, Orta Afrika	Peginterferona daha iyi yanıt
B	Çin, Endonezya, Vietnam, Tayvan	Düşük hastalık aktivitesi Nonsirotik kişilerde HCC ile ilişki İnterferon ve lamivudine iyi yanıt
C	Doğu Asya, Kore, Çin, Tayvan, Japonya, Polynesia, Vietnam	Daha şiddetli KC hastalığı ile ilişki
D	Akdeniz, Orta Doğu, Hindistan	HBe Ag durumu ve precore mutasyon ile ilişki
E	Nijerya, Batı Afrika	Bilinmiyor
F	Alaska, Polynesia	Bilinmiyor
G	Kuzey Amerika, Fransa	Bilinmiyor
H	Orta ve Güney Afrika	Bilinmiyor

Şekil 4. 8 ana HBV genotipinin dünyada dağılımı. Açık renkli alanlar düşük endemik, açık gri alanlar orta endemik, koyu gri alanlar yüksek endemik alanları ifade etmektedir (47)



2.8. HBV Mutasyonları

Küresel HBV epidemiyolojisinin önemli bir unsuru, HBeAg sentezinin baskılanması ve inatçı enfeksiyon ile ilişkili HBV mutantlarının önemi ve dağılımına ek olarak HBeAg negatif enfeksiyonların ortaya çıkışı ve artan önemidir. Negatif kronik B hepatitlerinin prevalansı ve moleküler temeli, coğrafik olarak yaygın HBV genotipi ile değişmektedir (47).

HBV, “revers transkriptaz” enzimi sayesinde, RNA aracılı replike olan tek DNA virüsüdür. “Revers transkripsiyon” ile çoğalma sırasında viral genomda mutasyonlar oluşmakta ve böylece çeşitli mutasyonlar içeren HBV alt türleri ortaya çıkmaktadır. Bu mutasyonlardan bazıları virüs tahrip edici olmakla birlikte, bazıları da virüsün yaşamı ile uyumludur. Bu mutasyonların çoğu fonksiyonel olarak belirgin değişikliklere yol açmamakla birlikte, bazıları üst üste binen genler ve onların translasyonel ürünlerinde değişikliklere neden olabilmektedir. Son yıllarda ortaya konan bu HBV mutasyonları klinik ve tanısal olarak gösterdikleri değişikliklerden dolayı ilgi çekmiştir. Hepatit B virüsünde ilk saptanan ve üzerinde en çok durulan mutasyonlar prekor/kor mutasyonlarıdır (23).

HBV’de mutasyonlar iki önemli sonuca yol açmaktadır. Birincisi mevcut HBsAg tayin yöntemleri ile gözden kaçabildikleri için kan ve organlar yolu ile HBV geçişine neden olmalarıdır. İkincisi ise aşı ile immünizasyondan sonra anti-HBs pozitif hale gelen bireylerin yeniden mutant HBV suşları ile enfekte olabilmeleridir (23).

Replikasyon döngülerinde revers transkripsiyon basamağı içeren hepadnavirüsler gibi bazı DNA virüsleri, her yıl için her bölgesinde 10^{-4} - 10^{-5} aralığında evrim oranı göstermektedir. Bu oran bazı RNA virüsleri için gösterilen orandır. HBV, diğer DNA virüslerinden 10-100 kat fazla mutasyon oranı göstermektedir. HBV için tahmin edilen yıllık bölge başına evrim, $< 2 \times 10^{-4}$ baz değişikliğidir. Bu büyük virüs üretimi ile birlikte son derece dinamik bir süreci yansıtmaktadır (3, 14, 41).

Genotipleri belirleyen farklılıklar dışında viral genomda ortaya çıkan dizi değişikliklerinin (nokta mutasyonu, delesyon vs.) HBV’nin yaptığı karaciğer hastalıklarının seyri (akut, kronik, fulminan, kanser), antiviral tedavi, aktif ve pasif bağışıklama üzerine etkileri uzun yıllardır ilgi konusu olmuştur (5).

2.8.1. HBV yüzey antijeni mutantları ve aşılama ile ilişkili HBV mutantları

S gen mutantları konusundaki araştırmalar bazı bireylerde HBsAg negatif/anti-HBc ve/veya anti-HBs pozitif veya HBV enfeksiyonları ile ilgili hiçbir belirleyici yokken serumlarında HBV DNA bulunması gözlemlerine dayanarak başlamıştır. Günümüzde ticari HBsAg testleri ile mutantların çoğunun tanınmadığı gösterilmiştir (23).

Viral zarf proteininin nötralizan bölgesinde amino asit değişikliğine neden olan nokta mutasyonları nötralizan antikor olarak adlandırılan anti-HBs'den kaçış ile ilişkilendirilmişlerdir (48). HBV'ye karşı nötralizan antikor yanıtına neden olan "a" determinantında 124.-147. aminoasitler arası subtiplerde oldukça korunmuş bir bölgedir. Özellikle 145. pozisyonda bulunan glisinin, arjinine değişmesine neden olan mutasyonlar virüsde büyük antijenik değişikliklere neden olmaktadır. Bu bölgede olan antijenik değişiklikleri HBsAg'nin üç boyutlu yapısında önemli değişikliklere yol açmakta, anti-HBs'nin nötralizan etkisinden kurtulmasına ve replikasyona devam etmesine neden olmaktadır (3). Singapur ve Japonya'dan yeni bildirilen olgularda bazı aşılardan kaçan mutantların HBsAg'nin "a" determinantı dışındaki bölgelerde mutasyonlar taşıdıkları gösterilmiştir (23). Rekombinant HBsAg içeren aşılarla immünize edilen çocuklarda HBsAg ve anti-HBs'nin birlikteliği ile görülen bu mutant kökenler aşı ile indüklenmiş "kaçak mutantlar" olarak adlandırılmaktadır (3).

Aşılamayı takiben hem HBsAg hem de anti-HBs'nin birlikte bulunduğu olgular vardır. İlk olgu, İtalya'da önceden HB Ig verilmiş ve HBV aşısı ile aşılanmış bir kişinin serumunda HBsAg ve anti-HBs'nin birlikte bulunmasıyla ortaya çıkarılmış ve HBsAg'de Gly-145-Arg mutasyon varlığı gösterilmiştir (11).

HBV genomunun en fazla heterojenitesini PreS dizileri göstermektedir. İnaktif taşıyıcı serumlarından elde edilen HBV DNA dizilerinde, Pre-S genlerinde nokta mutasyonları, delesyonlar ve genetik rekombinasyon tanımlanmıştır (48).

Pek çok çalışma, hepatosellüler karsinoma (HCC) ile preS delesyonu arasında yakın ilişki olduğunu göstermiştir. Bu yayınlarda HCC hastalarında % 52 ile 62.5 arasında değişen oranlarda preS delesyonu olduğu yayınlanmıştır (49). Her ne kadar genel toplumda doğal olarak oluşan HBsAg mutantları tayin edilse de bunların insidansı halen düşüktür (23).

2.8.2. Prekor ve kor geni mutasyonları

HBV prekor/kor ORF'leri iki farklı ancak birbiriyle yakın ilişkili proteinleri kodlar; sırasıyla sekrete edilen hepatit B e antijeni (HBeAg) ve nükleokapsid kor antijeni (HBcAg). Hem HBcAg hem de HBeAg sitotoksik T lenfosit ve antikor bağımlı hücresel sitotoksiste için hedeftirler. Kor geni diğer genler ile üst üste binmeyen önemli bir bölgedir, bu nedenle kor geninde oluşacak doğal mutasyonların, üst üste binen genlerdekinden daha fazla olması beklenir. Ayrıca HBV'ye karşı immünolojik atağı uyaran interferon alfa tedavisi de kor proteininin B hücre epitop mutasyonlarıyla sonuçlanır (23).

En sık doğal HBV mutasyonları, prekor bölgesinde prematür bir stop kodon oluşturan G1896A mutasyonu ve HBeAg sentezini azaltan kor promoter bölgesindeki A1762T-G1764A ikili mutasyonudur. Prekor bölgesinde görülen en önemli mutasyon HBeAg'nin üretilmemesi ile karakterize olan stop kodon oluşumudur. Normalde prekor bölgesinde stop kodon bulunmaz ve prekor bölgesinin başlangıç kodonundan başlayan sentez işlemi kor bölgesinin start kodonu ile devam eder. Eğer prekor bölgesinin 1896. nükleotidindeki guaninin (G) yerine adenin (A) gelirse triptofan kodonu da denilen kodon 28 (TGG), stop kodon (TAG) haline gelir ve HBeAg'nin prokürsör proteini oluşamaz (12). Bu mutasyonda HBeAg translasyonu durmakta fakat HBcAg sentezi bu kodondan daha sonra başladığı için mutasyondan etkilenmemektedir. “E negatif” olarak adlandırılan bu varyant virüsler, fulminan hepatit ve ağır kronik karaciğer hastalarında da tanımlanmıştır (3, 50). Prekor mutasyonunun HBV genotip D ve B ile çok yakın ilişki içinde olduğu bulunmuştur ve bu yüzden Güney Avrupa ve Asya'da çok yaygındır (51).

İkili kor promoter mutasyonları 4 majör genotip ile birlikte bulunabilir fakat en sık HBV genotip A ve C ile ilişkilidir. Prekor ve daha az ölçüde ikili kor promoter mutasyonları HBeAg negatif hastalarda daha sıklıkla bulunmuştur. Bazı çalışmalar bu mutasyonların daha aktif ve ciddi karaciğer hastalıkları ile ilişkili olduklarını öne sürmektedir fakat prekor ve kor promoter varyantları aynı zamanda inaktif HBsAg taşıyıcılarında da bulunmuştur. Prekor ve kor promoter varyantları ile tedaviye cevap arasındaki ilişki üzerine veriler çelişkilidir. 10 yıldan fazla süren araştırmalara rağmen, prekor ve kor promoter varyantlarının klinik önemi belirsizliğini korumaktadır (51).

Diğer bir mutasyon grubu olan kor mutasyonu, c1742 - c1849 nükleotit grubunu içeren bazal kor promoter'i (BKP) etkilemekte ve transkripsiyonel prekor ve kor mRNA

azalmasına neden olmaktadır. Kor mutasyonları çoğunlukla c1762 (A-T) (cA1762T) ve c1764(G-A) (cG1764A) şeklinde olmaktadır ve genotipler ile yakın ilişkilidir. Bu mutasyonlar genotip A, B ve C’de sık görülür iken diğer genotiplerde henüz tanımlanmamıştır. Her iki noktada (nt1762/nt1764) mutasyonun birlikte olması viral yükü artırırken, HBeAg üretimini azaltmaktadır. Ancak HBeAg üretimini tamamen durdurmamaktadır (1).

2.8.3. Polimeraz geni mutasyonları

Multifonksiyonel bir protein olan HBV polimerazı HBV replikasyonunda görev alır. DNA polimeraz domenleri 5 korunmuş bölgeye (A-E) ayrılabilir. Böylece nükleozid analogu antiviral ajanların etkileri için (örneğin lamuvidin ve famsiklovir) ideal bir bölge oluştururlar. Bu ilaçlar revers transkriptaz ve DNA polimeraz aktivitelerini baskırlar. Fakat uzun süreli tedavi polimerazların katalitik bölgelerinde sıklıkla varyantlara yol açar ve böylece tedavinin antiviral etkilerinden kaçabilirler ve revers transkriptaz ve DNA polimeraz aktivitesini baskırlar (23).

Lamivudin tedavisi sırasında P geninde pek çok mutasyon gösterilmiş ve 3 tanesinin ciddi lamuvidin direncine neden olduğu saptanmıştır. Polimeraz enziminin C katlantısındaki tirozin (Y), methionin (M), aspartat (D), aspartat (D) aminoasitlerinden (YMDD motifi) methioninin izolösin veya valine değişmesi (M552I veya M552V), B katlantısındaki lösinin methionine değişmesi (L528M) ve B katlantısındaki valinin löesine değişmesi (V521L) lamuvidin direncinden sorumlu tutulmaktadır. Bu mutasyonlardan en sık YMDD mutasyonu görülmektedir. RNA’ya bağlı DNA polimerazın tüm revers transkriptaz enzimlerinde benzer ve korunmuş olan YMDD motifinde değişikliğe neden olan mutasyonlar, enzimin nükleotid bağlayan katalitik bölgesini etkilemekte ve lamivudin yanında famsiklovir, labukavir ve adefovir gibi diğer revers transkriptaz enzim inhibitörlerine de direnç gelişmesine neden olmaktadır (34).

2.8.4. X geni mutasyonları

X bölgesindeki mutasyonlar bazal kor promoter ve Enhancer II gibi replikasyonu kontrol eden reglatuvar unsurları kapsamaktadır. Bazal kor promoter bölgesindeki yaklaşık tüm delesyonlar ve insersiyonlar, X geni yapısında kaymaya neden olmaktadır ve kesilmiş X proteinlerinin oluşumuna neden olurlar. HBx geni HBV enfeksiyonunun oluşmasında önemli olabilen transkripsiyonel transaktivatör proteini kodlar. HBx proteininin aynı zamanda birçok viral genle birlikte hücrel genleri de (örneğin c-fos ve c-myc) aktive ederek HBV'ye bağlı hepatosellüler karsinoma onkogenezisinde rol alması muhtemeldir. Sistematik bir çalışmada Asyalı HBV ile enfekte hastalarda (Tayland ve Kore) yeni HBx mutasyonları gösterilmiştir. Yakın dönemde Singapur'daki hepatosellüler karsinomlu hastaların karaciğer dokularında yeni HBx mutantları saptanmıştır (34).

X geninde meydana gelen değişik mutasyonların fonksiyonel önemi tam olarak açıklığa kavuşmamış olmakla beraber bu tip varyantların enfektiviteleri zayıf, replikasyon seviyeleri düşüktür. Kronik HBV enfeksiyonlu, HCC'lu, fulminant hepatitli ve sirozun son döneminde bulunan hastalarda X geni üzerindeki 130. ve 131. kodonlarda nokta mutasyonları bildirilmiştir. Nükleotid 1770-1777 arasındaki 8 nükleotidlik delesyonunun DNA ekspresyon ve replikasyonunu baskıladığı ve sonuçta HBsAg'nin negatif hale geldiği bildirilmiştir. Serolojik olarak sessiz nonB-nonC hepatitli olgulardan bu tip mutantların sorumlu olabileceği tahmin edilmektedir (12).

Tablo 2. Hepatit B gen bölgeleri, mutasyonları ve bunlar arası ilişkiler (45)

HBV Gen Bölgesi	Mutasyonlar	Fenotip İlişkisi
Prekor	G1896A	HBeAg negatif mutantlar, şiddetli hastalık formları
Bazal Kor Promoter ve çoğaltıcı bölge	C1653T	Hızlı hastalık progresyonu ve HCC
	A1753T	Hızlı hastalık rogresyonu
	T1762A, T1764C	HCC
	C1766T	Fulminan Hepatit
X	K130M ve V131I	HCC gelişimi
Pre-S	Delesyonlar	HCC ile potansiyel ilişki
S	“a” determinant	Aşının etkisiz kaldığı mutantlar
Polimeraz	B, C ve D bölgelerinde	Nucleos(t)ide analogu ilaçlara direnç

Tablo 3. HBV genotipleri ile HBV proteinleri arasındaki ilişki ve prekor stop kodon (G1896A) ile BKP (1762/1764) mutasyonları sıklığı (18)

Genotip	Genom uzunluğu (nt)	HBV proteinleri (çıkarılmış amino asitlerin sayısı)			Klinik çalışmalarda saptanmış mutasyon sıklığı	
		PreS1	Pol	Kor	PC G1896A	BKP 1762/1764
A	3221	119	845	185	%6.5	%45
B	3215	119	843	183	%50	%16
C	3215	119	843	183	%50	%58
D	3182	108	832	183	%43	%12
E	3212	118	842	183	%27	%7
F	3215	119	843	183	%16-%65	ND
G	3248	108	842	195	%100	ND
H	3215	119	843	183	C1858 ND	ND
ND: saptanmamış						

2.9. Epidemiyoloji, Bulaş Yolları ve Korunma

2.9.1. Dünya’da HBV enfeksiyonu

HBV enfeksiyonu global bir halk sağlığı problemidir ve dünyada en sık görülen bulaşıcı hastalıklardan birisidir. Dünya popülasyonunun 1/3’ünden daha fazlası HBV ile enfektedir ve HBV taşıyıcılarının çoğu Asya ve Afrika’da yaşamaktadır. WHO, 2 milyardan daha fazla kişinin HBV ile enfekte olduğunu ve yılda 1 milyondan fazla insanın ölümüne yol açtığını tahmin etmektedir. Dünya çapında 350 milyon kişinin HBV ile kronik olarak enfekte olduğu, siroz ve karaciğer kanseri riski altında olduğu bildirilmiştir. HBV enfeksiyonuna bağlı dünya çapındaki yıllık ölüm sayısının 500.000 ile 700.000 arasında olduğu sanılmaktadır (8).

HBV enfeksiyonunun görülme sıklığı ve yaygın bulaşma yolu; dünya’nın farklı bölgelerinde değişiklik göstermektedir. Buna göre dünya ülkeleri 3 gruba ayrılır:

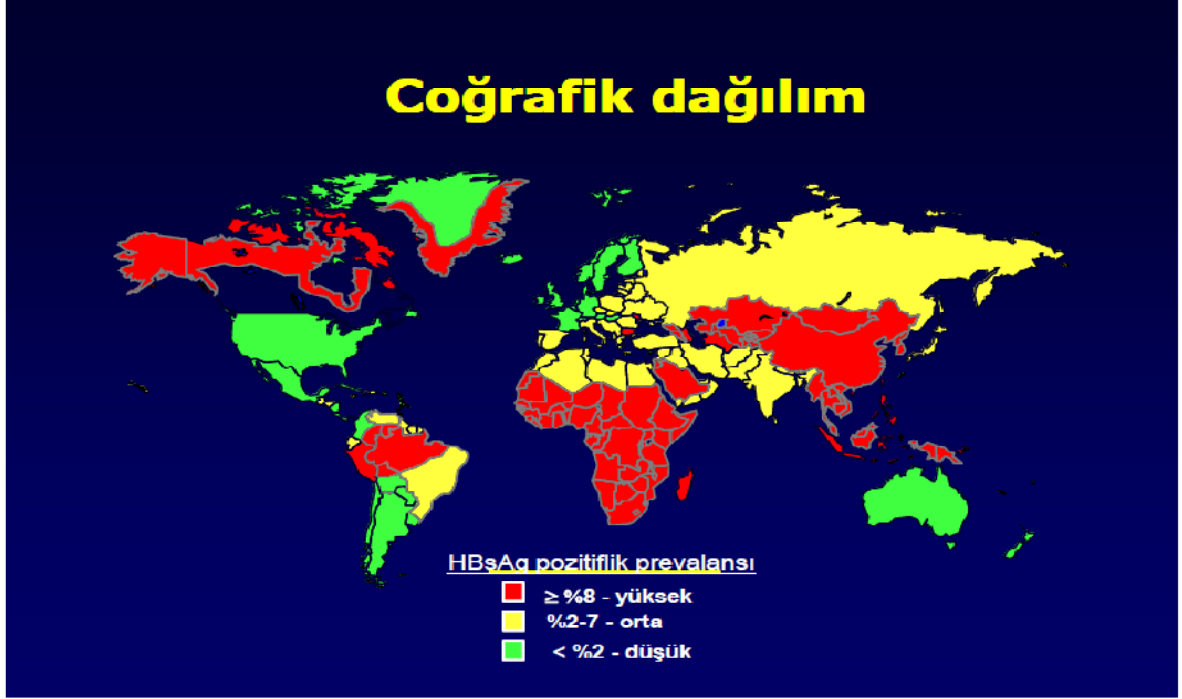
1) Yüksek endemisite ülkeleri: Toplumda HBsAg pozitifliği % 8’in üzerindedir. Dünya nüfusunun % 45’i bu ülkelerde yaşamaktadır. Japonya ve Hindistan dışında kalan bir çok Asya ülkesi, Amazon bölgesi, Pasifik Adaları, Afrika ülkeleri, Alaska, Avustralya ve Yeni Zelanda yerlileri bu grupta bulunur. Yüksek endemisite ülkelerinde, erişkinlerde,

HBV ile karşılaşma oranı, % 70-90 kadardır. Enfeksiyon sıklıkla kronikleşme riskinin yüksek olduğu yenidoğan ve erken çocukluk döneminde kazanılmaktadır. Bu dönemde asemptomatik enfeksiyon geçirilmesi nedeniyle akut hastalık tanısı az, fakat kronik karaciğer hastalığı ve hepatosellüler kanser oranı yüksektir (3).

2) Orta endemisite ülkeleri: HBsAg prevelansının % 2-7 olduğu coğrafik bölgelerdir. Bu bölgelerde daha çok horizontal bulaş söz konusudur, perinatal bulaş % 10-20 oranında görülmektedir (52). Dünya nüfusunun % 43'ü orta endemisite ülkelerinde yaşamaktadır. Bu ülkelerde erişkinlerde HBV ile karşılaşma % 20-60 arasındadır. Enfeksiyon tüm yaş gruplarında, sıklıkla erişkin ve adolesanlarda oluşur ve bu nedenle akut enfeksiyon görülür. Ek olarak kronik karaciğer hastalığı sıklığı da yüksektir. Erişkinlerdeki akut enfeksiyonlar risk gruplarında görülür. Kuzey Afrika ülkeleri, Ortadoğu ülkeleri, Türkiye'nin de içinde yer aldığı Akdeniz havzası, Doğu Avrupa ve Rusya orta endemisite ülkeleri arasında yer almaktadır (3).

3) Düşük endemisite ülkeleri: Toplumdaki HBsAg pozitifliği % 2'nin altındadır. Dünya nüfusunun % 12'si bu ülkelerde yaşamaktadır. ABD, Kuzey ve Batı Avrupa ülkeleri, Avustralya düşük endemisite ülkeleridir. Bu ülkelerde yaşam boyunca HBV ile karşılaşma riski % 20'den azdır. Enfeksiyonların çoğu erişkinlerde ve risk gruplarında görülür. ABD'de kronik HBV enfeksiyonu prevelansı % 0.35 ve HBV ile karşılaşma oranı % 5'dir. Akut HBV enfeksiyonu genellikle erişkinlerde görülmekle birlikte kronik enfeksiyonların üçte biri perinatal olarak veya erken çocuklukta kazanılmıştır (3).

Şekil 5. HBV'nün dünyadaki dağılımı (53)



2.9.2. Türkiye’de HBV enfeksiyonu

Orta endemisite ülkeleri arasında yer alan ülkemizde HBsAg pozitifliği % 1-14.3 arasında bildirilmiştir. İstanbul ve İzmir gibi Batı illerinde % 3-4.5 gibi daha düşük oranda HBsAg pozitifliği bildirilirken, Diyarbakır, Elazığ, Van gibi Güneydoğu ve Doğu Anadolu illerinden % 8-14.3 gibi yüksek oranlar bildirilmiştir (3).

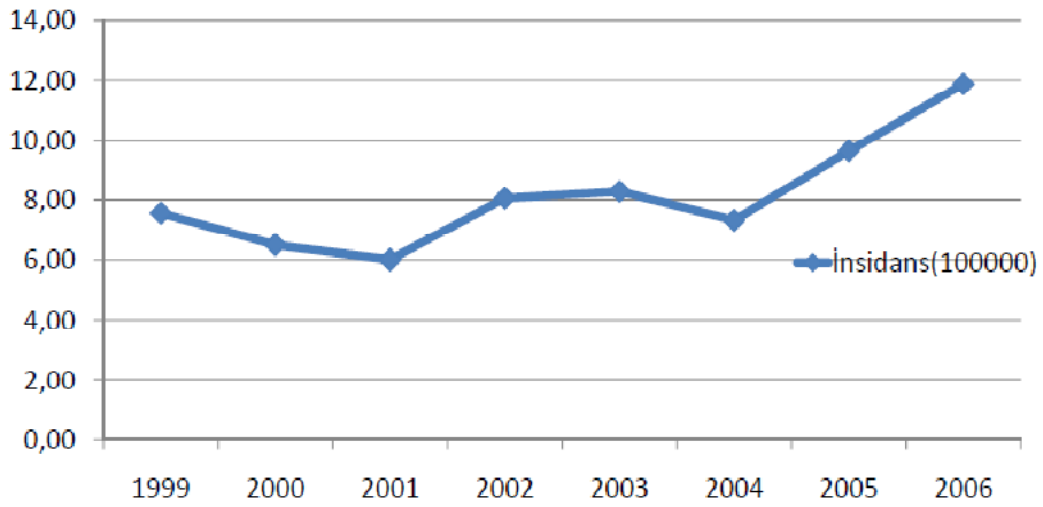
Türkiye’de 3.5 milyon insan HBV ile enfektedir. Bunlardan sadece 400 bini tedavi almakta geri kalan büyük miktardaki popülasyon ise kendisinin HBV ile enfekte olduğundan habersiz yaşamaktadır. Ülkemizde kronik hepatitlerin etyolojisinde HBV’nin % 56.4 oranında, karaciğer sirozunun ve HCC’un etyolojisinde ise sırasıyla % 45.9 ve % 42 oranında rol aldığı bildirilmiştir (52). Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgesinde HBV enfeksiyonu tek başına kronik karaciğer hastalıklarının % 54-80’inden sorumludur (54).

Ülkemizin değişik bölgelerinde kan vericilerinde yapılan çalışmalarda HBsAg pozitifliğini; Konya’da ortalama % 3.8, Isparta’da ortalama % 3.79, Van’da % 2.55, Erzurum’da % 1.8, Mersin’de % 2.6, Aydın’da % 1.85, Hatay’da % 2.02 olarak bildirmişlerdir (55). 2009 yılında Viral Hepatitle Savaş Derneği’nin yaptığı bir çalışmada

14 yaş üzeri, Türkiye'nin epidemiyolojik yapısını yansıtacak şekilde planlanan 32 ilden 50987 kişi taranmıştır. Çalışma sonunda % 1.9 HBsAg pozitifliği, % 9.1 anti-HBs pozitifliği bulunmuştur (55).

Van yöresinde 6-10 yaş arası çocuklarda yapılan bir çalışmada HBsAg seroprevelansı % 9.5 olarak bulunmuştur. Bu oran Türkiye ortalamasının üzerindedir (4).

Şekil 6. Türkiye 1999-2006 yılları arası HBV insidansı grafiği (DSÖ verisi) (57)



Tablo 4. Türkiye’de 2005-2009 yılları arasında Sağlık Bakanlığına yapılan akut HBV enfeksiyonu bildirimleri (58)

Yaş grupları	2005	2006	2007	2008	2009
0	39	18	9	10	10
1-4	156	88	77	74	38
5-9	344	220	214	136	113
10-14	408	302	268	207	172
15-19	779	555	488	399	502
20-29	3465	2039	2047	1829	1556
30-44	2523	2013	2085	1975	1722
45-64	1346	1119	1043	2953	870
65+	382	258	220	241	164
Toplam	8663	6612	6451	5849	3248

2.9.3.HBV bulaşma yolları

HBV tüm vücut sıvılarında bulunmaktadır. Enfeksiyonun bulaşma şekli virüs yükü, dış ortamdaki stabilitesi ve diğer faktörler dikkate alındığında % 3 ile % 30 gibi yüksek bulaştırıcılığa sahiptir (52). HBV'nin klasik olarak üç yoldan bulaştığı kabul edilir: kontamine kan ve kan ürünleri (perkütan bulaş), cinsel ilişki (seksüel bulaş) ve enfekte anneden yenidoğan bebeğine bulaş (perinatal bulaş). Ancak etkenin kan, semen, vaginal sekresyonlar dışındaki birçok başka biyolojik sıvıda da gösterilmiş olması (tükürük, ter, gözyaşı vs.) kısaca horizontal bulaş olarak adlandırılan ve henüz tam olarak kanıtlanmamış bulaş yollarının da varlığına işaret etmektedir. Nitekim akut B tipi viral hepatit olgularının bulaş yollarını saptamaya yönelik anket çalışmalarında, klasik bulaş yollarını tanımlamayan çok sayıda olgunun varlığı kanıtlanmıştır (59). HBV'nun bulaşmasında mevsim ve yaş faktörleri rol oynamaz. Enfeksiyonun yayılmasında su ve gıdaların önemi yoktur, çünkü fekal oral yolla HBV bulaşmaz. Oral yolla bulaşma ancak enfekte kanın hasarlanmış oral mukozaya temas etmesiyle gerçekleşebilir. Virüs geçişinde göz ve bütünlüğü bozulmuş deri de önemli rol oynar (60).

Kan ve kan ürünlerinde ELISA gibi duyarlı testlerle HBsAg taranmaya ve kan ihtiyacının karşılanmasında profesyoneller yerine gönüllü donörlerin kullanılmaya başlanmasından sonra transfüzyon aracılığıyla HBV'nun bulaşması çok azalmıştır. Nadir de olsa HBsAg negatif bulunan kanlarla da post transfüzyon hepatit B oluşabilmektedir. Bu duruma taramalarda kullanılan kitlerin duyarlılık farklılıkları yanında, HBsAg negatif enfeksiyöz HBV sağlıklı taşıyıcılarının varlığı neden olmaktadır. Pıhtılaşma faktör preparatları binlerce kişinin kanından oluşan plazma havuzlarından elde edilir. Bu tip preparatlar gösterilemeyecek kadar az olan HBsAg düzeyleri yüzünden bulaşma kaynağı olabilmektedirler. Sivrisinek ve tahtakurusu gibi kan emicilerin pasif olarak virüsü transfer ettikleri bilinmektedir. Ancak HBV bu gibi vektörlerin hücrelerinde replike olmadığından bu durumun epidemiyolojik önemi yoktur (60).

2.9.4. Korunma

Hepatit B aşısı konusundaki ilk çalışmalar 1971 yılında Krugman ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir; bu yıllarda HBsAg içeren enfektif serum örneklerinin bir dakika kadar kaynatılması ile hazırlanan inokulumun kısmen de olsa koruyucu olduğunun gösterilmesi, daha sonra geliştirilecek plazma aşılarının temelini oluşturmuştur. 1982 yılında ABD ve Fransa'da ticari olarak üretilmeye başlayan bu tür aşılar tüm dünyada milyonlarca insana uygulanmış olup, birinci jenerasyon aşılar olarak tanımlanan plazma aşılarının güvenilir ve etkili olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Ancak 1980'li yıllar, AIDS'in gündeme geldiği ve bu nedenle kronik asemptomatik HBsAg taşıyıcılarının plazmalarından elde edilen bir havuzdan hazırlanan bu aşıların güvenilirliğinin tartışılmaya başlandığı dönemdir; sonuçta toplanan plazmaların herhangi bir enfeksiyon hastalığının kaynağı olma olasılığı bulunabileceği öne sürüldüğünden ve üretici firmaların gerekli plazmaları bulma sorunu yaşamaları nedeniyle, 1980'li yılların ortalarında rekombinan DNA teknolojisinin aşı hazırlanışında gündeme geldiği görülmüştür. Bu yeni dönemde mayada (*Saccharomyces cerevisiae*) yada memeli hücrelerinde (Çin Hamsteri over hücreleri) HBsAg ekspresyonu gerçekleştirilerek canlı virüs partikülü içermeyen ikinci jenerasyon aşılar hazırlanmıştır. Hepatit B aşısının bu yeni şeklinin güvenilir, immünojen ve koruyucu olduğunun gösterilmesinden sonra, özellikle yenidoğanlarda universal aşılama programlarına geçilmesi gündeme gelmiş ve ilk kez 1991 yılında İtalya'da uygulama başlanmıştır (59). Günümüzde kullanılmakta olan rekombinant aşıların büyük bölümü, HBsAg'nin majör proteinini (S proteini) içerirken, bir kısmı ilave olarak Pre-S1/Pre-S2 proteinlerini de taşımaktadır (5).

1996-1998 yılında, DSÖ'nün önerileri ve VHSD'nin raporları doğrultusunda, TC. Sağlık Bakanlığı aşılarının rutin kullanımını gündeme getirmiş; yapılan çalışmalar sonucunda, TC. Sağlık Bakanlığı, hepatit B aşılması konusunda ilk olarak 04.06.1998 tarihinde 6856 sayılı genelge ile 0 yaş grubu ve tüm risk gruplarına ücretsiz aşı uygulamasına geçmiştir. Bu genelgede aşının öncelikle 0 yaş grubuna uygulaması öngörülmüş ve kullanılacak takvimin üçlü şema olup, başlangıç dozundan bir ay sonra ikinci doz, ikinci dozdan beş ay sonra üçüncü dozun kullanımı önerilmiştir (59). Çocuklar ve sağlıklı genç yetişkinlerde programına uygun yapılan aşı, % 90-100'e varan oranlarda yüksek serolojik koruyuculuk oluşturur (anti-HBV > 10 mIU/ml). Halen kullanılmakta

olan hepatit B aşıları ile elde edilen bağışıklık yanıtı, tipik olarak, hemodiyaliz hastalarında, sağlıklı bireylere göre daha düşüktür. Hastalığa ve yaşa bağlı olarak bağışıklık yanıtının bozulmasının yanı sıra, daha düşük yanıt oluşumuna yatkınlık yaratan etmenler arasında obezite, yetersiz ve kötü beslenme, sigara kullanma ve önceden hepatit C virüs enfeksiyonu öyküsü yer alır (61).

2.10. Patogenez

HBV'nin hepatosite girişi, replikasyonu ve temizlenmesi henüz tam olarak anlaşılamamıştır. HBV'ye bağlı hasar ve HBV'nin temizlenmesi immün sistem ile ilgilidir. Enfekte hepatositlerin immün lizisi sonucu hepatit oluşmaktadır (10).

Normal immün yanıtı olan kişilerde HBV enfeksiyonunu takiben hepatosite giren HBV'nin immün sistem tarafından tanınması gerekir. Virüsle temasdan sonra hepatositte salınan IFN alfa ve gama MHC Klas I ve II'yi uyarır. MHC Klas I, HBV'nin hücre içindeki antijenik işaretlerini hepatosit yüzeyinde CD8+ T hücrelerine (CTL) tanıtır. Daha sonra Fas ligand, sitokinler ve perforinler aracılığı ile enfekte hepatosit apoptozise uğrattırılır ve yok edilir. MHC Klas II ise, HBV'nin plazmadaki HBcAg ve HBeAg gibi antijenik işaretlerini makrofajlar üzerindeki CD4+ T hücrelerine (T helper) sunar ve onları hassas hale getirir. CD4+ T lenfositlerinden IL-2, 4, 6, 10, TNF alfa ve IFN gama salgılanır. Bunlar aracılığı ile virüs elimine edilir. Ayrıca hem CTL'ler uyarılır hem de B hücreleri uyarılarak antikor cevabı sağlanır. Bu şekilde oluşan cevaba Th 1 cevabı denir. Taşıyıcılar ve kronik karaciğer hastalarında ise IFN yetersizliği, antijen sunumunda eksiklik, T lenfosit cevabında azalma sonucu immün cevap yeterince oluşamaz ve virüs vücuttan temizlenemez. Bu tip cevaba da Th 2 cevabı denir. Taşıyıcılar ve kronik karaciğer hastalarındaki yetersiz immün cevabın nedeni tam açık değildir. Sonuç olarak HBcAg/HBeAg spesifik Th1/Th2 tipinde immün cevap karaciğer hasarının seyri ve prognozunda önemli görülmektedir (10).

Virüs-konakçı ilişkisi, özellikle de virüs-spesifik T hücre cevabı, HBV enfeksiyon patogenez şiddetinde anahtar faktördür (62). Fulminan HBV enfeksiyonu olan hastalarda çok şiddetli bir immün yanıt oluşmakta hızlı bir viral klirens ölümcül karaciğer hasarı pahasına oluşmaktadır. Oysa immatür bir immün sisteme sahip yenidoğanda HBV

maruziyeti sıklıkla minimal akut karaciğer hasarına neden olmakta ancak bunun da bedeli % 90 dan fazla kronik enfeksiyon oluşmasıdır (63).

Diffüz enflamatuvar reaksiyon ile karakterize viral hepatit, hücre hasarı ve ölümü ile ilişkilidir. Yakın zamandaki yayınlara göre, HBV replikasyonu, genel olarak kabul edilen HBV non-sitopatik özelliğinden farklı olarak hücre ölümü ile ilişkilendirilmiştir. Hücre hasarı mekanizması genellikle viral enfeksiyona verilen sitotoksik T lenfosit aracılı immün cevabın bir sonucu olarak tanımlanmıştır (64). Akut hepatit B enfeksiyonunun kuluçka döneminde yakalanan 5 hastada HBV spesifik T hücre cevabından önce doğal öldürücü hücrelerin (NK) aktif olduğu gözlenmiştir. Kuluçka döneminde HBV'ye özgü CD8+ ve CD4+ T hücrelerinin varlığı bu hücrelerin enfeksiyonun kontrolünde ve karaciğer hasarının başlatılmasında önemli rol oynadığını düşündürmektedir. Serum alanin aminotransferaz düzeylerinin pik yapmasından önce HBV DNA düzeylerinde maksimum düzeyde azalma gözlenmesi virüs kontrolünün sitolitik mekanizmalar kadar sitolitik olmayan mekanizmalar tarafından da gerçekleştirildiği izlenimini vermektedir (65).

Diğer hücre ölümüne neden olan tipik süreç ise apoptozisdir. HBx ve HBsP (Hepatitis B spliced protein) gibi HBV proteinlerinin apoptozisi indüklediği gösterilmiştir. Dikkatli ışık mikroskopu incelemesi ile, HBV genotip A ve C ile transfeksiyona uğramış hücrelerin, apoptotik işaretler olan ortaya toparlanması ve hücre ölümü gösterilebilmektedir (64).

HBV enfeksiyonunun progresyonu ile konağın immunogenetik yapısı arasındaki ilişki üzerinde durulmaktadır. HLA-B8, HLA-B44 ve HLA-DR7 gibi haplotiplerde anti-HBs yanıtı düşük bulunurken HLA-DR6 alelinin persistansa karşı koruduğu gösterilmiştir (66).

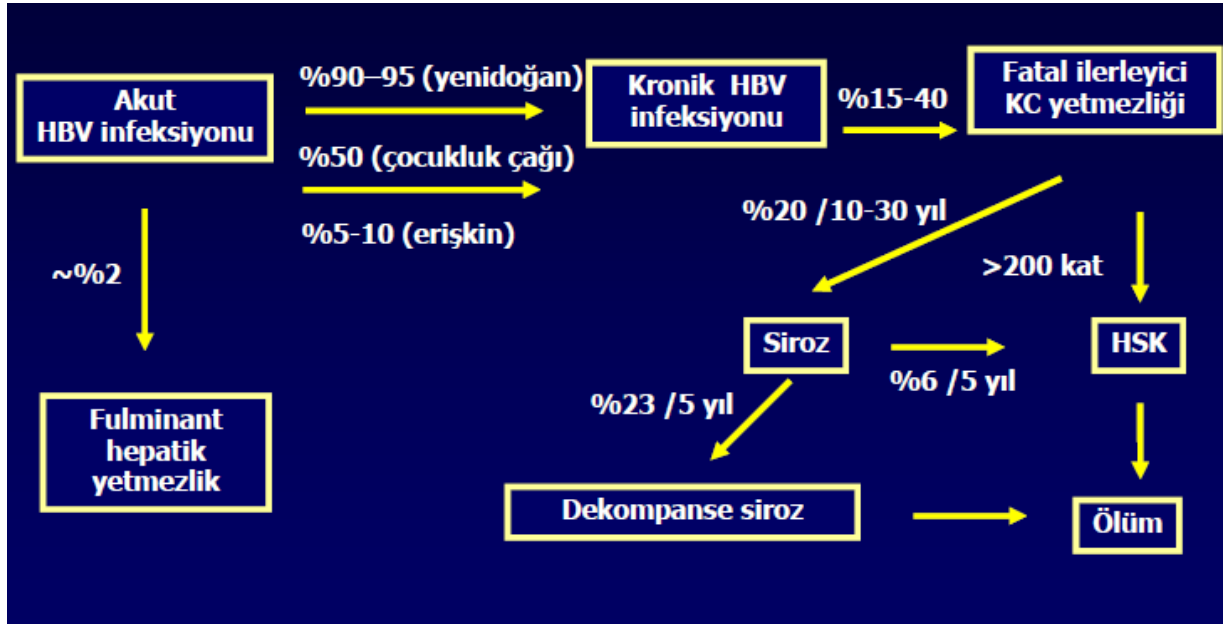
Akut hepatit B enfeksiyonu geçirip iyileşenlerde HBV'nin karaciğerden tamamen temizlendiği düşünülmekte idi. Ancak, viral antijen, antikor ve spesifik sitotoksik T hücrelerin kaybolmasına karşın yüksek duyarlılıklı HBV DNA ölçüm yöntemlerinin geliştirilmesi neticesinde akut HBV'nin klinik iyileşmesinden 10 yıl sonra dahi serum veya karaciğerde HBV genom izleri saptanmıştır. Akut hepatit B geçirip iyileşmiş, daha sonra immünsüpresif veya kanser tedavisi almış bir çok hastada HBV reaktivasyonu bildirilmiştir. Bu gözlemler akut enfeksiyondan sonra HBV'nin nadiren vücuttan tamamen eradike edildiğini göstermektedir (65).

2.11. Klinik

Hepatit B, değişik klinik özelliklere sahip karaciğerin viral enfeksiyonudur (8). HBV enfeksiyonunun klinik spektrumu, hem akut hem de kronik hastalıkta değişiklikler göstermektedir (63).

HBV enfeksiyon süreleri farklı 4 evreye ayrılır. Birinci evre, herhangi bir immün cevabın oluşmadığı akut viral replikasyon dönemidir. İkinci evre, virüse karşı oluşan immün cevabın enflamasyon ve hepatik doku hasarına neden olan dönemdir ve bu dönemde sıklıkla semptomatik hepatit görülür. Hastalar enflamatuvar enfeksiyon döneminde de asemptomatik olabilir. Üçüncü evre sırasında virüsle enfekte hücreler temizlenir ve HBeAg saptanamaz hale gelir. Bununla birlikte HBsAg varlığı devam eder. Dördüncü evrede HBV'ye karşı tam bağışıklık gelişir ve HBsAg temizlenir. Evre 1 ve 2'nin ileri dönemine geçemeyen enfekte hastalar kronik HBV taşıyıcısı olurlar ve/veya hepatosellüler kanser (HCC) gelişimi açısından yüksek risk taşırlar (8).

Şekil 7. HBV enfeksiyonu seyri (53)



2.11.1. Akut hepatit B enfeksiyonu

Akut HBV enfeksiyonunun inkübasyon zamanı 6 hafta ile 6 ay arasında değişmektedir. Bu dönem hastalığın 1. evresine karşılık gelmektedir. Inkübasyon zamanı, hastanın yüksek viral inokulumla karşılaştığında veya perkütan yolla enfekte olduğunda kısalır. Temasdan sonra HBsAg için spesifik yüksek titreli antikor uygulanımı (HBİg), inkübasyon zamanını uzatır ve enfeksiyonu engelleyebilir (8).

Akut HBV enfeksiyonunun klinik seyir ve sonuçları özellikle enfeksiyonun alındığı yaşla ilişkilidir. Neonatal veya erken yaşta alındığında kronikleşme fazla olmakta, ancak hastalık genellikle subklinik (asemptomatik, anikterik) geçirilmekte, erişkin yaşta alındığında ise kronikleşme oranı azalmakta ancak semptomatik (ikterik) geçirme oranı artmaktadır (63). Enfekte yenidoğanların hemen tamamı asemptomatiktir (8). Akut HBV enfeksiyonunun yaklaşık % 95'i 2-3 ay içinde klinik iyileşme ile seyretmektedir. Yaklaşık 4-10 haftalık bir inkübasyon dönemini takiben HBsAg serumda ölçülebilir hale gelmekte ve hemen ardından anti-HBc IgM de müsbet hale gelmektedir. Bu dönemde HBV DNA seviyeleri oldukça yüksektir (63).

Yetişkinlerde akut hepatit B'nin klinik seyri, genel tabloya benzese de, akut hepatit A yada hepatit C'den daha ciddi olmaya eğilimlidir. Tipik belirtileri halsizlik, yorgunluk, iştahsızlık, bulantı, kusma olup sağ üst kadranda hafif künt bir ağrı eşlik edebilir. Hepatit A'da olduğu kadar sık olmamakla birlikte diyare ve ateş görülebilir. Ek olarak hastaların % 10-15'inde prodrom döneminde ateş, eritematöz makülopapüler deri döküntüsü, artralji, ender olarak da artrit ile karakterize "serum hastalığına benzer sendrom" olarak adlandırılan tablo, HBV'ye bağlı olarak gelişen immünkompleks ile ilişkilidir. Preikterik dönemdeki bu semptom ve belirtiler genellikle 2-7 gün sürer, sarılığın ortaya çıkması ile hızla geriler (66). Bu sarılığı ise koyu renkli idrar takip eder. Sarılığın ortaya çıkması ile ikterik dönem başlar. Bu dönemde belirtiler, ilerleyebilir, değişmeden kalabilir yada hızlıca düzelebilir. Sarılığın başlaması ile hastalar genellikle kendilerini daha iyi hissederler, semptomlar geriler, ateş düşer. Sarılığın süresi ortalama 1-3 haftadır, ender olarak dört haftayı geçer. Akut hepatit B'de kan sayımı değerleri sıklıkla normaldir. Hemoglobin ve hematokrit değerleri orta derecede azalmış olabilir. Lökosit sayısı normal, lökopeni, granülositopeni ve rölatif lenfositoz olabilir. Total serum bilirubini genellikle % 10 mg'ı geçmez. Akut viral hepatitin esas göstergesi serum aminotransaminaz

aktivitelerindeki hızlı yükseliştir; viral hepatitin prodrom döneminde yükselmeye başlar, ikterin çıktığı dönemde belirtilerin yaklaşık birinci haftasında tepe yaparlar. Normalin 20-50 katına kadar yükselebilirler. Karaciğer hasarını esas gösteren alanin aminotransaminazdır (ALT). Serum alkalen fosfataz seviyesi normal yada hafif yükselmiştir. Albümin ve globülin konsantrasyonu genellikle normaldir. Akut viral hepatitlerde protrombin zamanı normaldir. Protrombin zamanının artması prognozun ciddiyetini gösterir ve fulminan karaciğer yetmezliği gelişmesi açısından değerlendirilmelidir (66).

İyileşen enfeksiyonda çoğu hasta ömür boyu bağışıklık kazanırken hastalığın ciddiyeti altta yatan karaciğer hastalığı veya diğer hepatit virüsleriyle ko-enfeksiyon durumunda artmaktadır. HBV ile enfekte olan olguların (yaşa göre değişmekle birlikte) yaklaşık % 0.5'inde fulminan hepatit gelişmektedir (63). Bulgular bu hastaların HBV enfeksiyonuna karşı enfekte hepatositlerin, masif nekrozu ile sonuçlanan aşırı güçlü immün yanıtı sahip olduklarını düşündürmektedir (8). Nasıl olupta bir kısım hastada bu derecede yüksek immün yanıtın oluşup, bu ileri derecede ölümcül tablonun oluştuğu net değildir (63). HbcAg'ye karşı oluşan bu immün cevap hemen hemen her zaman pozitifdir. Bununla birlikte HBsAg ve HBeAg her zaman ölçülemez (8). Bazı çalışmalarda akut karaciğer yetmezlikleri içinde genotip D oranının diğer HBV genotiplerinden daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Uyuşturucu kullananlarda görülen bir salgın sırasında fulminant gidiş için risk faktörleri; Asetaminofen, alkol, methamphetamine kullanımı ve hastalık öncesi 6 ayda anlamlı kilo kaybı olarak bildirilmiştir (63). Fulminan hepatit tipik olarak ani ateş, karın ağrısı, kusma ve sarılık ile belirgin başlar, bunu disoryantasyon, konfüzyon ve koma izlemektedir. HBsAg ve HBV DNA seviyeleri karaciğer yetmezliği gelişimi ile hızla düşmekte ve bazı hastalarda hepatik koma sırasında HBsAg negatif olabilmektedir (24).

2.11.2. Kronik hepatit B enfeksiyonu

HBsAg, HBeAg ve HBV DNA'nın 6 ay geçmesine rağmen yüksek titrede seyretmeleri enfeksiyonun kronikleşeceğine işaret etmektedir. Ancak kronikleşme için en iyi tanımlanmış risk enfeksiyonun alındığı sıradaki yaşıdır. Yaşa ek olarak annenin HBeAg/anti-Hbe durumu da vertikal alınan HBV enfeksiyonunun doğal seyrini

etkilemektedir. Kronik HBV enfeksiyonunun doğal gidişi virüs-konak etkileşimine göre immün tolerans dönemi, immün temizlenme dönemi, inaktif dönem ve reaktivasyon dönemi olarak dört ayrı dönemde incelenebilir (67).

Kronik hepatit B değişken ve dinamik bir seyire sahiptir. Erken enfeksiyon sırasında, HBeAg, HBsAg ve HBV DNA yüksek titrelerde bulunurken, serum aminotransferaz seviyesinde düşükden ortaya kadar değişen yükselmeler görülebilir. Zamanla, HBeAg ve HBV DNA yüksek seviyelerinin devam etmesi ile (immün tolerans faz) veya HBeAg'nin kaybolması ve HBV DNA'nın saptanamayacak seviyelere düşmesi (inaktif taşıyıcılık) ile hastalığın aktivitesi hakkında karar verilebilir. Kronik hepatit hastalarının genel prognozu hastalığın şiddeti ile direkt ilişkilidir. Ağır kronik hepatit ve sirozlu hastalarda, 5 yıllık sağkalım süresi % 50 civarındadır. Kronik hepatit kanıtı olan hastaların (yükselmiş ALT ve karaciğer biyopsisinde enflamasyon ve/veya fibrozis) çoğu asemptomatiktir veya yorgunluk ve sağ üst kadranda rahatsızlık hissi gibi nonspesifik semptomlara sahiptirler. Daha ağır hastalığa sahip veya siroz hastaları sarılık gibi önemli yapısal semptomlara ve spider anjioma, palmar eritem, splenomegali, jinekomasti ve fetor hepaticus gibi son dönem karaciğer hastalığının periferik izlerine sahiptirler. Asit, periferik ödem, ensefalopati ve gastrointestinal kanama, çok ilerlemiş siroz hastalarında görülebilir. ALT ve AST sık sık yükselebilir, fakat karaciğer hastalığının şiddeti ile ilişkili değildir. Bilirubin, protrombin zamanı ve albumin sıklıkla ilerleyici hastalık ile anormalleşir. Düşük trombosit sayısı genelde kötü prognozün işareti (24).

Kronik hepatit B (KHB) olguları, HBeAg varlığına göre iki şekilde gözlemlenmektedir.

1) HBeAg pozitif KHB: Anti-HBe serokonversiyonu gelişmemiş KHB de denir. Genelde hayatın 3. ve 4. dekadında görülür ve hastaların çoğu erkektir. HBV DNA bu hastalarda oldukça yüksek olup 2 milyar IU/ml düzeyine kadar çıkabilir. Hastalık uzayıp sirozla sonuçlanabileceği gibi, hastaların % 65'inde HBeAg'nin anti-HBe'ye serokonversiyonu gerçekleşir. Spontan HBeAg serokonversiyonunu kolaylaştıran faktörler; ileri yaş, yüksek ALT düzeyleri, B ve A genotipleri ve Asya'lı olmaktır.

2) HBeAg negatif KHB: 12 aydan daha fazla süreyle HBeAg negatif, anti-HBe pozitif saptanan KHB de denir. HBeAg serokonversiyonundan sonra persistan HBV replikasyonu yada HBV reaktivasyonu HBeAg negatif kronik hepatite yol açar. En önemli nedeni prekor stop kodon mutasyonudur ve sonucunda HBeAg sentezlenememektedir.

Kor promoter bölgesindeki mutasyonlar HBeAg sentezini azaltırlar. HBeAg negatif KHB'li hastalar genellikle HBeAg pozitif hastalardan daha ileri yaştadır ve ilk başvurularında siroz görülme ihtimali daha fazladır. Bu hastaların serum HBV DNA düzeyleri HBeAg pozitif hastalardan daha düşük düzeydedir. Bununla birlikte bu hastalarda HBV DNA ve ALT düzeylerinde oldukça fazla dalgalanma görülür (65).

2.11.3. İnaktif HBsAg taşıyıcılığı

2000 yılında yapılan “National Institutes of Health” uzlaşısı toplantısında HBV enfeksiyonu için kullanılan klinik terimler ve bu terimlerin tanısal ölçütleri yeniden gözden geçirilmiş ve asemptomatik HBsAg taşıyıcılığı veya sağlıklı HBsAg taşıyıcılığı terminolojisi yerine “inaktif HBsAg taşıyıcılığı” kullanılmıştır. İnaktif HBsAg taşıyıcılığı tanı ölçütleri şunlardır:

- HBsAg pozitifliği > 6 ay
- HBeAg negatif, anti-HBe pozitif
- Serum HBV DNA düzeyinin < 10.000 kopya/mL olması
- Serum transaminaz (ALT, AST) düzeylerinin sürekli olarak normal seyretmesi
- Karaciğer biyopsisinde önemli hepatit bulgularının olmaması (68).

2.11.4. Okült (gizli) HBV enfeksiyonu

Gizli hepatit B enfeksiyonu HBsAg'si (-) olan bireylerde, kan yada dokularda HBV DNA'nın (+) olması durumu olarak tanımlanmıştır. Bu kişilerde anti-HBc yada anti-HBs (+) yada (-) olabilir (69). Gizli HBV durumu, bazı vakalarda HBsAg testleri ile saptanamayan mutant virüsler ile ilişkilendirilmiş olsa da, daha çok viral replikasyonun ve gen ekspresyonunun güçlü baskısına bağlıdır. Gizli HBV enfeksiyonunun, dünya çapında yayılımı kendine özgüdür çünkü değişik kategorideki bireylerdeki prevalans verileri çelişkilidir, bu da bir çok çalışmada saptamada farklı sensitivite ve spesifitedeki metodların kullanılmasına bağlıdır. Gizli HBV, kan transfüzyonu veya organ transplantasyonu ile enfeksiyonun geçişi ve immünsupresyon durumunda akut reaktivasyon oluşumu gibi farklı

klirik durumlarda 6nemli olabilir. Ayrıca 6ok fazla sayıda kanıt g6stermektedir ki; karaciğer fibrozisi ilerlemesi ve her Őeyden 6nce HCC gelişimi lehine olabilir (70).

2.11.5. Hepatosell6ler karsinom (HCC)

T6m d6nyada, HBV enfeksiyonları HCC oluŐmasındaki en sık etkindir. D6nya 6apındaki HCC vakalarının % 50'den fazlası ve HBV'nin 6ok y6ksek oranda endemik olduğu alanlardaki HCC vakalarının % 70-80'i HBV'ye bağlanmıştır. HCC i6in artmış risk ile ilişkili fakt6rler demografik fakt6rler (erkek cinsiyet ve ileri yaş), yaşam Şekli (aşırı alkol t6ketimi ve sigara), viral fakt6rler (genotip C, D, F, y6ksek HBV DNA d6zeyleri, kor/prekor mutasyonları) ve klinik fakt6rlerdir (siroz, y6ksek AFP ve ALT). HBV ile ilişkili HCC, ortalama 16 aydan az yaşam s6resi ile son derece k6t6 bir prognoza sahiptir. HBsAg pozitif hastalardan alınan karaciğer t6m6r 6rneklerinin yaklaşık % 90'ında ve HBsAg negatif hasta 6rneklerinin 6ok az bir kısmında, h6cresel DNA'ya HBV DNA dizilerinin entegre olduğu bildirilmiŐtır. HBV DNA'nın h6cre DNA'sına entegrasyonu vir6s6n karaciğerde persistansına izin verir ve genetik değişiklikleri ind6kler. T6m6r h6crelerinin b6y6k b6l6m6nde hepatit B X geni kodlayan diziler ve zarf preS2 viral proteinleri bulunmuştur. HCC i6in 6nemli risk olarak bilinen kronik hepatit mekanizması, karaciğer h6cre nekrozu, enflamasyon, sitokin sentezi ve fibrozis ile ilişkilidir. Kronik HBV enfeksiyonu sırasında hızlı rejenerasyonun eşlik ettiği s6rekli hepatosit nekrozu, mutasyonların birikimine ve malign fenotipdeki h6crelerin se6ilmesine neden olabilir. HBV ile ilişkili HCC, tipik olarak enfeksiyondan 25-30 yıl sonra kronik enflamasyon ve tekrarlayan h6cre yenilenmesi nedeniyle oluşmaktadır (71). HCV ve HBV, HCC'ye neden olan başlıca etkenler olduğundan, bu enfeksiyonların tedavi edilmesi teorik olarak HCC geliŐmesini azaltacak olsa da, bu yaklaŐımın ger6ek etkinliği bilinmemektedir (72).

2.12. Tanı

HBV enfeksiyonu tanısı ve doğal seyrinin belirlenmesi primer olarak serolojik ve biyokimyasal parametreler (serum transaminazları) ile yapılmaktadır. Serolojik

parametreler, virüsün genetik materyalinin kodlamış olduğu viral antijenler; HBsAg, HBeAg, konağın immün yanıt olarak geliştirdiği spesifik antikorlar; anti-HBs, anti-HBe, anti-HBc IgM ve IgG'dir. HBV enfeksiyonunun, kesin tanısı serumda HBsAg'nin saptanması ile konmaktadır. HBV DNA'nın tespiti ve kantifikasyonu ise tedavi ve hastalık seyrinin değerlendirilmesinde kilit rol oynamaktadır. Ayrıca diğer belirleyici bulguların yetersiz kaldığı özel durumlarda asıl tanı koydurucu görevi üstlenmektedir (14).

2.12.1. Serolojik tanı

HBV enfeksiyonunun spesifik tanısı için standart algoritma halen primer olarak serolojik testlere dayanmaktadır. HBV antijenleri ve HBV antikorlarının insan serumunda taranması için en rasyonel ve maddi olarak uygun yaklaşım ELİSA testlerinin kullanılmasıdır. İlk aşamada HBsAg ve anti-HBc total test edilmesi, pozitif bulunduğu durumda anti-HBc IgM, anti-HBs, HBeAg ve anti-HBe bakılması önerilir (6).

Bu yöntemle kanda 0.25-0.5 ng/ml HBsAg ve 1 IU/mL anti-HBs saptanabilir. Bu deneylerin çalışma prensibi sandviç veya kompetitif bağlanma temeline dayalıdır. Viral HBcAg dolaşıma katılmadığı ve sadece hepatositler içinde bulunduğu için serolojik olarak saptanamamaktadır (3, 73). Ancak son zamanlarda HBcAg saptayan yeni bir ELISA testi kullanılmaktadır. HBcAg konsantrasyonu, HBV DNA düzeyi ile yakın uyum göstermekte ve konsantrasyon değişikliklerinde de paralellik devam etmektedir. Bu nedenle HBV enfeksiyonunun izlenmesinde basit bir yöntem olarak kullanılabilmesi bildirilmiştir (74). Bu antijenlere karşı gelişen antikorlarda yine ticari kitler kullanılarak saptanabilir. Bu testler; HBV enfeksiyonunun akut ve kronik dönemlerinin ayrılmasında, enfektivitenin değerlendirilmesinde, immünitenin araştırılmasında ve kan ve organ vericilerinin taranmasında rutin olarak kullanılır (3,73).

Hepatit B enfeksiyonunda kullanılan serolojik göstergeler şunlardır:

1) HBsAg: Semptomların başlamasından 3-5 hafta önce kanda gözükmekte, aşıkâr hastalık sırasında pik yapmakta ve 4-6 hafta sonra düşmektedir. Akut enfeksiyondan sonra HBsAg'nin 6 aydan daha uzun süre pozitif kalması kronik enfeksiyonu düşündürür. Fulminan seyreden hepatitlerde HBsAg kandan hızla temizlenir ve virüsün üreyebileceği

hepatosit kalmamış olması nedeni ile kanda saptanamayabilir. Çocuklarda HBV aşılmasını izleyerek kanda geçici olarak HBsAg pozitifliği saptanabilir (3,60).

2) HBeAg: Aktif viral replikasyonu işaret eder. HBeAg ile HBV DNA ve DNA polimeraz arasında önemli bir ilişki vardır (50). HBsAg'den kısa bir süre sonra pozitifleşir, 10 haftadan daha uzun süre devam etmesi enfeksiyonun kronikleşeceğinin belirtisidir. HBeAg, HBsAg negatif iken saptanamaz (3).

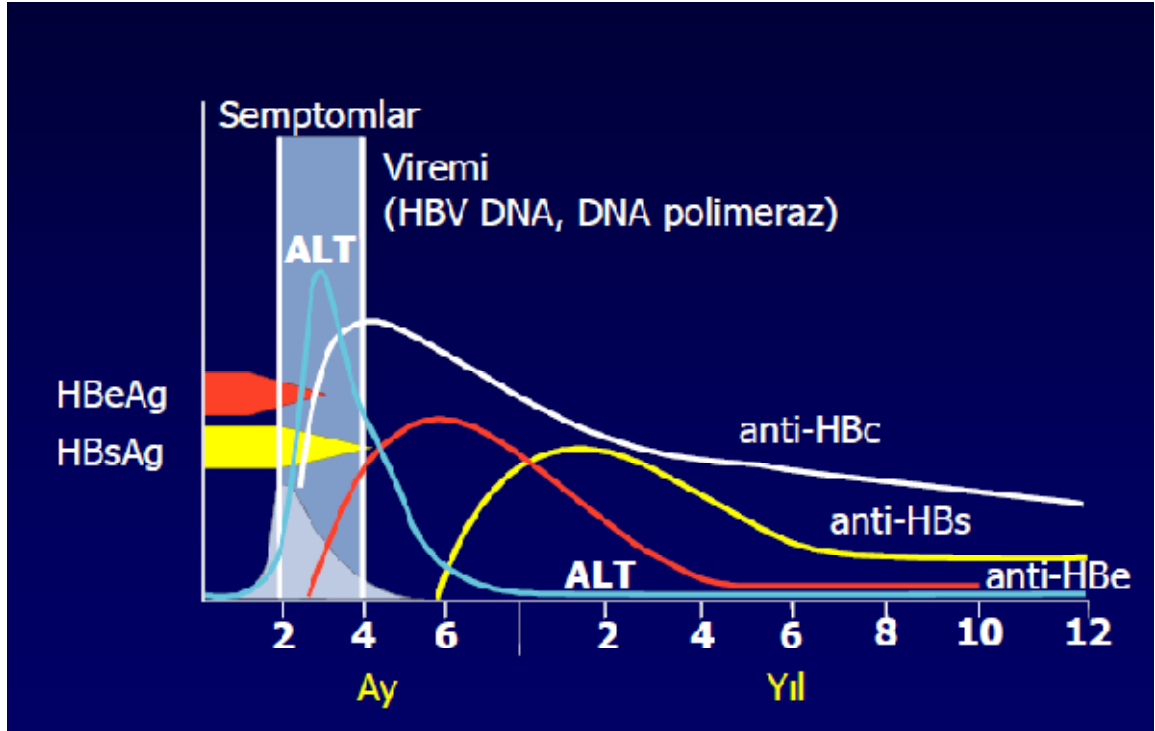
3) Anti-HBc IgM ve IgG: Semptomların başlamasından sonra kısa süreli olarak serum transaminazları ve HBsAg ve HBeAg ile birlikte serumda Anti-HBc IgM saptanabilir. IgM birkaç ay pozitif kalır ve hastalığın başlangıcından 4-8 ay sonra serumda tespit edilemez. HBsAg'nin serumdan kaybolup anti-HBs gelişinceye kadar geçen pencere döneminde anti-HBc IgM'in varlığı akut enfeksiyonu gösteren en önemli markerdir. Takip eden aylar içerisinde, IgM anti-HBc IgG ile yer değiştirir. Anti-HBc IgM'in sebat etmesi hastalığın kronikleşeceğinin işaretidir. Anti-HBc IgM kronik HBV enfeksiyonunda düşük titrede bulunur. HBV'ne maruz kalanlarda Anti-HBc IgG yıllarca veya hayat boyu pozitif kalabilir. HBsAg taşıyıcılarında anti-HBc IgG yüksek titrede bulunur. Anti-HBs ile birlikte anti-HBc IgG'nin düşük titrelerde bulunması hepatit B enfeksiyonunun çok eskiden geçirildiğini gösterir (3, 50, 60).

4) Anti-HBe: HBeAg'nin düşüşü ardından serumda kısa sürede saptanabilir. Bazı olgularda, çok kısa bir dönem HBeAg ile birlikte bulunabilir. Akut hastalığın pik yaptığını ve hastalığın remisyona yakın olduğunu gösterir ve 20 hafta sonra titresini düşer. Anti-HBe genellikle akut enfeksiyondan yıllar sonra kaybolur. Kronik HBV enfeksiyonunda tedavi ile HbeAg'nin kaybolması ve Hbe antikorlarının oluşması hedeflenmektedir. Bu nedenle anti-HBe, tedavi izleminde önemli bir göstergedir (3, 50).

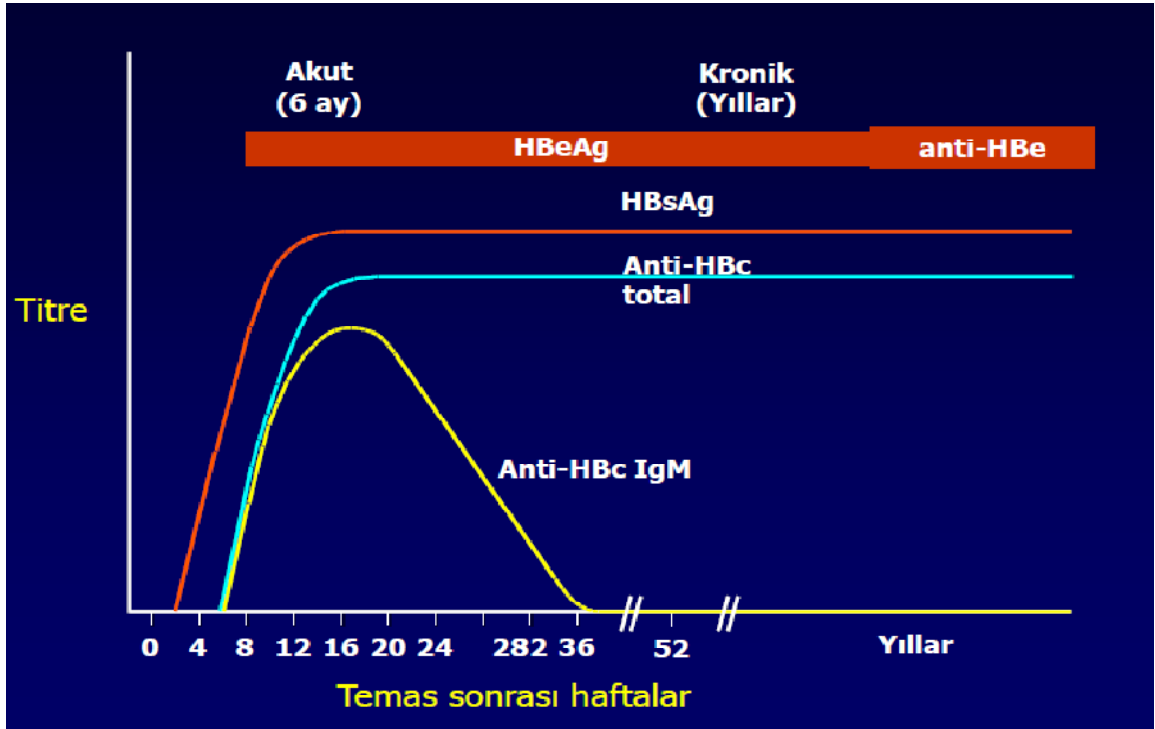
5) Anti-HBs: Akut enfeksiyon sona ermeden düzeyinde düşüş olmaz ve tüm hayat boyu immüniteyi göstererek devam eder. Virüsü nötralize edebilme yeteneğinde olan antikorlardır. HBV aşılmasından sonra da anti-HBs antikorları gelişir, bu durumda anti-HBc antikorları negatiftir (3, 50, 60).

Ancak bazı durumlarda anti-HBe pozitif olmasına rağmen HBV DNA'nın pozitif olması mutant bir HBV enfeksiyonunu gösterir. Mutant suşların kaçırılması tanıda sorunlar yaratabilir. Bu bakımdan mutant suşları yakalayan HBsAg kitlerinin kullanılması önerilmektedir (73).

Şekil 8. Akut Hepatit B enfeksiyonu serolojisi (53)



Şekil 9. Kronik Hepatit B enfeksiyonu serolojisi (53)



Tablo 5. Viral hepatit B’de klinik ile serolojik belirleyicilerinin ilişkisi

	HBsAg	Anti-HBs	HBeAg	Anti-HBe	Anti-HBc IgM	Anti-HBc total	HBV DNA
Akut enfeksiyon	+	-	+/-	-	+		+
İyileşmiş enfeksiyon	-	+	-	+	-	+	-
Sağlıklı taşıyıcı	+	-	-	+	-	+	-
Kronik enfeksiyon	+	-	+	-	+/-	+	+
Aşılama	-	+	-	-	-	-	-
Gizli HBV enfeksiyonu	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+
Prekor stop mutasyonu	+	-	-	+	+/-	+	($<10^4$)

2.12.2. Hücre kültürü ve hayvan modelleri

Sağlıklı erişkin veya fetal insan hepatositlerinin primer kültüründeki HBV büyümesi gösterilmesine rağmen, uzun bir dönemde seri üretim başılamamıştır. Bundan dolayı tanı testi olarak HBV kültürü yapılamamaktadır (8).

Hayvan modellerinin viral inaktivasyon, aşı güvenliği ve etkinliği, dezenfeksiyon kinetiği, enfektivite belirteçleri, immünopatoloji ve seroepidemiolojik araştırma çalışmalarında önemli bir rolü bulunmaktadır. HBV ile deneysel enfeksiyona yüksek oranda duyarlı olduklarından, çoğu şempanze ve diğer yüksek seviye primatlar kullanılmıştır. Hastalığın ılımlı seyretmesi dışında, enfeksiyon insanlardaki enfeksiyona benzemektedir (8).

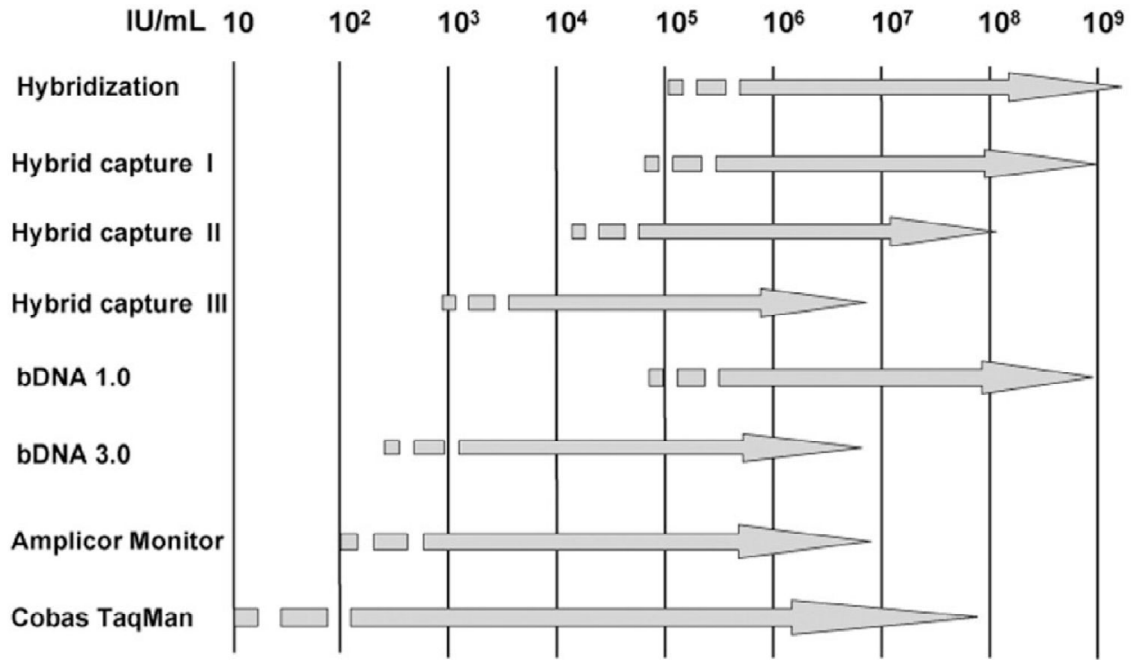
2.12.3. Viral nükleik asitlerin saptanması

HBV DNA’nın belli bir bölgesini gösteren moleküler testler; replikatif bir virüs enfeksiyonunu göstermesi yanında kantitasyonu ile de hem tedavi kararında hem de tedavinin izlenilmesinde kullanılmaktadır. Bunlar içinde ilk olarak hibridizasyon testleri

kullanıma girdi. Bu testlerin duyarlılığı 10^4 kopya/mL sınırında iken son 20 yılda hızla gelişen PCR teknolojisi ile duyarlılık 200-400 kopya/mL'ye kadar arttırıldı. Ancak deneyler arası moleküler testler arasındaki korelasyon zayıftır ve halen tartışılmaktadır. WHO HBV kantitasyon biriminin uluslararası standardını tanımlamış ve ileriki yıllarda IU olarak bütün ticari kitlerde kullanılmasını öngörmüştür (7). Gelişmiş laboratuvarlarda çoğu kez araştırma ve/veya sağaltımın izlenmesi amacıyla yönelik olarak insan serum ve dokularında HBV DNA dot blot hibridizasyon (Digene Hybrid Capture), insan serumunda kantitatif HBV DNA sıvı faz hibridizasyon yöntemleri ile saptanabilmektedir. Ancak düşük DNA ve RNA seviyelerini tespit edemedikleri için kronik hepatitlerin tanısında kullanılmalarından vazgeçilmiştir. Yine insan serumunda HBV DNA, dallanmış (branched) DNA sinyal amplifikasyon yöntemi ile kantitatif olarak saptanabilmektedir. Son zamanlarda serumda HBV DNA'yı kalitatif ve kantitatif olarak saptamaya yönelik çok duyarlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemleri geliştirilmiştir. Bugün kronik hepatitlerin tanısında dünya çapında Real Time PCR kullanılmaktadır. PCR yönteminde amaç, bir ortamda bulunabilecek çok az sayıdaki mikroorganizma nükleik asitlerinin sayıca çok fazla çoğaltılmaları ve daha kolay saptanmalarıdır. Burada; DNA'nın bir ipçığının, DNA polimeraz enziminin ve gerekli maddelerin bulunması halinde DNA'nın birçok karşıt zincir kopyalarını sentezletebilme özelliğinden yararlanılır. DNA zincirinin ayrılması ısıtılarak sağlanır. Bu yüzden ısıya dayanıklı DNA polimeraz enzimi kullanılır. Bu enzim termofil organizmalardan [*thermus aquaticus* (Taq enzimi) yada *thermus thermophilus* (Tth enzimi)] elde edilir. "Light Cycler" ve "Taqman" teknolojisine dayalı yeni real time testler geliştirilerek PCR testinin duyarlılığı artırılmıştır. Bu yöntemler sayesinde serumda 10 kopya HBV DNA/mL saptanabilmekte ve duyarlılık dot blot hibridizasyondan 100-1000 kez fazla olmaktadır (73).

Günümüzde HBV DNA kantitatif değerlendirilmesi için kullanılan testler PCR [COBAS Amplicor HBV monitor test (Roche Diagnostics, Indianapolis, Ind.) ve HBV SuperQuant (LabCorp, Burlington, N.C.)], sıvı faz hibridizasyon (Digene Hybrid CaptureII, Abbott ParkIII) ve bir sinyal amplifikasyon, dallanmış DNA testi olan [Versant HBV DNA (Bayer HealthCare, Tarrytown, N.Y.)] gibi hedef amplifikasyon yöntemleridir. LCx HBV DNA kantitatif testi (Abbott, USA), HBV DNA için transkripsiyon aracılı amplifikasyon testi (Bayer HealthCare), moleküler ışınım (Abbott, USA) ve bir çok microarray metodu gibi diğer bir çok yöntem geliştirilmektedir (8)

Şekil 10. Çeşitli sistemlerin HBV DNA saptama düzeyleri (24)



2.12.4. HBV DNA mutasyon testleri

HBV mutasyon testleri arasında ilaca spesifik direnç mutasyonların saptanması gelişen virolojik ve biyokimyasal alevlenme etyolojisinin doğrulanması bakımından pratikte önem arz etmektedir. Ayrıca bir çok yeni antiviral ajanın tedavi onayı alması nedeniyle bunlara karşı seçilen veya seçilecek mutasyonların tespiti, tedavi için ilaç seçeneklerinin kararında belirleyici olacaktır (14). İlaç direnci fenotipik veya sekans analizi ile gösterilebilir. Tüm testler avantaj ve dezavantajlara sahiptir. Direkt sekanslama bilinen ve potansiyel yeni direnç mutasyonlarını tanımlayabilmektedir. Fakat bu metod, düşük konsantrasyonlardaki gelişmekte olan mutantları tanımlayamaz (76). Günümüzde bilinen tüm fonksiyonel adefovir ve lamuvidin direnç mutasyonları, Innogenetics firmasının ürettiği mutasyonlara spesifik, oligonükleotid probların nitroselüloz membran üzerine blotlanması ve hedef diziye hibridizasyonu esasına dayanan INNO-LiPA (Line probe assay) HBV DR-2 kiti ile tespit edilmektedir (14).

Prekor ve kor promoter mutasyonlarının saptanması tedaviye yanıt kriteri olan HBeAg kaybının etyolojisinin açığa çıkarılmasında önem taşımaktadır. Bu mutasyonlar

LiPA testi ile hızlı ve güvenilir şekilde tespit edilebilmektedir (14). HBsAg mutantlarının saptanması için sekanslama, limitli dilusyonel klonlama PCR (LDC-PCR), gap ligaz zincir reaksiyonu (gLCR) ve RT-PCR gibi, değişik moleküler analiz yöntemleri geliştirilmiştir (77).

2.12.5. HBV DNA genotiplendirme testleri

HBV genotiplendirmede kullanılan metodlar; sekanslama ve filogenetik analiz, restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP), multipleks PCR, hibridizasyon ve antikor temelli subtip ve genotiplendirme. Özellikle sekanslama ve filogenetik analizde hedef bölgenin tamamen dizilenmesi yeni genotip ve varyantların saptanmasına olanak vermektedir. Ancak her iki yöntemin de pahalı ve zaman alıcı olması nedeniyle daha çok tek nükleotid değişikliklerine göre ayırıcı özelliğe sahip RFLP ve multipleks PCR kullanılmaktadır (14).

Tablo 6. Farklı genotiplendirme metodlarının avantaj ve dezavantajları (18)

Genotiplendirme metodu	Avantajları	Dezavantajları
Sekanslama ve filogenetik analiz	Çok fazla bilgiye dayalı olması nedeniyle en güvenilir metoddur. Yeni genotipleri veya rekombinasyonları tespit edebilen tek metoddur.	Filogenetik analiz zaman alıcıdır ve kompleks bilgisayar analizi programlarında tecrübe gerektirmektedir.
RFLP	Nispeten kolay uygulanabilir. Öncelikle PCR analizi gerektirmektedir.	Tek nükleotid değişimi bile analizi imkansız hale getirebilir.
Multipleks PCR	Uygulanışı hızlı ve kolaydır. Çifte enfeksiyonları saptamada üstün olduğu bildirilmiştir.	Tek nükleotid değişimi bile analizi imkansız hale getirebilir.
Antikorlar kullanarak genotiplendirme ve subtiplendirme	Ucuzdur. Uygulanması kolaydır ve geniş genotip dağılımı için çok kullanışlıdır. PCR amplifikasyonu gerekli değildir.	Tek nükleotid değişimi bile analizi imkansız hale getirebilir.
INNO-LiPA HBV genotiplendirme	Ticari kitleri vardır. Nispeten kolay uygulanabilir.	Pahalıdır, tek nükleotid farkı bağlanmayı ve hibridizasyon sonucunu etkileyebilir.

2.13. Tedavi

Akut hepatit B enfeksiyonunda, klinik bulgu veren olguların büyük bir kısmı hastaneye yatırılmadan izlenebilir. Akut HBV enfeksiyonunda özgün bir tedavi bulunmayıp semptomlara yönelik destek tedavisi yapılmalıdır. Hastalara istirahat önerilir. Diyet kısıtlamasına gerek yoktur (78).

Kronik hepatit B enfeksiyonunda kimler tedavi edilmelidir?

1) HBeAg pozitif hastalar: ALT seviyesi normalin iki katını aşan hastalar spontan HBeAg serokonversiyonu yönünden altı ay izlenir ve altı ay sonunda ALT hala yüksek, HBV DNA ≥ 20000 IU/mL (10 kopya/mL), karaciğer biyopsisinde nekroinflamatuvar aktivitesi ≥ 4 ve/veya fibroz ≥ 2 ise tedavi düşünülür. ALT seviyesi normal ile iki kat arasında olan hastalar 35-40 yaş üzerinde ise biyopsi yapılmalı ve nekroinflamatuvar aktivitesi ≥ 4 ve/veya fibroz ≥ 2 olanlar tedavi edilmelidir. ALT seviyesi normal olan olgularda 3-6 ayda bir ALT kontrolü, 6-12 ayda bir HBeAg kontrolü yapılır (78).

2) HBeAg negatif hastalar: HBeAg negatif, HBV DNA seviyesi ≥ 2000 IU/mL (10 kopya/mL), biyopside kronik hepatit bulunan ALT normal yada yüksek hastalar tedavi edilmelidir (78).

3) Siroz hastaları: Kompanse sirozu olan hastalar ALT düzeyinden bağımsız olarak, HBV DNA seviyesi ≥ 2000 IU/mL ise tedavi edilmelidir. Kompanse siroz hastalarında ALT yüksek ise diğer nedenler dışlandıktan sonra HBV DNA > 50 IU/mL ise tedavi edilmelidir. Dekompanse sirozu olan hastalar HBV DNA > 50 IU/mL ise tedavi edilmelidir (78).

Standart interferon alfa-2a ve 2b, pegile interferon alfa-2a ve 2b, lamivudin, adefovir, entekavir, tenofovir ve telbivudin ülkemizde mevcut olan ve kullanım onayı almış ilaçlardır. Pegile interferon alfa, entekavir ve tenofovir HBeAg pozitif ve HBeAg negatif olgularda ilk seçenek ilaçlardır. ALT düzeyi $> 3x$ ve HBV DNA $< 10^7$ IU/mL ise pegile interferon ve nükleoz(t)id tedavisine yanıt oranı yüksektir. ALT $< 2x$ ve HBV DNA $> 2 \times 10^7$ IU/mL ise pegile interferon tedavisine yanıt oranı düşüktür (78).

İnterferon Alfa: İmmunomodulator, antiviral ve antiproliferatif etkilere sahip olan sitokinlerdir (11). Çeşitli uyaranlara cevap olarak ökaryotik hücrelerden salınan, geniş bir biyolojik aktiviteye sahip potent sitokinlerdir. Alfa, beta, gama interferon olmak üzere üç tip interferon bulunur. Makrofaj, doğal öldürücü hücreler (NK) ve sitotoksik T hücre

aktivitelerini artırarak enfektif hücrelerin eliminasyonunu sağlarlar. Bu etkilerini özgül reseptörler aracılığıyla gösterirler (79).

Pegile İnterferonlar: İnterferon molekülüne bir polietilen glikol polimerinin bağlanması esasına dayanan pegilasyon teknolojisi, uzamış plazma ömrüne sahip interferonların oluşturulmasını sağlamıştır. Pegile interferonlarla ilgili yapılan çalışmaların sonuçları incelendiğinde, tedavi sonunda pegile interferonların; HBeAg serokonversiyonu, transaminaz normalizasyonu, kalıcı viral yanıt ve HBV DNA negatifleşmesi açısından standart interferonlara göre daha avantajlı oldukları görülmüştür. Yapılan çalışmalarda pegile interferonların güvenilirliği de araştırılmış ve yan etki profili açısından standart interferonlardan farklı bir özelliklerinin olmadığı görülmüştür (80).

Lamivudin: Sitozin analogudur. Revers transkriptaz inhibitörüdür. En az yan etkiye ve toksisiteye sahip olandır. HBV'nin prereplikatif formuna etki etmediği için 2 yıl gibi uzun süreyle kullanılmalıdır. Altı aylık kullanımı sonunda çok yüksek HBV DNA değerlerini düşürdüğü tespit edilmiştir. İnterferona yanıt alınamayan vakalarda tek veya kombine şekilde kullanılabilir. Uzun süre kullanımıyla mutant oluşumu, pankreatit ve karaciğer yetmezliği gelişebilir (79).

Famsiklovir: Asiklik guanin türevidir. Hem HBV DNA'nın katalize ettiği nükleotid zincirini bloke eder, hem de HBV DNA'nın içine girip stabil olmayan DNA molekülü oluşmasını sağlar. İnterferondan fayda görmeyenlerde kullanılabilir. Tedavi sırasında rezistan mutantların gelişmesi, ilacın kesilmesiyle replikasyonun tekrar başlaması olumsuz özelliklerindendir. Asiklovir, gansiklovir, ribavirin, vidarabin, didenozin, zalsitabin, zidovudin gibi ilaçlar, viral replikasyonu baskılamada yetersiz kalmaları, ciddi yan etki ve toksisite yapmaları nedeniyle tedavide kullanılmamaktadır (79).

Telbivudin: Yapılan çalışmalarda viral yük ve ALT normalleşmesinde lamivudine üstünlüğü gösterilmişse de HBV DNA düzeyleri azalmasında anlamlı fark saptanmamıştır.

Adefovir: Lamivudin tedavisine direnç gelişen hastalarda en yaygın tedavi yöntemi tedaviye bir nükleotid veya nükleozid analogu eklemektir (79).

Entecavir: Potent bir nükleozid analogudur. Yapılan çalışmalarda direnç oranının daha düşük (% 1,7) virüsü baskılama oranınsa daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Çalışmalar halen devam etmektedir (79).

HBV genotipleri ile tedaviye cevap arasındaki ilişki son zamanlardaki çalışmaların odağı olmuştur. HBV genotipleri ile hastaların tedaviye cevabı arasındaki ilişkinin

anlaşılması hasta yönetimini iyileştirebilir. C ve D genotipindeki hastalar, A ve B genotipi ile karşılaştırıldığı zaman, IFN alfa'ya daha düşük cevap oranlarına sahiptir. Genotip B'li hepatit B hastaları IFN alfaya daha yüksek düzeyde cevap verirler (18). Tayvan'da yapılan bir çalışmada genotip B'de genotip C ile karşılaştırıldığında IFN tedavisi ile daha yüksek oranda HBeAg serokonversiyonu geliştiği gösterilmiştir. İşpanya'da yapılan bir çalışmada ise, genotip A'da, genotip D'ye göre daha fazla serokonversiyon görülmüştür. 52 haftalık çok uluslu, plasebo kontrollü bir çalışmada ise, pegile IFN tek başına ve lamivudin ile kombine olarak tedavide kullanılmıştır ve HBeAg serokonversiyonu C ve D genotipli hastalar ile kıyaslandığı zaman, A ve B genotipinde daha fazla görülmüştür. İtalyada yapılan bir çalışmada lamivudine tedavisi verilen A ve D genotipli hastalar arasında virolojik ve biyokimyasal cevaplar farklı bulunmamıştır. Diğer antiviraller için bu konuda çok az veri vardır (81).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Çalışma grubu

Araştırma Örnekleri: Mart 2008-Ocak 2009 tarihleri arasında Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına çeşitli kliniklerden gönderilen, değişik dönemlerde HBV enfeksiyonuna sahip hastalara ait 54 serum örneği toplanmıştır. HBV DNA düzeyleri tespit edilmiş ve serolojik belirleyicileri çalışılmış olan 54 örnek çalışmaya dahil edilmiştir.

3.1.2. Kullanılan araç ve gereçler

Çalışmada aşağıda listelenen araç ve gereçler kullanılmıştır:

- Buzdolabı,
- -80° C'lik derin dondurucu,
- Eppendorf tüpü,
- Enjektör,
- Falkon tüpleri,
- Cam tüp,
- Santrifüj,
- Otomatik pipetler ve filtreli pipet uçları,
- ELISA cihazı (AXSYM, Abbott),
- Su motoru,
- Shaker,
- PCR cihazı (Cobas Taqman, Roche),
- Distile veya deiyonize su,
- Vorteks karıştırıcı,
- Hassas terazi,

- Sınıf II güvenlik kabini,
- Thermal cyclers,
- Isı bloğu,
- Pulse-spin,
- Mikrodalga fırın,
- Jel elektroforez,
- Oto-blot cihazı.

3.1.3. Kullanılan kitler ve kimyasal maddeler

- AXSYM HBsAg Makro Elisa kiti (Abbott, Amerika)
- AXSYM Anti-HBs Makro Elisa kiti (Abbott, Amerika)
- AXSYM HbeAg Makro Elisa kiti (Abbot, Amerika)
- AXSYM Anti-Hbe Makro Elisa kiti (Abbott, Amerika)
- COBAS TaqMan 48 HBV PCR Test kiti (Roche, Almanya)
- QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, Almanya)
- dNTP
- 10x Taq buffer
- Taq DNA polimeraz
- TAE (Tris Asetik asit EDTA)
- Etidyum bromür
- Jel elektroforez yükleme tamponu (Bromophenol blue)
- INNO-LiPA HBV Genotiplendirme kiti (Innogenetics, Belçika)
- INNO-LiPA HBV Prekor mutasyon analizi kiti (Innogenetics, Belçika)

3.2. Çalışma Yöntemi

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji laboratuvarına çeşitli kliniklerden gönderilen, Hepatit B enfeksiyonu tanısı almış değişik klinik dönemlerinde HBV enfeksiyonu bulunan hastalarda öncelikle HBV DNA düzeyleri

COBAS Taqman 48 (Roche, Almanya) Real Time PCR ile tespit edildi. Aynı hastaların, aynı tarihte Axsym-Abbott cihazı ile tüm hepatit serolojik belirleyicileri de çalışıldı. Daha sonra tekrar kullanılacak olan hasta serumları çalışma sonuna kadar -80 °C’de saklandı. 54 hasta örneği toplandıktan sonra QIAamp DNA Mini Kit ekstraksiyon kiti (Qiagen, Almanya) kullanılarak HBV DNA ekstraksiyonu yapıldı. Elde edilen DNA’lar çalışmaya kadar -20 °C’de saklandı. Sonra DNA örnekleri gruplar halinde nested PCR ile amplifiye edildi. Tüm amplifikasyon ürünleri DNA varlığı açısından jel elektroforezde görüntülendi. Jelde DNA bantı oluşan hastalar çalışmaya alındı. Amplifikasyon ürünleri çalışmaya kadar -20 °C’de saklandı. Tüm örneklerde, revers hibridizasyon prensibine dayalı INNO-LiPA HBV Genotyping (Innogenetics-Belçika) genotiplendirme kiti ve INNO-LiPA HBV PreCore (Innogenetics-Belçika) mutasyon analizi kiti kullanılarak genotiplendirme ve mutasyon tespiti yapıldı. Sonuçlar kit prosedürü ve yorum çizelgesi kullanılarak değerlendirildi.

3.2.1. Real Time PCR ile HBV DNA’nın kantitatif tespiti (COBAS TaqMan 48)

COBAS TaqMan 48, Real Time PCR teknolojisi kullanarak, klinik örneklerdeki DNA’nın amplifikasyonunu, deteksiyonunu ve kantifikasyonunu otomatik olarak gerçekleştirir. Kullanılan deteksiyon teknolojisi 5' nükleazdır. Bu metot, iki floresan boya ile işaretlenmiş probların kullanımını içerir. Bu probların normalde baskılanmış floresan boyaları vardır. Amplifikasyon sırasında problar hedef DNA’ya hibridize olur. Reaksiyonda kullanılan DNA polimeraz, ekzonükleaz aktivitesi ile probu keserek parçalar. Bunun sonucunda, işaretleyici molekül, baskılayıcı molekülden ayrılır. Baskılama ortadan kalktığı için floresan sinyali oluşur. Floresan sinyali, PCR sonucu oluşan ürün ile doğru orantılıdır.

Çalışma öncesi, gerekli tüm reaktifler oda ısısına getirildi. Çalışılacak numune ve kontrollere göre aşağıdaki tablodaki bilgiler doğrultusunda çalışma Lysis/Binding solüsyonu hazırlandı.

Tablo 7. Cobas TaqMan prosedürüne göre Lysis/Binding solüsyonu hazırlanması

Test sayısı	12	24
Lysis/Binding Buffer (ml)	7.0	14.0
Carrier RNA (µl)	140	280
HBV QS (µl)	39	78
Proteinase K (µl)	1.4	2.8

Test prosedürüne göre numune ve kontroller hazırlandı. Sonra çalışma master miksi hazırlanıp, numuneler ve kontroller ilave edildi. 3 saat içerisinde amplifikasyona başlandı. COBAS TaqMan 48 analizörü açılarak amplifikasyon ve deteksiyon yapıldı. IU/ml olarak hesaplanan HBV DNA titresi 5.82 kopya/IU çevrim faktörü kullanarak kopya/ml'ye çevrildi.

3.2.2. MEIA (Mikroparticle Enzyme Immunoassay) ile hepatit B enfeksiyonu serolojik belirleyicilerinin tespiti (AXSYM, Abbott)

1) MEIA için kullanılan reaktanlar

1. Antijen, antikor veya viral partikülle kaplı mikropartiküller,
2. Bulk solüsyonu: 1-Floresan substrat, 4-Metylumbelliferyl Phosphate (MUP),
3. Alkalen fosfataz işaretli konjugat.

2) MEIA yöntemi

Örnek ve mikropartiküller birleşir ve reaksiyon ısısında inkübe edilir. İnkübasyon periyodunda var olan antijen yada antikorlar mikropartiküllerle birleşirler ve immun kompleks oluştururlar. İmmun kompleks glass fiber matrikse irreversibl olarak bağlanır. Yıkama yapılarak bağlanamayan materyal uzaklaştırılır. Glass fiberlerce tutulan immun kompleks ise matrikste kalır. Alkalen fosfataz ile işaretli konjugat matrikse eklenir. Antikor-antijen-konjugat sandviç modelinde olduğu gibi bağlanırlar. Ortama MUP eklenir. Alkalen fosfataz konjugatı MUP'ı, 4-Methylumbelliferone'ye (MU) hidrolize eder. MU floresan bir üründür. MEIA optik okuyucuları MU miktarını ölçer. MU miktarı aynı zamanda, tespit edilmek istenen antijen yada antikoron miktarını verir. Bu testde AXSYM, Abbott cihazı kullanıldı.

3.2.3. HBV DNA izolasyonu

PCR ile HBV DNA miktarı 10.000 kopya/ml üzerinde tespit edilmiş ve hepatit belirleyicileri saptanmış 54 hastaya ait serum örneklerinde QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Almanya) kullanılarak DNA ekstraksiyonu yapıldı.

1. Önce tüm izolasyon kitleri buzdolabından dışarı çıkarılarak, oda sıcaklığına getirildi.

2. Isı bloğu 56 °C'ye ayarlandı.

3. Tampon AW1 ve AW2'ye (yıkama tamponu) üstüne yazan miktar kadar etanol eklendi.

4. 1.5 ml'lik eppendorf tüpleri örnek sayısı kadar dizildi ve numaralandırıldı.

5. İlk önce 20 µl proteinaz K tüpün dibine konuldu.

6. Üzerine 200 µl hasta örneği eklendi.

7. 200 µl AL (Lysis Buffer-lizis tamponu) tüp üzerine eklendi.

8. Eppendorf tüpleri vortekslendi.

9. Tüpler ısı bloğunda 10 dakika 56 °C'de bekletildi.

10. Sonra 3-4 saniye pulse spin yapıldı.

11. 200 µl etanol örneğe eklendi.

12. Tekrar vortekslendi ve pulse spin yapıldı.

13. Spin kolonlar dizildi ve numaralandırıldı.

14. Tüm materyal kolonlara aktarıldı.

15. Kapakları kapatıldı ve 8000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi.

16. Bu kolonlar 2 ml'lik koleksiyon tüplerine alındı, alttaki sıvı ve tüp atıldı.

17. Spin kolonlara 500 µl buffer AW1 eklendi ve 8000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi.

18. Bu koleksiyon tüpleri de yenisi ile değiştirildi.

19. Üzerine tampon AW2 den 500 µl eklendi.

20. 13.000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi.

21. 1.5 ml'lik eppendorf tüplerinin kapakları kesildi ve kolonlar bu tüplere aktarıldı.

22. Kolon içindeki DNA'larda etanol kalmaması için tekrar 13.000 rpm de santrifüj edildi.

23. Yeni eppendorf tüpleri dizildi ve numaralandırıldı.
24. Kolonlar ependorflara aktarıldı.
25. Tam filtrelerin üzerinden filtrelere değdirilmeden üzerine 60 µl buffer AE eklendi ve 1 dakika bekletildi.
26. Sonra 13.000 rpm de santrifüj edildi.
27. Elde edilen DNA'lar -20 °C'de saklandı.

3.2.4. HBV genotiplendirme

INNO-LiPA HBV Genotyping ve PreCore testi in vitro, serum ve plazma örneklerinin kullanıldığı revers hibridizasyon temelli “line probe assay” yöntemidir. İlk basamak izole edilmiş DNA örneklerinin biyotinlenmiş PCR primerleri kullanılarak iki tur PCR ile çoğaltılmasıdır. Amplifikasyon sonrası biyotinlenmiş belli bölgeye ait DNA materyali (genotiplendirme için HBsAg open reading frame, mutasyon analizi için prekor ve bazal kor promoter bölgesinden çoğaltılmış) membran bazlı stripler üzerindeki paralel çizgiler şeklinde yerleştirilmiş spesifik oligonükleotid problara hibridize edilir. Hibridizasyon sonrası, bağlanmamış DNA striplerden yıkanır. Alkalen fosfotaz ile işaretlenmiş streptavidin eklenir, bu daha önce oluşmuş biyotinlenmiş hibridlere bağlanır. Kromojen substrat ile inkübasyon sonrası mor/kahverengi presipitat oluşur. HBV genotiplendirme aşamaları şunlardır:

- 1) Amplifikasyon:
 - Outer amplifikasyon
 - Nested amplifikasyon
- 2) Jel elektroforez
- 3) LiPA aşaması

1) Amplifikasyon Aşaması:

A) Amplifikasyon için gereken reaktifler:

- dNTP (25 mM),
- 10xTaq buffer,
- Taq DNA polimeraz,

- 0.2 ml lik PCR tüpleri,

B) Amplifikasyon aşamaları: test prosedürüne göre Nested PCR yapıldı.

a) Outer Amplifikasyon:

1. DNA örnekleri -20°C'den oda ısısına çıkarıldı.
2. Örnek sayısı+negatif kontrol+pozitif kontrol kadar PCR tüpü dizildi ve numaralandırıldı.
3. Master Mix 1, örnek sayısı kadar hazırlandı:
N x 32.4 µl otoklavlanmış distile su
N x 5.0 µl 10x Taq amplifikasyon buffer
N x 0.4 µl dNTP mix
N x 2.0 µl Outer primer mix
N x 0.2 µl Taq DNA polimeraz 5 U/µl
4. Hazırlanmış Master Mixden otoklavlanmış amplifikasyon tüplerine 40 µl dağıtıldı.
5. Üzerine 10 µl DNA örneklerinden dağıtıldı.
6. Negatif kontrol olarak distile su kullanıldı.
7. Thermal cycle aşağıdaki amplifikasyon programına göre ayarlandı ve outer amplifikasyonu yapıldı:

Tablo 8. INNO-LiPA HBV Genotyping test prosedürüne göre outer amplifikasyon thermal cycle programı

1	Denatürasyon	94 °C	4 dakika	
2	Denatürasyon	94 °C	30 saniye	40 siklus
3	Primerlere bağlanma	45 °C	30 saniye	
4	Primerleri uzatmak	72 °C	30 saniye	
5	Uzama	72 °C	10 dakika	
6	4°C soğutmak	4 °C	1 dakika	

8. Bu aşama sonrası örnekler hemen nested amplifikasyon için kullanıldı veya -15/-25° C'de saklandı.

b) Nested Amplifikasyon:

1. Örnekler -20 °C'de saklanmışsa çözünmesi için buzdolabından çıkarıldı.

2. Örnek sayısı + negatif kontrol + pozitif kontrol kadar PCR tüpü dizildi ve numaralandırıldı.

3. Master Mix 2 hazırlandı:

N x 32.4 µl otoklavlanmış distile su

N x 5.0 µl 10x Taq amplifikasyon tamponu

N x 0.4 µl dNTP mix

N x 2.0 µl Nested primer mix

N x 0.2 µl Taq DNA polimeraz 5 U/µl

4. Hazırlanmış Master Mix 2'den otoklavlanmış amplifikasyon tüplerine 48 µl dağıtıldı.

5. Üzerine 2 µl outer amplifikasyon ürününden eklendi.

6. Negatif kontrol olarak distile su kullanıldı.

7. Thermal cycle da aşağıdaki amplifikasyon programına göre nested amplifikasyon yapıldı:

Tablo 9. INNO-LiPA HBV Genotyping test prosedürüne göre nested amplifikasyon thermal cycle programı

1	Denatürasyon	94 °C	4 dakika	
2	Denatürasyon	94 °C	30 saniye	35 siklus
3	Primerlere bağlanma	45 °C	30 saniye	
4	Primerleri uzatmak	72 °C	30 saniye	
5	Uzama	72 °C	10 dakika	
6	4 °C soğutmak	4 °C	1 dakika	

8. Nested amplifikasyon ürünü hemen kullanılmayacaksa -20 °C'de saklandı.

2) Jel elektroforez görüntüleme:

Birinci aşama ve ikinci aşama çoğaltma işlemi tamamlanması sonrasında jel elektroforezde görüntüleme işlemi yapıldı. % 2'lik hazırlanan agaroz jel içine 1 µg/ml ethidium bromid ilave edildi ve taraklara yerleştirilmiş jel tankı içine agaroz jel dökülerek jel hazırlandı. Jelin donması beklendi. Elektroforez tankı TAE 1X ile dolduruldu ve çıkarılan tarakların oluklarına 10 µl amplifikasyon ürünü 2 µl kadar yükleme tamponu ile parafilm üzerinde karıştırılarak yüklendi. Her çalışmada negatif kontrol de yüklendi. Elektroforez tankına 70-80 V akım verilerek yürütme işlemi yapıldı. 20 dakika yürütme işlemine devam edildi. Sonra oluşan bantlar DNA varlığı açısından değerlendirildi.

3) LiPA Aşaması:

Örneklerin denatürasyonu:

1. LiPA kitleri buzdolabından çıkarıldı.
2. Oto-blot cihazı açıldı. Gerekli yıkamalar yapıldı. Isınması için 30 dakika beklendi.
3. Hibridizasyon solüsyonu, stringent washing cihaz üzerindeki yerlerine bırakılarak ısınmaları sağlandı.
4. Tüm çalışma solüsyonları hazırlandı. Cihazın arkasında bulunan kablolar gerekli solüsyonların içine yerleştirildi.
5. Her örnek için bir oluk hazırlandı.
6. Her bir oluğa köşelerden 10 µl denatürasyon solüsyonu eklendi. Denatürasyon solüsyonu bozulmaması için hava ile fazla temas etmemesi sağlandı.
7. Üzerine 10 µl örnek veya negatif kontrol konuldu. Dikkatlice pipetleyerek karıştırıldı.
8. Oda sıcaklığında 5 dakika denatürasyon için bekletildi.
9. Daha sonra programlanan oto-blot cihazı ile hibridizasyon, yıkama ve renklendirme aşamaları yapıldı.
10. En son aşamada bantların oluşması arkasından 2 ml distile su eklendi. En az 3 dakika bekletildi.
11. Stripler kurutma kağıdına alınarak kurutuldu ve strip kağıdına yapıştırıldı, karanlıkta saklandı.

3.2.5. Prekor mutasyon tespiti aşaması

HBV prekor ve bazal kor promoter mutasyon analizi revers hibridizasyon temelli INNO-LiPA HBV PreCore (Innogenetics, Belçika) kiti ile çalışıldı. Çalışma yöntemi kit prosedürüne göre yapıldı. Genotiplendirme yapılmış hastalara ait DNA örnekleri, önce HBV PreCore kitine ait primerler ile nested PCR yöntemi ile çoğaltıldı, jelde görüntülendi. Jelde bant görülmeyen hastalar çalışmaya alınmadı. Sonra oto-blot cihazı ile tüm basamaklar HBV Genotiplendirme prosedürü ile aynı şekilde yapıldı.

3.2.6. İstatistiksel analiz

Veriler SPSS paket program aracılığı ile analiz edildi. Verilerin tanımlanması için tanımlayıcı istatistik, ortalamaların karşılaştırılması için iki ortalama arasındaki farkın önemlilik testi (student t-test) ve gruplar arası farkın karşılaştırılması için de Pearson-ki kare testi kullanıldı. α anlamlılık düzeyi 0.05 olarak alındı.

4. BULGULAR

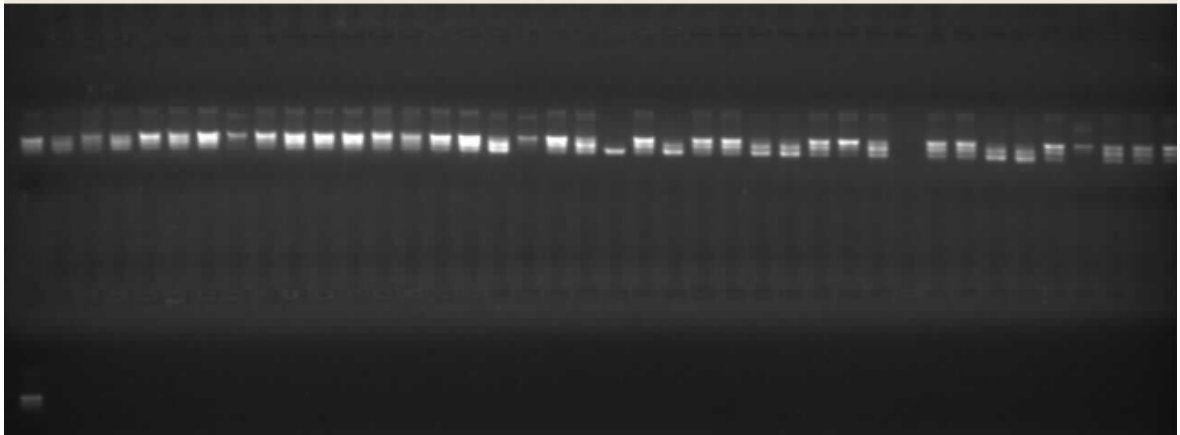
Mart 2008 - Ocak 2009 tarihleri arasında Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına Hepatit B enfeksiyonu ön tanısı ile gönderilen hasta serum örneklerinden tüm HBV serolojik belirleyicileri çalışılmış ve Real Time PCR ile HBV DNA düzeyleri tespit edilmiş 54 hasta serumu çalışmaya alındı.

54 hastanın 37'si (% 66.5) erkek, 17'si (% 31.5) kadındı. 7-91 yaş aralığında olan hastaların yaş ortalaması 29.15 ± 18.39 olup medyan değeri 26.5'ti.

Araştırma kapsamına alınan 54 hastanın 30'unda (% 55.6) HBeAg pozitif bulundu. Hastaların ALT değerlerinin (minor 13-max. 848) ortalaması 137.7 ± 207.997 olup, medyan değeri 56.0 idi.

Genotiplendirme yapılan 54 hastanın tamamı genotip D olarak tespit edildi. Aynı hasta örneklerinin 5 tanesinde mutasyon analizi için amplifikasyon sonrası jel elektroforezde bant oluşmadı (Resim 1'de oluşmayan bazı bantlar görülmektedir). Bu nedenle mutasyon analizi 49 hasta üzerinde gerçekleştirildi.

Resim 1. % 2'lik agaroz jel elektroforezde HBV mutasyon analizi için çoğaltma basamağı sonrası 2. PCR ürünleri bantlarının görünümü



49 hastanın 28'i prekor wild tip olarak bulunurken, 20 hasta prekor varyant olarak tespit edildi. 1 hastada ise prekor gen bölgesine ait bant oluşmadı ve indetermine (belirsiz) olarak değerlendirildi.

BKP mutasyon analizi yapılan 49 hastanın 26'sı BKP wild tip ve 17'si BKP varyant olarak tespit edildi. 6 tanesinde bu bölgeye ait bant oluşmadı ve indetermine olarak değerlendirildi.

Mutasyon analizi yapılan 49 hastanın 19'unda her iki gen bölgesine ait wild tip bandı oluştu, prekor ve BKP mutasyonu tespit edilmedi. 11'inde ise her iki bölgeye ait mutasyon saptandı.

49 hastada tespit edilen mutasyonların dağılımı Tablo 10'da gösterilmektedir.

Tablo 10. Hastalarda saptanan mutasyonların dağılımı

Mutasyon durumu	Hasta sayısı	%
Prekor		
Precor wild tip	28	57.1
Precor varyant tip	20	40.9
İndetermine	1	2.0
Toplam	49	100.0
BKP		
BKP wild tip	26	53.1
BKP varyant tip	17	34.7
İndetermine	6	12.2
Toplam	49	100.0
Prekor+BKP		
Prekor wild tip/BKP wild tip	19	38.8
Prekor varyant tip/BKP varyant tip	11	22.4
Bunların dışındaki durumlar*	19	38.8
Toplam	49	100.0

* Prekor wild tip+BKP varyant, Prekor wild tip+BKP indetermine, Prekor varyant+BKP wild tip, Prekor varyant+BKP indetermine, Prekor indetermine+BKP wild tip

Mutasyon analizi yapılan 49 hastadaki mutasyon dağılımına bakıldığı zaman, prekor mutasyonu açısından bu hastaların 11'i (% 22.5) sadece varyant olarak saptanırken, 9 tanesi wild tip+varyant olarak tespit edildi.

BKP mutasyonu açısından bakıldığında ise, 49 hastanın 4'ü (% 8.2) single varyant (A1762/T1764), 8'i (% 16.3) dual varyant (T1762/A1764), 1'i (% 2.0) wild tip+single varyant (AG+AT miks tip) , 4'ü ise wild tip+dual varyant (AG+TA miks tip) olarak tespit edildi.

Tablo 11. HBV prekor ve BKP bölge mutasyonları dağılımı

Mutasyonların dağılımı	Hasta sayısı	%
Prekor (nt 1896)		
Wild tip	28	57.1
Varyant tip	11	22.5
WT+Varyant tip	9	18.4
İndetermine	1	2.0
Toplam	49	100.0
Bazal Kor Promoter (nt 1762 ve 1764)		
Wild tip (AG)	26	53.1
Single varyant tip(AT)	4	8.2
Dual varyant tip(TA)	8	16.3
AG+AT miks tip	1	2.0
AG+TA miks tip	4	8.2
İndetermine	6	12.2
Toplam	49	100.0

Hastaların HBeAg durumları ile prekor mutasyon varlığı incelendiği zaman, HBeAg negatif olan hasta grubunun içinde 5 hasta (% 25.0) wild tip iken, 15 hasta (% 75.0) varyant tip olarak bulundu. HBeAg varlığına göre mutasyon görülme durumu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Pearson ki-kare, $p < 0.0001$).

Tablo 12. HBeAg durumu-Prekor mutasyon arası ilişki

HBeAg durumu	Prekor			
	Wild tip		Varyant tip	
	Sayı	%	Sayı	%
HBeAg negatif	5	25.0	15	75.0
HBeAg pozitif	23	82.1	5	17.9
Toplam*	28	58.3	20	41.7

*1 hastada prekor mutasyonu indetermine bulundu.

HBeAg negatif olan hastaların 11'inde (% 57.9) BKP mutasyonu görülmüştür. HBeAg negatif olanlar ile HBeAg pozitif olanlar arasında BKP mutasyonu görülme durumu açısından istatistiki olarak anlamlı fark bulunmuştur (Pearson ki-kare, $p=0.028$).

Tablo 13. HBeAg durumu-BKP mutasyon arası ilişki

HBeAg durumu	BKP			
	Wild tip		Varyant tip	
	Sayı	%	Sayı	%
HBeAg negatif	8	42.1	11	57.9
HBeAg pozitif	18	75.0	6	25.0
Toplam*	26	60.5	17	39.5

*6 hastada BKP mutasyonu indetermine olarak bulundu.

HBeAg negatif olan 18 hastanın 3'ü (% 16.7) prekor wild tip+BKP wild tip iken, 9'u (% 50.0) prekor varyant+BKP varyant olarak bulundu. 6 hastada (% 33.3) ise bu gen bölgelerinden sadece birinde mutasyon saptandı. HBeAg durumu ile prekor ve BKP mutasyonları birlikteliği değerlendirildiğinde HBeAg negatifliği ile pozitifliği arasında mutasyon durumu açısından anlamlı fark bulunmuştur (Pearson ki-kare; $p=0.002$).

Tablo 14. Hastaların HBeAg durumu açısından prekor ve BKP mutasyon birlikteliğinin değerlendirilmesi

HBeAg durumu	Prekor+BKP mutasyonu birlikteliği					
	Prekor wild+ BKP Wild tip birlikteliği		Prekor varyant+BKP varyant tip birlikteliği		Sadece bu bölgelerin birinde mutasyon	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
HBeAg negatif	3	16.7	9	50.0	6	33.3
HBeAg pozitif	16	66.7	2	8.3	6	25.0
Toplam*	19	45.2	11	26.2	12	28.6

* İndeterminate olarak saptanan hastalar dahil edilmemiştir.

Hastalar 18 yaş altı, 19-30 yaş arası ve 31 yaş ve üzeri olarak 3 grupta değerlendirildi. 18 yaş altı grup değerlendirildiği zaman, 15 hasta prekor wild tip (% 93.8) olup, yaş grupları ile prekor mutasyon durumu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (pearson ki-kare; $p=0.002$). Bu fark 18 yaş altı gruptan kaynaklanmaktadır.

Bu yaş gruplarına göre prekor mutasyonu durumları Tablo 15’de gösterilmektedir.

Tablo 15. Yaş grupları ile prekor mutasyonu arasındaki ilişki

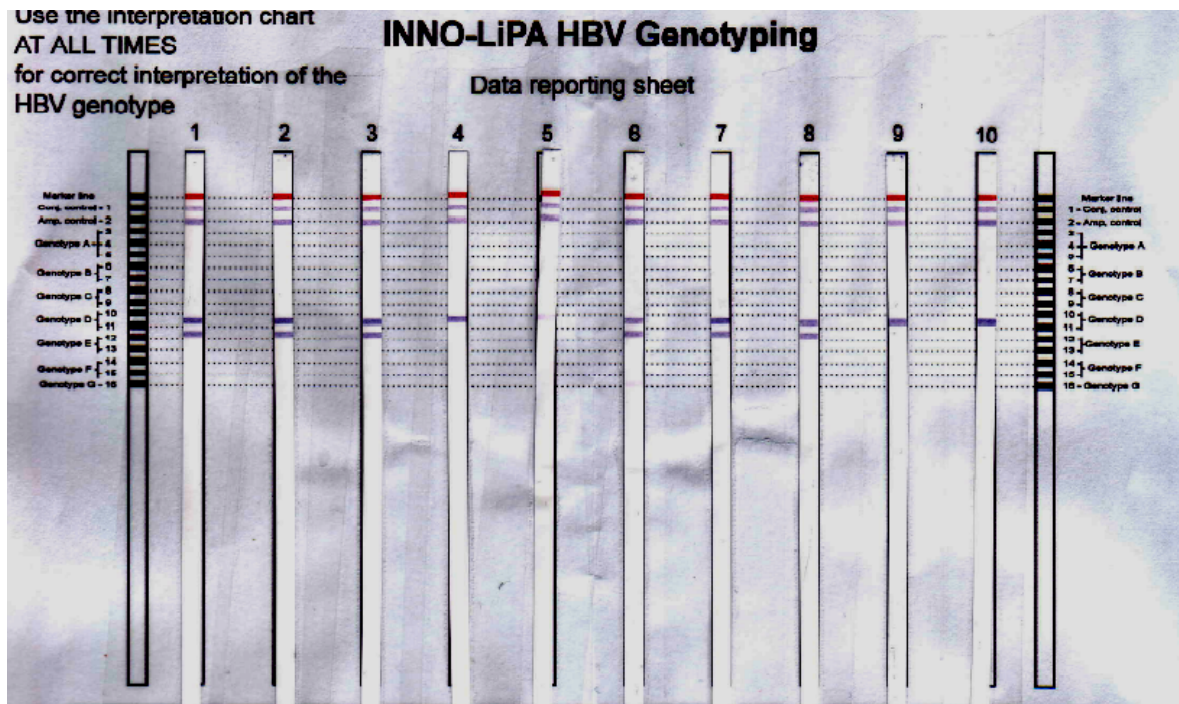
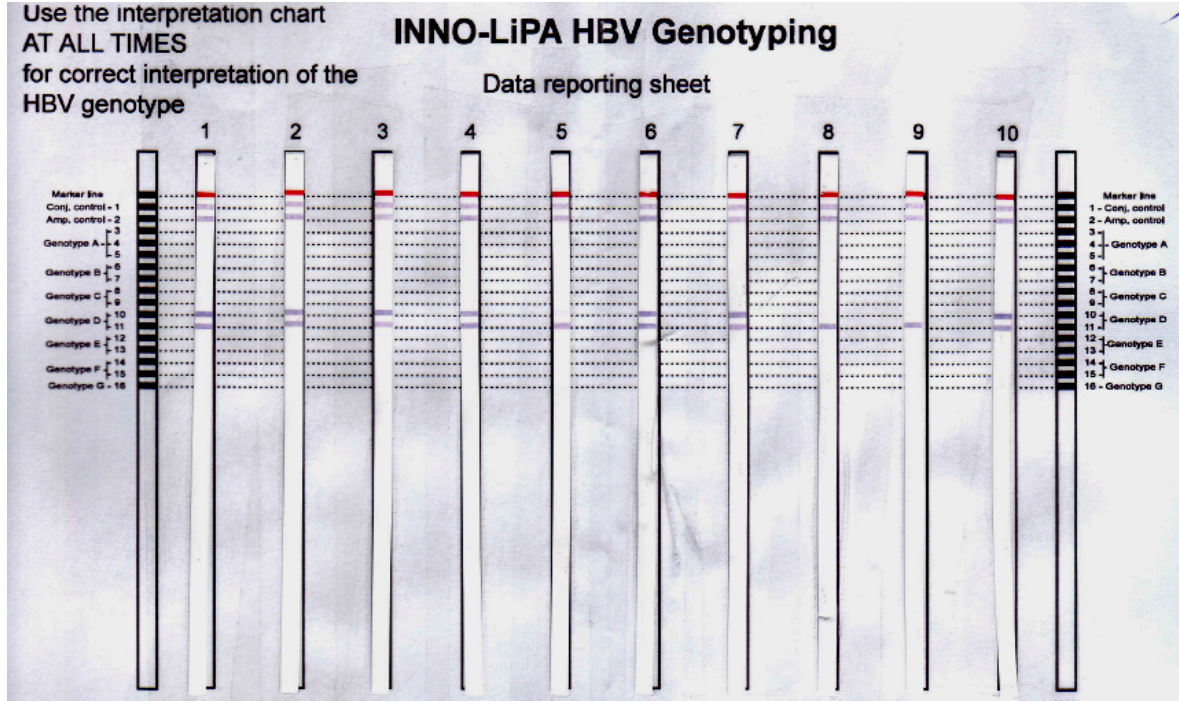
Yaş grupları	Prekor mutasyonu			
	Wild tip		Varyant tip	
	Sayı	%	Sayı	%
18 ve altı	15	93.8	1	6.3
19-30	6	46.2	7	53.8
31 ve üstü	7	36.8	12	60.2
Toplam*	28	53.8	20	41.7

*1 hasta prekor mutasyonu yönünden indetermine olarak tespit edildi.

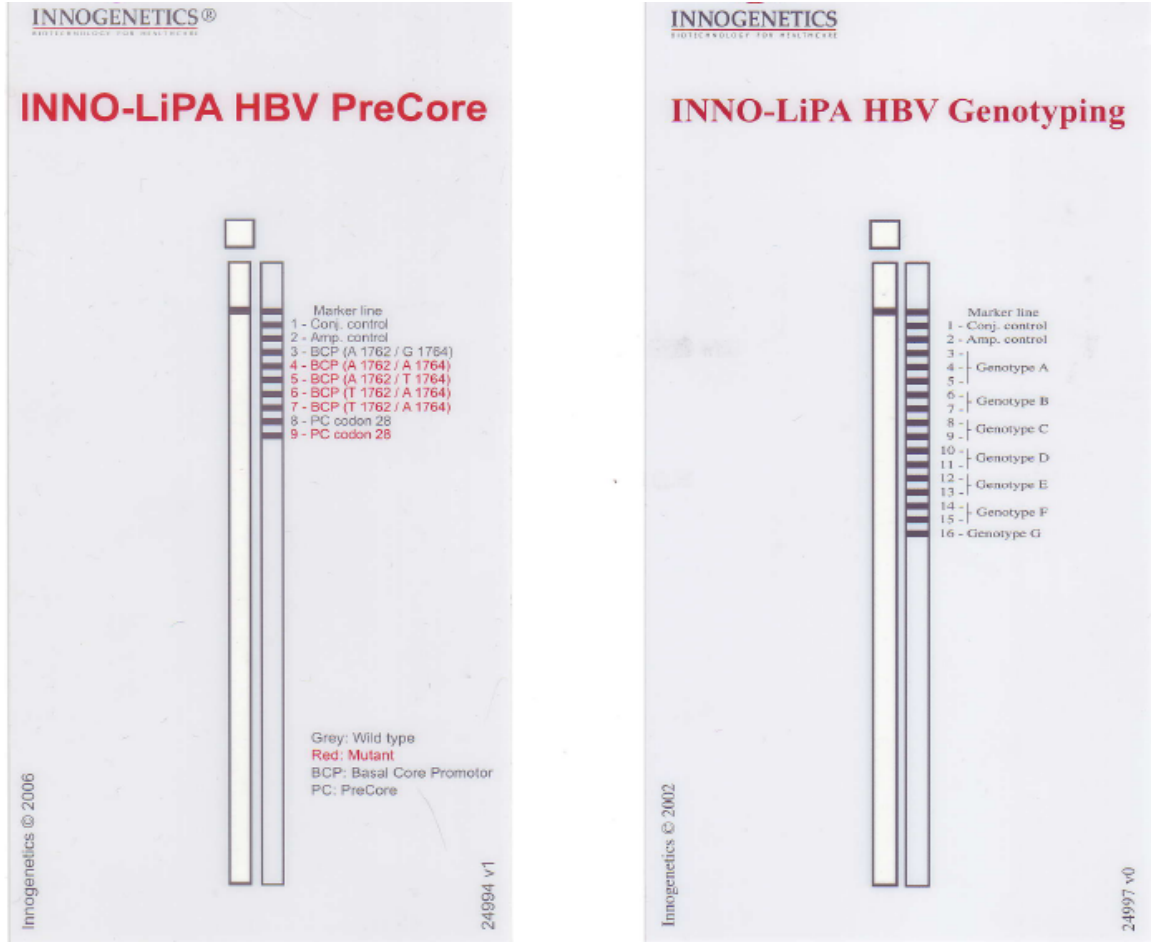
Yaş grupları ile BKP mutasyon durumu arasında ise anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

Cinsiyet ile prekor ve BKP mutasyonları arasında ilişki incelendiği zaman ise istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Prekor ve BKP mutasyonları açısından ALT değerleri incelendiği zaman wild ve varyant olma durumuna göre ortalama ALT değerleri açısından fark bulunmamıştır (student T test; $p>0.05$).

Resim 2. INNO-LiPA HBV Genotyping sonuçları.



Resim 3. INNO-LiPA HBV Genotyping ve PreCore testleri değerlendirme cetvelleri.



Resim 4. INNO-LiPA HBV Genotyping değerlendirme çizelgesi

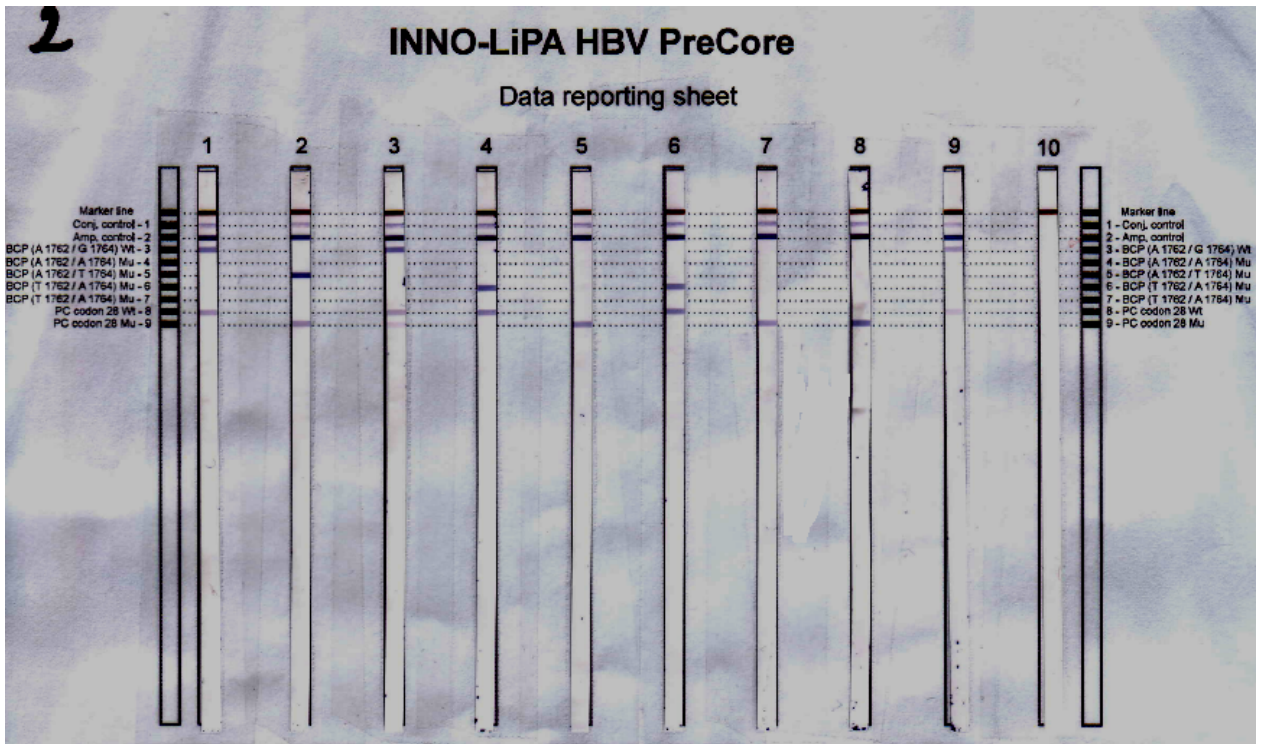
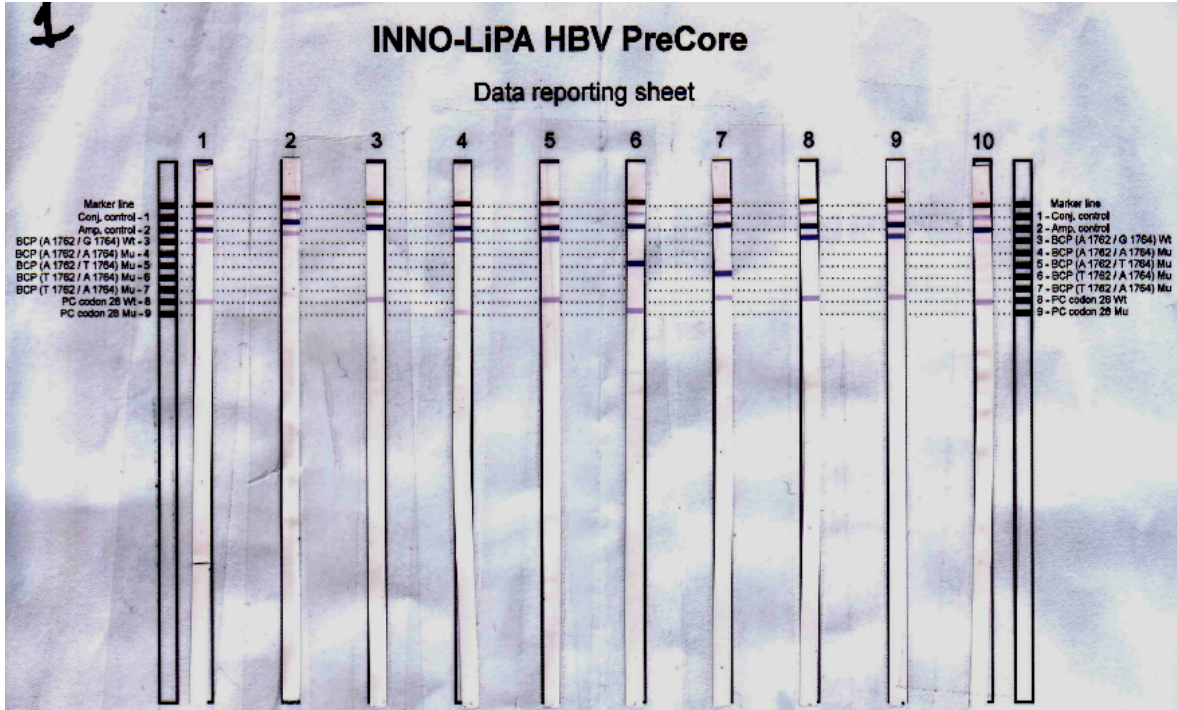
INNO-LiPA HBV Genotyping

Interpretation chart

Use the interpretation chart AT ALL TIMES for correct interpretation of the HBV genotype

Line	Genotype A								Genotype B			Genotype C			Genotype D				Genotype E			Genotype F			Genotype G		Genotype H	
1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
2	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
3	X	X		X	X																							
4	X	X	X			X																			X			
5	X		X	X			X																					
6								X	X																			
7								X		X																		
8											X	X																
9											X		X															
10													X		X	X												
11													X	X		X										X		
12															X	X		X										
13																X	X											
14																			X	X								
15																			X		X					X		
16																						X	X					

Resim 5. INNO-LiPA HBV PreCore mutasyon analizi sonuçları



5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Dünyada 350 milyon HBV taşıyıcısı bulunmaktadır ve hepatit B dünyayı tehdit eden sağlık unsurlarından biridir. İnaktif HBV aşısının kullanımı ile birlikte bu virüs ile mücadelede önemli yol alınmıştır ancak gelişmekte olan ve geri kalmış ülkelerde önemli halk sağlığı sorunu olarak karşımıza çıkmaya devam etmektedir (82). HBV enfeksiyonu geçiren erişkin hastaların yaklaşık % 10'unda HBsAg kaybolmayarak kişiyi HBV taşıyıcısı haline getirir. Konakla ilişkili faktörler, özellikle yaş ve immünite, kronik HBV enfeksiyonu gelişiminde önemlidir. Virüsün etkilerini, direk sitopatik hasardan çok immunolojik değişikliklere yol açarak gösterdiği düşünülmektedir (83).

Genotip, bir genomun genetik özelliklerinin, nükleotid değişimlerini, nükleotid insersiyonu veya delesyonlarını temel alarak tip yada subtip olarak tanımlanmasıdır. Bu tanımlama her bir birey dizininin diğerinden ayrılmasını sağlayan özellikler içerir. Bu bilgiler, dizinlerin moleküler virolojik karakteristiklerini oluşturur ve klinik olarak kullanılabilir faydalı bilgiler sağlayabilir. Genotipler, birbirinden en az % 8'lik bir nükleotid farklılığı göstermektedir (84). HBV'nin bugüne kadar tanımlanmış 8 ana genotipi vardır ve bu genotipler A'dan H harfine kadar adlandırılmıştır. Bu genotipler farklı coğrafik dağılım göstermektedirler. Genotip A; Kuzeybatı Avrupa, Sahra altı Afrika ve Kuzey Amerika'da yaygın olmakla birlikte tüm dünyada görülür. Genotip B ve C Güneydoğu Asya'da daha sık görülürken, D genotipi Akdeniz bölgesi ve Orta Doğu'da sıktır. Genotip E Batı Afrika ülkelerinde sınırlı iken F genotipi yaygın olarak Orta ve Güney Amerika'da saptanmaktadır (3, 84, 85). Genotip G Fransa ve USA'da sınırlıdır ve genotip H ise sadece Orta ve Güney Afrika'daki topluluklarda bulunmuştur (84). HBV genotiplerinin çeşitliliği, karaciğer hastalığı şiddeti, siroz ve HCC gelişimi, viral persistans ve antiviral tedaviye cevap gibi enfeksiyonun klinik farklılığı ile ilgili olabilmektedir (86).

HBV genotiplendirme çalışmaları, HBV ve diğer bulaşıcı hastalıkların çok yoğun görüldüğü Uzak Doğu ülkelerinde sık yapılmaktadır. Çinde yapılan bir çalışmada, % 72.6 genotip C, % 27.4 genotip B olarak tespit etmişlerdir. Bu çalışmada, yüksek HBV DNA düzeyi ve genotip C'nin, HCC oluşumu ve metastazında önemli risk faktörleri olduğu gösterilmiştir (87). Çinde yapılan başka bir çalışmada ise genotip C % 93.5, genotip B ise % 6.5 olarak bulunmuştur (88). Tayvan'da yapılan bir çalışmada, Tayvanlı hastalarda % 56.3 genotip B, % 43.7 genotip C saptanmıştır (89). Yine Tayvan'da yapılan başka

çalışmada ise genotip C daha baskın bulunurken (% 73.2), genotip B'de % 20.8 olarak bulunmuş ve genotip C, 40 yaş altı HCC hastalarında anlamlı derecede baskın olarak bulunmuştur (90). Japonya'da ise daha karışık genotip enfeksiyonu görülmekle birlikte genotip C baskındır (91, 92).

İskoçyada yapılan bir çalışmada genotip dağılımı, genotip A % 41, genotip B % 12, genotip C % 5 ve genotip D % 30 ve % 12 miks genotip olarak bulunmuştur (93). İtalya'da ülkemizde olduğu gibi % 100 genotip D saptanmıştır (94).

Almanya'da yapılan bir çalışmada sık görülen genotip A, B, C ve D genotiplerinin yanında daha nadir görülen genotipler olan genotip E, F, G ve H'de tespit edilmiştir. E-H genotipleri arasında da en sık genotip E bulunmuştur (95).

Hindistan'da % 67.7 genotip D olmak üzere A, B ve C genotipleri tespit edilmiştir (96). Yine Hindistan'da yapılan başka bir çalışmada % 92 genotip D baskın olarak saptanmıştır (97). Mısır'da yapılan çalışmada da ise genotip D'nin baskın olduğu görülmüş olmakla beraber A, B, C ve miks genotiplerde tespit edilmiştir (98).

Yapılan çalışmalarda, Genotip E Afrika'da, genotip F ise Brezilya ve Güney Amerika'da tespit edilmiştir (99, 100). Genotip G Kanada'da, genotip A ile koenfeksiyon şeklinde bulunmaktadır (101). Genotip H ise, Meksika'da en sık genotip olarak bulunmuştur (102).

Van ile sınır komşu ülke olan İran'da yapılan çalışmalarda, HBV enfekte hastalarda sadece D genotipi saptanmıştır (103, 104, 105).

Türkiye'de Leblebicioğlu ve arkadaşları (106), 2001-2002 yılları arasında 22 tıp merkezinden gelen 158 akut HBV enfeksiyonu olan hastada PCR-RFLP yöntemi kullanarak yaptıkları çalışmada 147 hastada D genotipi tespit etmişlerdir. Kalan 11 hastada ise PCR negatifliği nedeniyle genotip tespit edilememiştir.

Sünbül ve ark. (107), Türkiye'nin 15 farklı hastanesinden gelen 88 kronik hepatit B enfeksiyonu olan hastada; RFLP yöntemi ile genotip ve subgenotip araştırmışlardır. 10 hastada PCR ve amplifikasyondaki başarısızlıklar nedeni ile genotip tespit edilemezken, kalan 78 hastada genotip D, subtip olarak da % 85.9 D2 tespit etmişlerdir.

Yalçın ve ark. (108); Diyarbakır'da 32 HBsAg pozitif, 6 inaktif taşıyıcı ve 6 immüntoleran hastada yaptıkları çalışmada, sekanslama yöntemi ile HBV genotiplerini araştırmışlardır. Bu hastalarda sadece genotip D baskın olarak bulunmuştur. Bu araştırma, Türkiye'de hem aktif karaciğer hastalığı olan hem de inaktif HBsAg taşıyıcıları arasında

genotip D'nin baskın olduğunu göstermektedir. Genotip dağılım modeli oldukça basittir ve tüm kronik HBV enfeksiyonlarında ağırlıklı olarak genotip D merkezlidir.

Bozdayı ve ark. (109), Türk hastalarda hepatit B, C ve D moleküler epidemiyolojik özelliklerini araştırdıkları bir çalışmada, 41 Türk kronik hepatit hastası, 6 Azeri ve 10 Özbek HBsAg pozitif hastayı çalışmaya almışlardır. Sekanslama yöntemi ile Türk ve Azeri hastalarda % 100 genotip D saptanırken, Özbek hastalarda % 83 genotip D, % 17 genotip A tespit edilmiştir. Tarihde pek çok medeniyet arasındaki göçlerde köprü görevi gören Türkiye'nin coğrafi konumu nedeni ile HBV de tek tip genotip saptanması aslında çok beklenen bir durum değildir. Daha izole bir topluluk olan ve bir ada ülkesi olan Japonya'da genotipik çeşitlilik olması da bu durumla kontrast halindedir.

Türkiye'nin iç kesimlerinde Bozdayı ve ark. (86), güney bölgesinde Serin ve ark. (110), batısında Saymer ve ark. (111), Sertöz ve ark. (112), kuzeybatısında Akhan ve ark. (113), Çakaloğlu ve ark. (114), Sayan ve ark. (115), doğusunda Yalçın ve ark. (108) ile Aksoy ve ark. (116), güneydoğusunda Özaslan ve ark. (117) yaptıkları çalışmalarda tek tip olarak genotip D tespit ederek, ülkemizde genotip D'nin dominant olduğunu göstermişlerdir.

Uysal ve ark. (118) 2001 yılında RFLP yöntemi kullanarak İstanbul merkezli yaptıkları bir çalışmada, genotip D % 85.41, genotip A % 10.41 ve genotip F % 4.16 olarak bulmuşlardır. 2006 yılında yine İstanbul'da RFLP yöntemi ile yapılan başka bir çalışmada genotip D % 84, genotip A % 12 ve genotip F % 4 olmak üzere farklı genotip saptanmıştır (119). Bunlar genotip D dışındaki genotiplerin saptandığı nadir çalışmalardır.

Genotip D'nin dominant olduğu grupta yapılan çalışmalarda genotiplere bağlı bir karşılaştırma yapmak mümkün değildir. Ayrıca bu çalışmalar incelendiğinde görülmektedir ki, genotip hasta yaşı, cinsiyeti, klinik dönem ile değişmemekte, sadece coğrafik olarak fark göstermektedir.

Bu konuda son çalışma 2010 yılında Realist gözlem çalışmasına katılan 11 merkezden 100 KHB hastası ile yapılmıştır. DNA dizileme yöntemi ile genotipleme ve subgenotipleme yaptıkları çalışmada genotip D dominant, subgenotip D1 % 88, D2 % 3, D3 % 8, D4 % 1 olarak tespit edilmiştir (120).

Bizim çalışmamızda, 54 hastada INNO-LiPA HBV Genotyping ticari kiti kullanılarak genotiplendirme yapıldı. Tüm hastalar genotip D olarak tespit edildi. Bu

sonuç, Türkiye’de yapılan çalışmalar ve tüm literatür değerlendirildiği zaman beklenen bir sonuçtur.

HBeAg’nin kaybolması ve anti-HBe’nin pozitifleşmesi iyileşmeyi işaret etmesine rağmen günümüzde bu konuda bazı şüpheler oluşmuştur. Birçok toplumda anti-HBe ve HBV DNA’nın birarada pozitifliği gösterilmiştir. Bazı hastalarda HBeAg negatif, anti-HBe pozitif ve HBV DNA pozitif olarak uzun süre devam edebilmektedir. Bu tür durumlar virüsün prekor bölgesindeki mutasyonlar sonucu meydana gelebilmektedir (121).

Pre-C dizisinde, stop kodon mutasyonları sonucu oluşan HBV mutantlarında HBeAg sentezlenememekte, ancak HBcAg sentezlenmektedir. HBV DNA ile serum aminotransferaz aktivitesi yüksek olup hastada kronik karaciğer hasarının biyopsiyle saptanmasına karşın, hastanın HBeAg negatif bulunmasıyla varyantların enfeksiyonu tanımlanmıştır. HBV genomunun prekor bölgesinde prekor mutasyonlar veya kor promoter mutasyonlar belirlenmiştir. HBV’de prekor bölgesindeki en sık mutasyon, HBeAg’yi kodlayan diziyi kesen, triptofan kodon TGG’yi bir stop kodon olan TAG’ye değiştiren kodon 28’deki tek bazlık değişimdir. Bazal kor promoter varyantları da en sık nükleotid 1762 (A’dan T’ye değişim) ve nükleotid 1764 (G’den A’ya değişim)’deki çift mutasyondur. Bazal kor promoter mutasyonları HBeAg pozitif ve negatif hastaların her ikisinde de saptanmaktadır (122). Bu hastalarda HBV enfeksiyonu olmasına karşın, HBeAg transkripsiyonu veya translasyonu yapılamamaktadır. HBV’nin A genotipinde prekor mutasyon çok nadir görülür. Bunun nedeni ise genotip A’da HBV genomunun 1858. C nükleotidiyle 1896. G nükleotidinin küçük bir döngü yaparak birbirlerine tamamlayacak gibi sıkı şekilde bağlı olmasıdır. Türkiye için bakıldığında; genotipin D ve Akdeniz ülkelerinin profiline uygun olarak HBeAg-negatif mutant suşlarla enfeksiyonun hakim olduğu görülmektedir (113).

Çinde yapılan bir çalışmada 1773 hastanın % 64.2 HBV genotip B, % 32.2 genotip C ve % 3.6 her iki genotip ile enfekte olarak tanımlanmıştır. Prekor stop kodon mutasyonu, genotip B’de % 5, genotip C de ise % 25.8 olarak tespit etmişlerdir. Prekor mutasyonu prevalansı hem erkek hem kadınlarda yaşla birlikte arttığı görülmüştür (123). Japonya’da yapılan bir çalışmada kor promoter (A1762T/G1764A) ve prekor bölge (G1896A) mutasyonları akut alevlenmeler gösteren kronik hepatitlilerde, akut HBV hastalarına göre daha sık olarak bulunmuştur (124).

Tayvan'da % 67'si HBV genotip B, % 33'ü genotip C olarak tespit edilmiş 79 hasta ile yapılan çalışmada; genotip B, prekor stop mutasyonu ile anlamlı derecede ilişkilendirmiştir. Bu genotip ile enfekte hasta grubunda % 92.5 oranında prekor stop mutasyonu tespit edilirken genotip C'de ise % 69.2 olarak bulunmuştur (125).

Hindistan'da, HBV ile ilişkili karaciğer hastalığı farklı dönemlerindeki hastalarda yapılan bir çalışmada % 67.4 genotip D saptanmış ve bu hastalarda % 36.9 prekor mutasyonuna rastlanmıştır. HBeAg pozitif hastaların sadece % 6.7'sinde bu mutasyona rastlanmıştır, yani prekor mutasyonu HBeAg negatif hastalarda çok daha yaygındır (96).

USA'de line probe assay yöntemi ile 694 hasta örneğinde genotiplendirme ve mutasyon analizi yapılmıştır. Tüm major genotipleri saptadıkları çalışmada % 34 genotip A ve % 30 ile genotip C en sık izole edilen genotipler olarak bulunmuş ve sonuçlar DNA sekanslama ile doğrulanmıştır. Prekor mutasyon en sık genotip D'de saptanırken, bazal kor promoter mutasyon genotip A'da daha sık bulunmuştur. HBeAg negatif hastalarda % 38 prekor mutasyonu olduğu saptanırken, bazal kor promoter oranı % 51 olarak bulunmuştur. Bu mutasyonların Asya kökenli hastalarda daha sık olduğu da bu çalışmada gösterilmiştir (126).

Belçika'da yapılan bir çalışmada, HBV genotip A % 46.8 ve genotip D % 38.8 olarak tespit edilirken, daha az oranda genotip B, C ve E de tanımlanmışlardır. HBeAg pozitifliği, genotip A'da % 89.6, genotip C'de % 100, genotip D'de % 50, genotip E'de % 66.6 bulunmuştur. Genotip A'da prekor ve bazal kor promoter mutasyonu saptanmazken, genotip D izolatlarında % 62.5 oranında prekor mutasyonuna rastlanmıştır (127).

İskoçya'da 85 HBsAg pozitif kan vericisinde yapılan bir çalışmada % 41 genotip A, % 30 genotip D olarak saptanmış. HBeAg pozitif grupta % 22, negatif grupta ise % 55 prekor mutasyonu saptanmıştır (93).

Pakistan'da hepsi genotip D olarak saptanan, % 35'i HBeAg pozitif, % 65'i negatif olan 109 hasta örneğinde, HBeAg negatif olanların % 62'sinde, HBeAg pozitiflerin ise % 9'unda mutasyon saptanmıştır. Line probe assay yöntemi ile HBV genotiplendirme ve mutasyon analizi yapılan bu çalışmada, HBeAg negatiflerde % 31 prekor, % 52 bazal kor promoter mutasyonu saptanmıştır. Bu mutasyona sahip hastalar ile wild tip enfeksiyonu olan hastalar arasında önemli ölçüde klinik farklılık bulunamamıştır (128).

Akdeniz ülkesi olan Tunus’da yapılan bir çalışmada, hepsi genotip D olan hastalarda prekor bölgesinde % 7.5 wild tip, % 41.5 G1896A varyant, % 50.9 wild tip+varyant tespit edilmiştir. Kor bölgesinde ise % 48.6 wild tip, % 5.4 dual varyant, % 13.5 single varyant, % 32.4 miks varyant bulmuşlardır. Prekor ve BKP mutasyonları HBeAg negatif hastalarda daha fazla bulunmuştur. Bu oranlar, bizim çalışmamızdaki mutasyon oranlarından daha yüksektir (85).

İran’da Mohebbi ve ark. (105), 249 HBV enfekte hasta örneği ile yaptıkları çalışmada, DNA sekanslama ile tüm hastaları genotip D olarak tespit etmişler ve bu hastalarda % 59.5 G1896A prekor stop mutasyonu gösterilmiştir. Bu mutant hastaların hepsinde HBeAg negatif olarak bulunmuştur. HBeAg negatif/anti-HBe pozitif ve HBeAg pozitif/anti-HBe negatif hastalar arasında karaciğer fonksiyon testleri açısından anlamlı bir fark bulunamazken, ortalama yaş HBeAg pozitif/anti-HBe negatif grupta anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Yine İran’da hepsi genotip D olan, 16 HBeAg pozitif ve 46 HBeAg negatif 62 hasta ile yaptıkları bir çalışmada, % 58.1 prekor mutasyonu saptanmış ve bu mutasyon HBeAg negatif hastalarda anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (104).

1999 yılında, Bozdayı ve ark. (129), HBeAg negatif kronik hepatit B hastalarında % 85 oranında prekor stop kodon mutasyonu tespit etmişlerdir. HBeAg pozitif hastalarda ise bu mutasyon % 14 oranında bulunmuştur.

Özgenç ve ark. (130), İzmir’de 44 kronik hepatit B hastasında yaptıkları çalışmada bazal kor promoter mutasyonunu % 55 HBeAg pozitiflerde, % 46 HBeAg negatif hastalarda tespit ederken, HBeAg negatifler prekor mutasyonu ile ilişkilendirilmiştir.

Bozdayı ve ark. (131), 2000 yılında yaptıkları çalışmada, 67 D genotipinde hastada, ALT seviyeleri yüksek hastalarda bazal kor promoter mutasyon oranını yüksek bulmuşlardır. HBeAg negatif hastaların % 28’inde prekor mutasyonu, % 4’ünde bazal kor promoter mutasyonu, % 15’inde ise her iki mutasyonda tespit edilmiştir. Mutasyona sahip hasta grubu ile wild tipi HBV ile enfekte grup arasında viral yük düzeyi yönünden anlamlı fark bulunamamıştır.

Bayraktar ve ark. (132), 16 prekor mutan ile enfekte kronik hepatit B hastasında IFN tedavi cevabını izlemişlerdir. Wild tip HBV enfeksiyonuna sahip gruba göre, varyant grubun IFN tedavisine daha dirençli olduğu görülmüştür.

Onganer ve ark. (119), 31 hastada prekor/kor bölgesi mutasyonu analizi yaptıkları çalışmada % 3.2 prekor ve % 3.2 BKP mutasyonu tesbit etmişlerdir.

Bizim çalışmamızda, 49 genotip D HBV enfeksiyonuna sahip hastalar arasında G1896A prekor mutasyonu % 40.9, BKP mutasyonu ise % 34.7 olarak bulunmuştur. Her iki mutasyona sahip hasta oranı ise % 22.4'dü. Mutasyon tespit edilen hastaların HBeAg durumlarına bakıldığı zaman, HBeAg negatif hastalarda prekor mutasyonu % 75, bazal kor promoter mutasyonu % 57.9 olarak tespit edilmiştir. HBeAg pozitif hastalarda ise % 17.9 prekor mutasyonu, % 25 bazal kor promoter mutasyonu oranları bulunmuştur. HBeAg negatif hastalar içinde % 50'sinde her iki bölgeye ait mutasyon tespit edilmiştir. G1896A prekor mutasyonu tüm dünya'da HBeAg negatif hastalar arasında % 20-95 aralığında görülmektedir (104). Akdeniz ülkelerinde ise bu oran % 50-80 arasındadır (1). Bizim çalışmamızda bulduğumuz oranlar Akdeniz ülkelerinde beklenen değer aralığındadır.

HBV genotip tanımlanması, direk PCR sekanslama, line prob assay veya serolojik antikor testleri temelli araştırma testleri gibi çeşitli pek çok teknik kullanılarak yapılabilmektedir. Line prob assay teknolojisi INNO-LiPA testi, viral mutant saptandığı zaman çok bileşenli kağıt stripler üzerinde kolomiretrik değişiklikler olarak etkilenen HBV dizi-spesifik oligonükleotid problemlerini kullanan revers hibridizasyon yöntemi ile çalışmaktadır (122). INNO-LiPA HBV Genotyping (LiPA HBV GT; Innogenetics N.V. Ghent, Belgium) ve INNO-LiPA HBV Pre-Core (LiPA HBV PC; Innogenetics N.V.), HBV genotiplendirme ve HBV prekor/bazal kor promoter mutasyon analizi için ticari olarak mevcut testlerdir. Üretici tarafından tavsiye edilen yöntem biraz yoğun emek istemekle birlikte nested PCR kullanılmasına ve kontaminasyon kontrol önlemleri eksikliğine bağlı olarak, dışsal DNA kontaminasyonuna eğilimlidir (133). Bu test ile HBV'ne ait 8 ana genotip de saptanabilmektedir. INNO-LiPA HBV Genotiplendirme testi ile genotip A, B, C, D, E, F, G'ye ait bantlar stripler üzerinde ayrı bulunmaktadır. Genotip H ise, 11. ve 15. bantların birlikte oluşması şeklinde değerlendirilmektedir (51).

Genotiplendirme testleri hastanın verilen tedavi için uygun aday olup olmadığını anlamamıza yardım eder. Genotiplendirme hastalığın ilerlemesi için yüksek riske sahip hastaları belirlemek için kullanılabilir. HBsAg pozitif ve ölçülebilir HBV DNA düzeylerine sahip ve tedavi için aday olan tüm hastalara genotip testleri uygulanması gerekmektedir (122).

INNO-LiPA ile genotiplendirme ve mutasyon analizi ticari kit sisteminin doğruluğunu değerlendirmek için yapılan kapsamlı bir araştırmada, Hong Kong ve Amerika çalışması şeklinde 701 hastada genotip ve 600 hastada prekor ve BKP mutasyonu

araştırılmıştır. Genotiplendirme yapılan hastalar arasında A-H genotiplerinin hepsi bulunmuş, sekanslama ile çok iyi uyum göstermiştir. Mutasyon analizinde ise INNO-LiPA, sekanslamaya göre miks tipleri daha iyi saptamıştır. Bu çalışmada, mutasyon analizinde INNO-LiPA ile saptanamayan örnekler sekanslama ile araştırıldığı zaman özellikle kor bölgesine ait nadir görülen delesyonlar ve farklı mutasyonlar (TG, TT, AA + TA, AA + AG gibi) olduğu görülmüştür (51).

Line prob yönteminin bazı kısıtlamaları vardır. Bu yöntem ile genotiplendirme ve mutasyon analizinde, sadece belirli genotipler ve en sık görülen mutasyonlar tespit edilebilmektedir. Prekor testinde sadece G1896A stop kodon mutasyonu saptanabilmektedir. Start kodon mutasyonu ve aminoasit değişikliği gibi diğer mutasyonlar tespit edilememektedir. Bu yüzden zamanla bu teste yeni problemler eklenerek geliştirilmesi gerekmektedir. Bu testlerdeki başka bir sorun da prob bölgelerindeki polimorfizm nedeni ile bağlanmanın engellenmesi ve bu nedenle belirsiz (indetermine) sonuçların ortaya çıkmasıdır. Bu özellikle mutasyon analizi testinde ortaya çıkan belirsiz sonuçların en önemli sebebidir. Bu sorun eski versiyon testlere yeni prob eklenmesi ile çözülememiştir ve line prob yöntemi delesyon olan prob bölge mutasyonlarını tespit edememektedir (51).

G1896A prekor ve A1762T/G1764A BKP mutasyon birlikteliği, kronik aktif hepatit, histolojik hasar derecesi ve yüksek HBV DNA düzeyleri ile açıkca bir ilişki içindedir. Bu yüzden mutasyonların bir arada bulunduğu varyantlar daha yüksek patojenite ve replikasyon yeteneğine sahip olabilirler. Ancak, bazı çalışmalar bu çoklu mutasyonların yüksek serum HBV DNA düzeyi olan hastalarda daha az sıklıkta görüldüğünü göstermektedir (134). Bu sebeplerden dolayı bu mutasyonların birlikteliği daha ileri çalışmalar ile araştırılmalıdır. Bizim çalışmamızda, prekor ve BKP mutasyon birlikteliği bulunan 11 hasta (% 22.2) tespit edilmiştir. Bu hastaların HBV DNA düzeyleri 3560 ile 2350×10^3 IU/ml gibi geniş bir aralıkta bulunmaktadır. Bu yüzden bizim çalışmamızdaki hastalar için HBV DNA düzeyleri ile mutasyon birlikteliği arasında bir ilişki olduğunu söylemek mümkün değildir.

HBeAg negatif prekor ve kor promoter varyant enfeksiyonuna sahip kronik hepatit hastaları siroz gelişimi, HCC ve ölüm için artmış riske sahiptirler. Bu hastalarda tedaviye cevap görülememekte, bu hastalarda ömür boyu oral antiviral tedaviye devam edilmektedir. Bu yüzden bu hastalarda tedavi rejimini belirlemek ve gereksiz tedavi giderlerini azaltmak için prekor ve kor promoter bölge mutasyonlarını göstermek

önemlidir. Wild tip enfeksiyona sahip hastalar, serumda düşük miktarda HBV DNA pozitifliği devam ederken HBeAg'yi temizleyebilirler ve bu hastalar prekor ve BKP mutasyonu olan hastalardan farklı şekilde tedavi edilebilirler. Bu veriler klinik veriler ile ekonomik yönden değerlendirilmelidir (122).

Prospektif çalışmalar ile, HBeAg pozitif ve HBeAg negatif hastalarda ilk tedavi seçeneğine karar verilebilmesi için, tedavi sırasında ziyade, tedavi öncesi prekor ve kor promoter varyantlarının tespit edilmesi gerekmektedir. HBsAg pozitif ve ölçülebilir HBV DNA düzeylerine sahip hastalarda, yapılan çalışmalar ışığında, kor promoter mutasyonlarının test edilmesi önerilmektedir (122).

Bu veriler ve değerlendirmeler göstermektedir ki, genotiplendirme ve mutasyon analizi testleri ile elde edilecek veriler HBV enfeksiyonunun seyri ve tedavisini etkilemektedir. Türkiye'de ve bölgemizde de baskın olduğu saptanan HBV genotip D, diğer genotiplere göre daha ciddi karaciğer hastalığı yapması, IFN tedavisine daha az cevap vermesi ve prekor/BKP mutasyonlarının daha sık görülmesi sebebi ile önemlidir. Serolojik belirleyicilerden HBeAg, klasik olarak hepatit B enfeksiyonu seyrinde takip edilir ve pozitifliğinde virüsün replikatif ve dolayısıyla hastalığın aktif formda olduğu düşünülür. Prekor/kor promoter mutasyonu sonucu HBeAg sentezi azalmakta hatta görülmemekte ve hatta hastalarda serokonversiyonla anti-HBe pozitifleşmektedir. Mutasyon oluşmasıyla hepatit B enfeksiyonu olan hastalarda HBeAg yorumu yanıltıcı olarak değişmektedir. Bu açıdan tüm hastalarda prekor ve BKP mutasyonları araştırmak hastalığın klinik formunun doğru tanımlanması açısından gereklidir. HBV enfeksiyon prevelansının yüksek olduğu Van yöresinde HBV hastalarının izlenmesi ve tedavisi açısından elde ettiğimiz bilgiler klinisyenleri daha doğru yönlendirebilecektir. Revers hibridizasyon yöntemi ile HBV genotiplendirme ve mutasyon analizi; basit, kullanışlı ve standardize edilmiş bir yöntem olmakla birlikte sadece mevcut genotipler ve mutasyonları saptayabildiği için bazı kısıtlamaları bulunmaktadır. Bu durumlarda nadir rastlanan mutasyonlar tespit edilememekte ve belirsiz (indetermine) sonuçlar elde edilmektedir. Çalışmamızda da muhtemelen bu sebeple 6 hastada özellikle BKP mutasyonu tespit edilememiştir. Bu nedenle, HBV prekor ve BKP mutasyonlarının, revers hibridizasyon yöntemiyle test edildikten sonra elde edilen şüpheli veya belirsiz sonuçların DNA dizi sekanslama yöntemi ile konfirme edilmesiyle nükleotid değişiklikleri daha net olarak belirlenebilecektir.

6. KAYNAKLAR

1. Arslan U, Tuncer İ, Fındık D, Ural O: HBeAg negatif, anti-HBe pozitif kronik hepatit B olgularında prekor/kor bölge mutasyonlarının ve genotip dağılımlarının değerlendirilmesi, *İnfeksiyon Derg*; 22(3): 123-129, 2008.
2. Demirdağ K, Karlıdağ GE: Kronik hepatit B hastalarında pegileinterferon/lamivudin tedavisi süresince ortaya çıkan klinik yan etkilerin değerlendirilmesi, *Viral Hepatit Derg*; 14(2): 47-52, 2009
3. Özacar T: Hepatit B Virüsü, “Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi” Cilt 2, Ed. Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M, Nobel Tıp Kitabevleri: s: 1882-1904, 2008.
4. Arabacı F, Demirli H: Van’da 6-10 yaş grubu çocuklarda hepatit A ve B seroprevalansı, *İnfeksiyon Derg*; 19(4): 457-460, 2005.
5. Badur S: Viral Hepatitler (HAV, HBV, HDV), “Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji”, Ed. Ustaçelebi Ş, Abacıoğlu H, Badur S, s:175-202, Güneş Kitabevi, İstanbul, 2004.
6. Akhan SÇ: Kronik Hepatit B’de Tanı, “Kronik Hepatitlerin Tanı ve Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar”, Ed. Köksal İ, Leblebicioğlu H, s:86-98, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, 2009.
7. Mısıktık R: Kronik B hepatitinde laboratuvar tanı, *KLİMİK Derg*; 18(1): 32-33, 2005.
8. Horvat RT, Tegtmeier GE: Hepatit B ve D Virüsleri, “Klinik Mikrobiyoloji”, Cilt 2, Ed. Murray RP, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, s:1641-1659, Atlas Kitapçılık; Ankara, 2009.
9. Aydın K: HBeAg Negatif Hastalarda Tedavi, “Kronik Hepatitlerin Tanı ve Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar”, Ed. Köksal İ, Leblebicioğlu H, s:117-127, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, 2009.
10. Değertekin H, Kendal Y: Akut Viral Hepatitler, “Klinik Gastroenteroloji ve Hepatoloji”, Ed. Tözün N, Şimşek H, Özkan H, Şimşek İ, Göran A, s:381-393, Nobel Tıp Kitabevleri, Ankara, 2007.
11. Dündar İH, İnal AS: Geçmişden Günümüze Viral Hepatitler, “Viral Hepatit 2005”, Ed. Tabak F, Balık İ, Tekeli E, VHSD; s:10-20, 2005.
12. Kıyan M: Hepatit B Virüsü, “Viral Hepatit 2002”, Ed. Balık İ, Tekeli E, 2002, <http://www.vhsd.org/dergiler.htm>
13. Kann M, Gerlich WH: Structure and Molecular Virology, “Viral Hepatitis”, Ed. H.C. Thomas, 149-181, Blackwell Publishing, Oxford, 2005.
14. Tözün N, Türe Özdemir F, Eren F: Kronik HBV Enfeksiyonu, “Klinik Gastroenteroloji ve Hepatoloji”, Ed. Tözün N, Şimşek H, Özkan H, Şimşek İ, Göran A, s:395-414, Nobel Tıp Kitabevleri, Ankara, 2007.
15. Strauss J.H, Strauss E.G: Viruses and Human Disease, 1 st Ed., Academic Pres. London, 2002.

16. Schaefer S: Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes; *World J Gastroenterol*; 13(1): 14-21, 2007.
17. Mangisa NP, Smuts HE, Kramvis A, et al: Molecular characterization of duck hepatitis B virus isolates from South African ducks, *Virus Genes*; 28(2): 179–186, 2004.
18. Bartholomeusz A, Schaefer S: Hepatitis B virus genotypes: Comparison of genotyping methods, *Rev Med Virol*; 14: 3–16, 2004.
19. Carter JB and Saunders VA: *Virology: Principles and Applications*, John Wiley & Sons Ltd, s:213-229, Chichester, 2007.
20. Schaefer S, Tolle T, Lottman S and Gerlich WH: *Animal Models and Experimental Systems in Hepatitis B Virus*; “Hepatitis B Virus, Molecular Mechanism in Disease and Novel Strategies For Therapy”, Ed. Koshy R, Caselmann WH, s:51-75 Imperial College, London, 1999.
21. Blumberg BS: *Hepatitis B: The Hunt for a Killer Virus*. 1 st Ed., Princeton University. New Jersey, 2002.
22. Kidd-Ljunggren K, Miyakawa Y and Kidd A.H: Genetic variability in hepatitis B viruses, *J Gen Virol*; 83: 1267-1280, 2002.
23. Tekeli A: Hepatit B Virüsünde Mutasyon ve Önemi, “Viral Hepatit 2005”, Ed. Tabak F, Balık İ, Tekeli E, VHSD; 159-168, 2005.
24. Liang TJ: Hepatitis B: The virus and disease, *Hepatology*; 49(5.Suppl): 13-21, 2009.
25. Bilgiç A, Özacar T: Hepatit B ve D virüsleri, “Temel ve Klinik Mikrobiyoloji”, Ed. Ustaçelebi Ş, Güneş Kitabevi, s:871-881, 1999.
26. Fung J, Lai CL and Yuen MF: Hepatitis B and C virus-related carcinogenesis, *Clin Microbiol Infect*; 15: 964–970, 2009.
27. Yim HJ and Lok ASF: Natural history of chronic hepatitis B virus infection: What we knew in 1981 and what we know in 2005, *Hepatology*; 43(2 Suppl 1), 173-181, 2006.
28. Arslan Ergül A: Hepatit virüslerinin moleküler biyolojisi, *Güncel Gastroenterol*; 7(1): 91-96, 2003.
29. Lüsebrink J, Schildgen V and Schildgen O: HBV, “Virology, Hepatology 2009-A clinical Textbook”, Ed. Mauss S, Berg T, Rockstroh J, Sarrazin C, Wedemeyer H, p:55-74, Flying Publisher, Duesseldorf, 2009.
30. Beck J, Nassal M: HBV replication, *World J Gastroenterol*; 13(1): 48-64, 2007.
31. Kramvis A, Kew M, Francois G: Hepatitis B virus genotypes, *Vaccine*; 23: 2409-2423, 2005.
32. Murray PR, Rosenthal KS and Pfaller MA: *Medical Microbiology*, 6th ed., p:659-665, Mosby Elsevier, Philadelphia, 2009.
33. World Health Organization: Department of Communicable Diseases Surveillance and Response 2: 2002, http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/HepatitisB_whodcsrlyo2002_2.pdf

- 34.** Locarnini S: Molecular virology of hepatitis B virus, *Semin Liver Dis*; 24(Supplement 1): 3-10, 2004.
- 35.** Bruss V: Hepatitis B virus morphogenesis, *World J Gastroenterol*; 13(1): 65-73, 2007.
- 36.** Gilbert RJ, Beales L, Blond D, Simon MN, Lin BY, Chisari FV, Stuart DI and Rowlands DJ: Hepatitis B small surface antigen particles are octahedral, *Proc Natl Acad Sci*; 102(41): 14783-14788, 2005.
- 37.** Polat A, Kandemir Ö, Kayaselçuk F, Ersöz G, Eğilmez R: Kronik B hepatitinde hepatit B yüzey (HBsAg) ve kor antijenlerinin (HBcAg) boyanma özelliklerinin değerlendirilmesi: Histolojik aktivite indeksi ile korelasyon, *Çukurova Üniv Tıp Fak Derg*; 26: 131-136, 2001.
- 38.** Kurbanov F, Tanaka Y and Mizokami M: Geographical and genetic diversity of the human hepatitis B virus, *Hepatology Res*; 40: 14-30, 2010.
- 39.** McMahon BJ: Influence of genotypes and subgenotypes, *Hepatology Int*; 3: 334-342, 2009.
- 40.** Yin JH, Zhao J, Zhang HW, et al: HBV genotype C is independently associated with cirrhosis in community-based population, *World J Gastroenterol*; 16(3): 379-383, 2010.
- 41.** Jazayeri SM, Alavian SM and Carman WF: Hepatitis B virus: Origin and evolution, *J Viral Hepat*; 17(4): 229-235, 2009.
- 42.** Kay A, Zoulim F: Hepatitis B virus genetic variability and evolution, *Virus Res*; 127(2): 164-176, 2007.
- 43.** Andernach IE, Hübschen JM and Muller CP: Hepatitis B virus: The genotype E puzzle, *Rev Med Virol*; 19: 231-240, 2009.
- 44.** Schaefer S: Hepatitis B virus: Significance of genotypes, *J Viral Hepat*; 12: 111-124, 2005.
- 45.** Pujol FH, Navas MC, Hainaut P, Chemin I: Worldwide genetic diversity of HBV genotypes and risk of hepatocellular carcinoma, *Cancer Letters*; 286: 80-88, 2009.
- 46.** Ghany MG, Doo EC: Assessment and management of chronic hepatitis B, *Infect Dis Clin North America*; 20: 63-79, 2006.
- 47.** Datta S: An overview of molecular epidemiology of hepatitis B virus (HBV) in Indian, *Virol J*; 5: 156, 2008.
- 48.** Locarnini S, Omata M: Molecular virology of hepatitis B virus and the development of antiviral drug resistance, *Liver Int*; 26: 11-22, 2006.
- 49.** Huang X, Qin Y, Zhang P, et al: PreS deletion mutations of hepatitis B virus in chronically infected patients with simultaneous seropositivity for hepatitis-B surface antigen and anti-HBs antibodies, *J Med Virol*; 82: 23-31, 2010.
- 50.** El Khouri M, Dos Santos VE: Hepatitis B: Epidemiological, immunological and serological considerations emphasizing mutation, *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo*; 59(4): 216-224, 2004.

51. Hussain M, Chu CJ, Sablon E, Lok ASK: Rapid and sensitive assays for determination of hepatitis B virus (HBV) genotypes and detection of HBV precore and core promoter variants, *J Clin Microbiol*, 41(8): 3699–3705, 2003.
52. Birengel S, Tekeli E: Kronik Hepatitlerin Epidemiyoloji; “Kronik Hepatitlerin Tanı ve Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar”, Ed. Köksal İ, Leblebicioğlu H, s:11-24, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, 2009.
53. Aygen B: Hepatit B enfeksiyonu: www.vhsd.org/doc/Slayt_Viral_Kurs_2009/Hepatit_B_infeksiyonu.pdf
54. Türkoğlu MK, Bozkurt H, Uygan İ, Tuncer İ, Irmak H, Buzgan T, Akdeniz H: Chronic hepatitis delta virus infection in Van region of Eastern Turkey, *Türk J Gastroenterol*; 16 (1): 17-20, 2007.
55. Tabak F, Tosun S, Balık İ, Saltoğlu N, Örmeci N, Şencan İ, Çaylan R, Öztoprak N, Gürbüz Y: Ülkemizde HBV ve HCV Seroprevalansı Değişiyor mu? (2009 verileri), 10. Ulusal Viral Hepatit Kongresi, Kongre Kitabı, s:113, Antalya, 2010.
56. Temiz H, Gül K: Kan vericilerinin HBsAg, Anti-HCV, Anti-HIV ve VDRL test sonuçlarının değerlendirilmesi, *İnfeksiyon Derg*; 22 (2): 79-82, 2008.
57. Çifçili S: Hepatit epidemiyolojisi ve viral hepatitlerden korunma, *Viral Hepatitlerin Tedavisi ve İzlemi*, İstanbul, 2009.
58. Tosun S: Ülkemizde Hepatit Epidemiyolojisinde Değişim, X. Ulusal Viral Hepatit Kongresi, Kongre Kitabı, s:35-37, Antalya, 2010.
59. Badur S: Hepatit B enfeksiyonları: Epidemiyoloji ve aşı, *Klinik Gelişim*; 18(3): 32-43, 2005.
60. Taşyaran M: HBV Enfeksiyonu Epidemiyolojisi, “Viral Hepatit 2002”, Ed: Balık İ, Tekeli E, 2002, <http://www.vhsd.org/dergiler.htm>
61. Kundi M: Geliştirilmiş bir adjuvan sistemi ile hazırlanan yeni bir hepatit B aşısı, *Expert Rev Vaccin (Turkish Edition 1)*; 2: 59-67, 2007.
62. Baumert TF, Thimme R, Weizsäcker F: Pathogenesis of hepatitis B virus infection, *World J Gastroenterol*; 13(1): 82-90, 2007.
63. Kantarçeken B: Kronik Hepatit B-Doğal Seyir, “Viral Hepatit 2009”, Ed. Tabak F, Balık İ, VHSD; 3-22, 2009.
64. Shi YH, Shi CS: Molecular characteristics and stages of chronic hepatitis B virus infection, *World J Gastroenterol*; 15(25): 3099-3105, 2009.
65. Çelik İ, Akbulut A: Kronik Hepatit B ve Delta Hepatitinin Doğal Seyri, “Kronik Hepatitlerin Tanı ve Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar”, Ed. Köksal İ, Leblebicioğlu H, s:25-39, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, 2009.
66. Akçam FZ: Hepatit B virüsü enfeksiyonu, *Sted*; 12(6), 211-214, 2003.
67. Türk Karaciğer Araştırmaları Derneği Kronik B Hepatiti Tanı, Yaklaşım, Tedavi, Takip Kılavuzu 2007.
68. Mert A: İnaktif HBsAg Taşıyıcılığı; “Kronik Hepatitlerin Tanı ve Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar”, Ed. Köksal İ, Leblebicioğlu H, s:166-178, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, 2009.

69. Kasapoğlu B, Türkay C: Okült (Occult) hepatit B enfeksiyonu, *Güncel Gastroenterol* 11/2 ,51-56, 2007
70. Raimondo G, Pollicino T, Cacciola I and Squadrito G: Occult hepatitis B virus infection, *J Hepatol*; 46: 160–170, 2007.
71. Nguyen VTT, Law MG and Dore GJ: Hepatitis B-related hepatocellular carcinoma: Epidemiological characteristics and disease burden, *J Vir Hepat*; 16: 453–463, 2009.
72. Marrero JA: Hepatosellüler Karsinom, *Curr Opin Gastroenterol* (Turkish Edition); 1(3): 153-160, 2006.
73. Özgüneş N: Kronik Hepatitlerde Güncel Durum: Tanı, EKMUD Bilimsel Platformu, Ankara, 2006.
74. Etiz N, Türkoğlu S: Viral Hepatitlerin Tanısında Kullanılan Testler ve Standardizasyon, “Viral Hepatit 2005”, Ed. Tabak F, Balık İ, Tekeli E, VHSD; 127-151, 2005.
75. Centro Laboratuvarları: Hepatit B virüs (HBV) serolojik ve moleküler tanısı; <http://www.centro.com.tr/download/HEPATIT%20B.pdf>
76. Valsamakis A: Molecular testing in the diagnosis and management of chronic hepatitis B, *Clin Microbiol Rev*; 20(3): 426–439, 2007.
77. Osioy C: Detection of HBsAg mutants, *J Med Virol* 78: 48–51, 2006.
78. Viral Hepatit Savaşım Derneği II. Viral hepatit tanı ve tedavi rehberi, *Viral Hepatit Derg*; 13(3): 87-96, 2008.
79. İncioğlu A: Kronik Hepatit B’nin Doğal Seyri; İlerleyişi ve Prognostik Faktörler, Uzmanlık Tezi, İstanbul, 2008.
80. Doğan M: Kronik Hepatit B’de Lamivudin Direnci ve Lamivudin Direnci Gelişimi Üzerine Etkili Faktörler, Uzmanlık Tezi, İstanbul, 2007.
81. Mahtab M, Rahman S, Khan M and Karim F: Hepatitis B virus genotypes: An overview, *Hepatobil Pancreat Dis Int*; 7(5): 457-464, 2008.
82. Yenice N, Mehtap Ö, Nurten A, Gökden Y: Kronik hepatit B enfeksiyonunda lamivudin monoterapisi, interferon alfa monoterapisi ve kombinasyon tedavisi, *Akad Gastroenterol Derg*; 5(1): 31-35, 2006.
83. Gündüz T, Şanlıdağ T, Özbakkaloğlu B, Kütükçüler N: Kronik hepatit B taşıyıcılarının immunolojik göstergeleri, *İnfeksiyon Derg*; 20(3): 189-193, 2006.
84. Bozdayı M: Hepatit B Virüsü: Genotipler Klinik Önemi, 3. Ulusal Viroloji Kongresi, Kongre Kitaplığı, s:172-176, Bursa, 2007.
85. Ayed K, Gorgi Y, Ayed-Jendoubi S, Aouadi H, Sfar I, Najjar T, Abdullah TB: Hepatitis B virus genotypes in Tunisian patients with chronic hepatitis B virus infection, *J Infect*; 54: 291-297, 2007
86. Bozdayı G, Türkyılmaz AR, İdilman R, Karataylı E, Rota S, Yurdaydın C, Bozdayı AM: Complete genome sequence and phylogenetic analysis of hepatitis B virus isolated from Turkish patients with chronic HBV infection, *J Med Virol*; 76(4): 476-481, 2005.

87. Huang Y, Wang Z, An S, Zhou B, Zhou Y, Chan HL, Hou J: Role of hepatitis B virus genotypes and quantitative HBV DNA in metastasis and recurrence of hepatocellular carcinoma, *J Med Virol*; 80: 591–597, 2008.
88. Du H, Li T, Zhang HY, et al: Correlation of hepatitis B virus (HBV) genotypes and mutations in basal core promoter/precore with clinical features of chronic HBV infection, *Liver Int*; 27(2): 240-6, 2007.
89. Liu WC, Phiet PH, Chiang TY, et al: Five subgenotypes of hepatitis B virus genotype B with distinct geographic and virological characteristic, *Virus Res*; 129(2): 212-223, 2007.
90. Tangkijvanich P, Mahachai V, Komolmit P, et al: Hepatitis B virus genotypes and hepatocellular carcinoma in Thailand, *World J Gastroenterol*; 11(15): 2238-2243, 2007.
91. Ozasa A, Tanaka Y, Orito E, et al: Influence of genotypes and precore mutations on fulminant or chronic outcome of acute hepatitis B virus infection, *Hepatology*; 44(2): 326-334, 2006.
92. Sainokami S, Abel K, Sato A, et al: Initial load of hepatitis B virus (HBV), its changing profile and precore/core promoter mutations correlate with the severity and outcome of acute HBV infection, *J Gastroenterol*; 42: 241–249, 2007.
93. Davidson F, Lycett C, Sablon E, Petrik J, Dow BC: Hepatitis B virus genotypes and precore mutations in Scottish blood donors, *Vox Sanguinis*; 88: 87–92, 2005.
94. Olivero A, Ciancio A, Abate ML, Gaia S, Smedile A, Rizzetto M: Performance of sequence analysis, INNO-LiPA line probe assays and AFFIGENE assays in the detection of hepatitis B virus polymerase and precore/core promoter mutations, *J Viral Hepat*; 13:355–362, 2006
95. Erhardt A, Göbel T, Ludwig A, et al: Response to antiviral treatment in patients infected with hepatitis B virus genotypes E-H, *J Med Virol*; 81: 1716– 1720, 2009.
96. Sharma S, Sharma B, Singla B, et al: Clinical significance of genotypes and precore/basal core promoter mutations in HBV related chronic liver disease patients in North India, *Dig Dis Sci*; 55: 794–802, 2010.
97. Chauhan R, Kazim SN, Kumar M, et al: Identification and characterization of genotype A and D recombinant hepatitis B virus from Indian chronic HBV isolates, *World J Gastroenterol*; 14(40): 6228-6236, 2008.
98. Zekri A, Hafez M, Mohamed N, et al: Hepatitis B virus (HBV) genotypes in Egyptian pediatric cancer patients with acute and chronic active HBV infection, *Virol J*; 74(4): 1-7, 2007.
99. Bekondi C, Olinger CM, Boua N, et al: Characterization of hepatitis B virus strains from the central African republic: Preliminary results, *Pathol Biol*; 56(5): 310-3, 2008.
100. Osioy C, Gordon D, Borlang J, Giles E, Villeneuve JP: Distribution of hepatitis B virus genotypes and viral load levels in Brazilian chronically infected patients in Sao Paulo city, *J Gen Virol*; 89, 3009–3015, 2008.

- 101.** Osiowy C, Gordon D, Borlang J, Giles E, Villeneuve JP: Hepatitis B virus genotype G epidemiology and co-infection with genotype A in Canada, *J Gen Virol*; Dec; 89(Pt 12): 3009-15, 2008.
- 102.** Esquivel C, Sablon E, CJ González, Figueroa LJ, Maya LR, Benavides SA: Molecular analysis of hepatitis B virus isolates in Mexico: Predominant circulation of hepatitis B virus genotype H, *World J Gastroenterol*; 12(40): 6540-6545, 2006.
- 103.** Milani S, Sharifi Z, Hosseini M, Shooshtari MM: Determination of HBV genotypes among HBs Ag positive blood donors in Tehran, Iran using PCR-RFLP, *Iranian J Publ Health*; 38(1): 41-47, 2009.
- 104.** Bahramali G, Sadeghizadeh M, Olyae SA, et al: Clinical, virologic and phylogenetic features of hepatitis B infection in Iranian patients, *World J Gastroenterol*; 14(35): 5448-5453, 2008.
- 105.** Mohebbi SR, Amini-Bavil-Olyae S, Zali N, et al: Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Iran, *Clin Microbiol Infect*; 14: 858–866, 2008.
- 106.** Leblebicioğlu H, Eroğlu C; Members of the hepatitis study group: Acute hepatitis B virus infection in Turkey: Epidemiology and genotype distribution, *Clin Microbiol Infect.*; 10(6): 537-41, 2004.
- 107.** Sünbül M, Leblebicioğlu H: Distribution of hepatitis B virus genotypes in patients with chronic hepatitis B in Turkey, *World J Gastroenterol*; 11(13): 1976-1980, 2005.
- 108.** Yalçın K, Değertekin H, Bahcecioglu IH, et al: Hepatitis B virus genotype D prevails in patients with persistently elevated or normal ALT levels in Turkey, *Infection*; 32(1): 24-9, 2004.
- 109.** Bozdayı AM, Aslan N, Bozdayı G, et al: Molecular epidemiology of hepatitis B, C and D viruses in Turkish patients, *Arch Virol.*; 149(11): 2115-29, 2004.
- 110.** Serin MS, Akkiz H, Abaylı B, Öksüz M, Aslan G, Emekdaş G: Genotyping of hepatitis B virus isolated from chronic hepatitis B patients in the south of Turkey by DNA cycle-sequencing method, *Diag Microbiol Infect Dis*; 53(1): 57-60, 2005.
- 111.** Saymer AA, Özcan A, Sengönül A: Naturally Occurring MHR variants in Turkish patients infected with hepatitis B virus, *J Med Virol*; 80: 405–410, 2008.
- 112.** Sertöz RY, Erensoy S, Pas S, Özacar T, Niesters H: Restriction fragment length polymorphism analysis and direct sequencing for determination of HBV genotypes in a Turkish population, *New Microbiol.*; 31(2): 189-94, 2008.
- 113.** Akhan S, Gürel E, Sayan M: Kronik hepatit B hastalarının beş yıllık tedavi sonuçlarının değerlendirilmesi, *KLİMİK Derg*; 22(3): 82-7, 2009.
- 114.** Çakaloğlu Y, Akyüz F, Bozacı M, et al: Prevalence and clinical significance of SEN-H virus in chronic hepatitis B, C and delta infections in Turkey, *Turk J Gastroenterol*; 19(2): 104-108, 2008.
- 115.** Sayan M, Akhan SC, Meric M: Naturally occurring amino–acid substitutions to nucleos(t)ide analogues in treatment naïve Turkish patients with chronic hepatitis B, *J Viral Hepat*; 17: 23–27, 2010.

- 116.** Aksoy A, Özdamar A: Genotyping of hepatitis B virus by restriction enzyme analysis, *Mikrobiyol Bül*; 40(3):215-23, 2006
- 117.** Özdamar M, Özdamar E, Barsgan A, Koruk M: Mutations in the S gene region of hepatitis B virus genotype D in Turkish patients, *J Gen*; 86(3): 195-201, 2007
- 118.** Uysal P, Oğuzoğlu N, Özer A: Genotype analysis of hepatitis B virus in the Turkish population using restriction fragment length polymorphism patterns, *Marmara Med J*; 14(4): 213-216, 2001
- 119.** Onganer PU, Oğuzoğlu N, Özer A: Mutation and genotype analysis of hepatitis B virus on acute and chronic infected selected patients in Turkey, *J Cell Mol Biol*; 5: 33-42, 2006.
- 120.** Özaras R, Tabak F, Sayan M, et al: Hepatit B Virüsünün Tiplendirilmesinde Kesinlik: Genotiplleme, Subgenotiplleme ve Rekombinasyon, X.Ulusal Viroloji Kongresi, Kongre Kitabı, s:97-98, Antalya, 2010.
- 121.** Özbilge H, Zeyrek FY, Mızraklı AU, Tümekaya B: Hepatit B virus DNA pozitifliği ve serolojik testler, *Erciyes Tıp Derg*; 27(1): 17-21, 2005.
- 122.** Gish RG, Locarnini S: Genotyping and genomic sequencing in clinical practice, *Clin Liver Dis*; 11: 761–795, 2007.
- 123.** Yang HI, Yeh SH, Chen PJ, et al: Associations between hepatitis B virus genotype and mutants and the risk of hepatocellular carcinoma, *J Natl Cancer Inst*; 100(1): 1134-1143, 2008.
- 124.** Kusumoto K, Yatsushashi H, Nakao R, et al: Detection of HBV core promoter and precore mutations helps distinguish flares of chronic hepatitis from acute hepatitis B, *J Gastroenterol Hepatol*; 23: 790–793, 2008.
- 125.** Huang YH, Wu JC, Chang TT, et al: Association of core promoter/precore mutations and viral load in E antigen-negative chronic hepatitis B patients, *J Viral Hepat*; 13: 336–342, 2006.
- 126.** Chu CJ, Keeffe EB, Han SH, et al: Prevalence of HBV precore/core promoter variants in the United States, *Hepatology*; 38:619-628, 2003.
- 127.** Pourkarim MR, Amini-Bavil-Olyae S, Verbeeck J, et al: Molecular evolutionary analysis and mutational pattern of full-length genomes of hepatitis B virus isolated from Belgian patients with different clinical manifestations, *J Med Virol*; 82: 379–389, 2010.
- 128.** Abbas Z, Muzaffar R, Siddiqui A, Naqvi SA, Rizvi SA: Genetic variability in the precore and core promoter regions of hepatitis B virus strains in Karachi, *BMC Gastroenterol*; 20(6): 1-6, 2006.
- 129.** Bozdayı AM, Bozkaya H, Türkyılmaz A, et al: Polymorphism of precore region of hepatitis B virus DNA among patients with chronic HBV infection in Turkey infection; 27(6): 357-360, 1999.
- 130.** Özgenç O, Özacar T, Erensoy S, İnan N, Ari A, Kuruüzüm Z, Bilgiç A: Clinical significance of basal core promoter and precore mutations in chronic hepatitis B, *Hepatogastroenterology*; 54(80): 2319-23, 2007.

131. Bozdayı AM, Bozkaya H, Türkyilmaz AR, 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*; 21(1): 91-101, 2001.

132. Bayraktar Y, Köseoglu T, Temizer A, Kayhan B, Van Thiel DH, Uzunalimoğlu B: Relationship between the serum alanine aminotransferase level at the end of interferon treatment and histologic changes in wild-type and precore mutant hepatitis B virus infections, *J Viral Hepat*; 3(3): 137-42, 1996.

133. Qutub MO, Germer JJ, Rebers SP, Mandrekar JN, Beld MG, Yao JD: Simplified PCR protocols for INNO-LiPA HBV genotyping and INNO-LiPA HBV precore assay, *J Clin Virol*; 37(3): 218-221, 2006.

134. Peng XM, Huang GM, Li JG, Huang YS, Mei YY, Gao ZL: High level of hepatitis B virus DNA after HBeAg to anti-HBe seroconversion is related to coexistence of mutations in its precore and basal core promoter, *World J Gastroenterol*; 11(20): 3131-3134, 2005.

7. ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Adana’da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Konya’da tamamladı. 1996 yılında Konya Meram Anadolu Lisesi’nden mezun olup, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesini kazandı. 2002 yılında tıp fakültesinden mezun oldu. Aynı yıl Van’a gelerek Aralık 2002’de Van’da pratisyen hekim olarak göreve başladı. 2003-2005 yıllarında Van ve İstanbul’da pratisyen olarak görev yaptı. 2005 Nisan TUS’unda Y.Y.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji bölümünü kazandı ve 2005 Ağustos tarihinde uzmanlık eğitimine başladı. Halen bu bölümde Araştırma Görevlisi olarak eğitimine devam etmektedir. Evli ve 1 kız çocuğu annesidir.