

**T.C.  
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**AFYON BÖLGESİNDE SAPTANAN HBV VE HCV  
ETKENLERİNDE GENOTİP BELİRLENMESİ, MUTASYON  
VE İLAÇ DİRENCİNİN ARAŞTIRILMASI**

**“UZMANLIK TEZİ”**

**Dr. Raike KALAYCI**

**AFYONKARAHİSAR 2008**

**T.C.  
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**AFYON BÖLGESİNDE SAPTANAN HBV VE HCV  
ETKENLERİNDE GENOTİP BELİRLENMESİ, MUTASYON  
VE İLAÇ DİRENCİNİN ARAŞTIRILMASI**

**“UZMANLIK TEZİ”**

**Dr. Raike KALAYCI**

**Danışman: Doç. Dr. Mustafa ALTINDIŞ**

**AFYONKARAHİSAR 2008**

**T.C.**  
**AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Tez Başlığı** :Afyon Bölgesinde Saptanan HBV ve HCV  
Etkenlerinde Genotip Belirlenmesi, Mutasyon ve İlaç Direncinin Araştırılması

**Tezi Hazırlayan** :Dr.Raike KALAYCI

**Tez Savunma Tarihi** :16.06.2008

**Tez Danışmanı** :Doç. Dr. Mustafa ALTINDIŞ

İş bu çalışma jürimiz tarafından MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI'ında TIPTA  
UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN

Doç.Dr.Orhan Cem AKTEPE

ÜYE

Doç.Dr.Mustafa ALTINDIŞ

ÜYE

Doç.Dr.Zafer ÇETİNKAYA

ONAY

DEKAN

Prof.Dr.Necat İMİRZALIOĞLU

## **TEŐEKKÜR**

Tez çalıŐmalarım ve uzmanlık eğitimim sűresince, bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım değerli tez danıŐmanım Doç. Dr. Mustafa ALTINDİŐ hocama yardımları için teŐekkűr ederim.

Anabilim Dalı BaŐkanımız deđerli hocam Doç. Dr. Orhan Cem AKTEPE baŐta olmak űzere, uzmanlık eđitimim ve tez çalıŐmalarım sűresince katkı ve desteklerini esirgemeyen deđerli hocalarım Doç. Dr. Zafer ÇETİNKAYA ve Yrd. Doç. Dr. İhsan Hakkı ÇİFTCİ'ye teŐekkűr ederim.

Tezimi alıŐtıđım sűrece ve eđitimim boyunca birlikte çalıŐtıđım, yardımlarını gűrdűđűm asistan arkadaşlarıma ve tűm laboratuvar çalıŐanlarına teŐekkűr ederim.

## İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR.....	IV
TABLO LİSTESİ.....	VI
ŞEKİL LİSTESİ.....	VII
I-GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
II-GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. HEPATİT B VİRÜSÜ.....	3
2.1.1. TARİHÇE.....	3
2.1.2. SINIFLANDIRMA.....	4
2.1.3. VİRÜSÜN YAPISI.....	4
2.1.4. VİRAL GENOMUN YAPISI.....	4
2.1.5. VİRÜS PROTEİNLERİ.....	5
2.1.6. REPLİKASYON.....	7
2.1.7. GENOTİP VE SUBTİPLER.....	9
2.1.8. MUTASYONLAR.....	10
2.1.9. PATOGENEZ.....	12
2.1.10. KLİNİK.....	13
2.1.11. TANI.....	14
2.1.12. KRONİK B HEPATİTİNDE TEDAVİ.....	16
2.1.13. EPİDEMİYOLOJİ.....	18
2.2. HEPATİT C VİRÜSÜ.....	20
2.2.1. TARİHÇE.....	20
2.2.2. SINIFLANDIRMA, TAKSONOMİ VE GENOTİPLER.....	21
2.2.3. VİRÜSÜN YAPISI.....	21
2.2.4. VİRAL GENOMUN YAPISI.....	22
2.2.5. VİRAL PROTEİNLER.....	22
2.2.6. REPLİKASYON.....	24
2.2.7. HCV MUTASYONLARI.....	25
2.2.8. PATOGENEZ.....	27
2.2.9. İMMÜNİTE.....	28
2.2.10. KLİNİK.....	29
2.2.11. TANI.....	30

2.2.12. TEDAVİ.....	33
2.2.13. EPİDEMİYOLOJİ.....	33
III-GEREÇ VE YÖNTEM.....	35
3.1. ARAÇ VE MALZEMELER.....	36
3.2. YÖNTEM.....	37
3.2.1. HBV.....	38
3.2.1.1. Serum Örneklerinden HBV DNA Ekstraksiyonu.....	38
3.2.1.2. HBV DNA'nın PCR ile Saptanması.....	40
3.2.1.3. Agaroz Jel Elektroforezi-I.....	41
3.2.1.4. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması.....	42
3.2.1.5. Agaroz Jel Elektroforezi-II.....	42
3.2.1.6. Dizi Analizi reaksiyonu.....	42
3.2.1.7. Dizileme Çöktürme-Saflaştırma.....	43
3.2.1.8. Dizi Analizi.....	44
3.2.2. HCV.....	44
3.2.2.1. Serum Örneklerinden HCV RNA Ekstraksiyonu.....	44
3.2.2.2. HCV RNA'nın PCR ile Saptanması.....	45
3.2.2.3. Agaroz Jel Elektroforezi-I.....	46
3.2.2.4. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması.....	47
3.2.2.5. Agaroz Jel Elektroforezi-II.....	47
3.2.2.6. Dizi Analizi reaksiyonu.....	47
3.2.2.7. Dizileme Çöktürme/Saflaştırma.....	48
3.2.2.8. Dizi Analizi ve Filogenetik Analiz.....	49
IV-BULGULAR.....	50
V-TARTIŞMA.....	61
VI-SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	75
VII-ÖZET.....	77
VIII-SUMMARY.....	78
IX-KAYNAKLAR.....	80
X-EKLER.....	100

## KISALTMALAR

HAV	: Hepatitis A Virus
HBV	: Hepatitis B Virus
HDV	: Hepatitis D Virus
HCV	: Hepatitis C Virus
HEV	: Hepatitis E Virus
HGV	: Hepatitis G Virus
TTV	: Transfusion Transmitted Virus
CMV	: Cytomegalovirus
EBV	: Epstein-Barr Virus
HSV	: Herpes Simplex Virus
LAM	: Lamivudine
HCC	: Hepatocellular carcinoma
IFN	: Interferone
HBsAg	: Hepatitis B surface antigen
Au Ag	: Avustralia antigen
WHV	: Woodchuck Hepatitis Virus
GSHV	: Ground Squirrel Hepatitis Virus
DHBV	: Duck Hepatitis B Virus
HBcAg	: Core antigen
HBeAg	: Infektivitey antigen
DR	: Direct Repeat
ORF	: Open reading frame
LHBs	: Large surface antigen
MHBs	: Middle surface antigen
SHBs	: Small surface antigen
RT	: Revers transcriptase
RNase H	: Endonuclease
MHC	: Major Histocompatibility complex
RcDNA	: Relaxed circular DNA
ADV	: Adefovir Dipivoxil
Th	: T helper lymphocyte
Tc	: T cytotoxic lymphocyte

IL-2	: Interleukin-2
IL-4	: Interleukin-4
IL-5	: Interleukin-5
IL-10	: Interleukin-10
TNF-alfa	: Tumor necrosis factor-alpha
HBIG	: Hepatitis B immunoglobuline
FDA	: Food and Drug Administration
ALT	: Alanine aminotransferase
NANB	: Non-A, non-B
ICVT	: International Committee on Taxonomy of Viruses
GBV-B	: GB virus B
NCR	: Non coding region
NS5B	: Non-structural protein 5B
C	: Core
E1	: Envelope 1
E2	: Envelope 2
NS1	: Non structural protein 1
NS2	: Non structural protein 2
NS3	: Non structural protein 3
NS4A	: Non structural protein 4A
NS4B	: Non structural protein 4B
NS5A	: Non structural protein 5A
HVR1	: Hypervariable region 1
HVR2	: Hypervariable region 2
ARFP/F	: Alternative reading frame protein/Frameshift protein
LDLR	: Low density lipoprotein receptor
UTR	: Untranslated region
RT-PCR	: Reverse transcriptase-PCR
LKM-1	: Liver Kidney Monkey-1
AFP	: Alpha-fetoprotein
RIBA	: Recombinant immunoblot assay
TMA	: Transcription-mediated amplification
cccDNA	: Covalently closed circular DNA



## TABLO LİSTESİ

Tablo-I	:Dünya'daki HBV genotip ve subtiplerinin coğrafi dağılımı.....9
Tablo-II	:Dünya'da HBV endemisite bölgeleri.....19
Tablo-III	:Buffer AL, Carrier RNA/AVE Tablosu.....40
Tablo-IV	:HBV'li hasta sonuçları.....51
Tablo-V	:HCV'li hasta sonuçları.....52
Tablo-VI	:HBV/HCV'li hastaların yaş ve cinsiyete göre dağılımı.....53
Tablo-VII	:Risk faktörlerine göre enfeksiyon etkenlerinin dağılımı.....54
Tablo-VIII	:HBV mutasyonlarının dağılımı.....55
Tablo-IX	:HBV mutasyonlarının hasta gruplarına göre dağılımı.....56
Tablo-X	:HBV ilaç direncinin dağılımı.....57
Tablo-XI	:Çalışmada saptanan HCV genotiplerinin dağılımı.....60
Tablo-XII	:Türkiye'de değişik merkezlerde yapılan HBV genotip tayini.....63
Tablo-XIII	:Türkiye'de değişik merkezlerde yapılan HCV genotip tayini.....73

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil-1	:HBV'nin Genom Organizasyonu.....	5
Şekil-2	:Akut HBV enfeksiyonunda serolojik göstergeler.....	15
Şekil-3	:Kronik HBV enfeksiyonunda serolojik göstergeler.....	15
Şekil-4	:HCV'nin genom organizasyonu ve kodladığı proteinler.....	22
Şekil-5	:ABI Prizm cihazında HCV-24 numaralı örneğin nükleotid dizilimi.....	58
Şekil-6	:MEGA Programında HCV-24 numaralı örneğin genotipleme ve filogenetik ağaçtaki konumu.....	59

## I-GİRİŞ VE AMAÇ

Viral hepatitler, karaciğer hücre nekrozu ve inflamasyonu ile karakterize sistemik virüs enfeksiyonlarıdır. Viral hepatit tablosundan başlıca hepatit A virüsü (HAV), hepatit B virüsü (HBV), hepatit D virüsü (HDV), hepatit C virüsü (HCV) ve hepatit E virüsü (HEV) sorumludur. Bunun yanısıra hepatit G virüsü (HGV), Transfusion Transmitted Virus (TTV), SEN-V, Sitomegalovirüs (CMV), Epstein-Barr virüsü (EBV), Herpes Simpleks Virüs (HSV) gibi virüsler de hepatit etkeni olabilmektedir (1).

HBV, dünya nüfusunun üçte birinin karşılaştığı ve 400-500 milyon taşıyıcısı olan önemli bir enfeksiyon hastalığı etkenidir (2). Ülkemiz bu enfeksiyon açısından orta derecede endemik bir bölgede yer almaktadır. Taşıyıcılık oranı, bölgesel farklılıklar gösterse de yaklaşık %6 civarındadır (3). Asemptomatik enfeksiyondan fulminant hepatite, inaktif taşıyıcılıktan karaciğer sirozu ve karaciğer kanseri gibi değişik klinik tablolara neden olabilmektedir (4).

HBV enfeksiyonundaki karaciğer hasarı, virüse karşı oluşan hücresel ve humoral immun yanıt sonucunda gelişmektedir. Enfeksiyonun seyrini yaş, konağa ait genetik faktörler ve virüsün genetik değişkenliği etkilemektedir. Genetik değişkenlik, taşıyıcı popülasyonlarda görülen genotipik farklılıklar ya da enfekte konakta ortaya çıkan mutasyonlar şeklinde görülmektedir (5). HBV patojenesinde genotipik farklılıkların rolü ve genotiplerin enfeksiyonun klinik seyri üzerine etkisi henüz tam olarak açıklanamamıştır. Ancak bulgular genotipler arasında klinik ve patojenik farklılıklar olduğunu desteklemektedir (5,6). Bu nedenle hastalığın başlangıcında genotipin belirlenmesi, klinik yaklaşımların daha bilinçli gerçekleştirilmesine olanak sağlayacaktır.

Kronik HBV enfeksiyonunun tedavisinde interferon, nükleozid ve nükleozid analogları kullanılmaktadır. Nükleozid analoglarından olan lamivudin (LAM), en sık tercih edilen ilaçtır. İlacın kullanıldığı süreyle orantılı olarak yıllar içerisinde direnç gelişiminde artış gözlenmektedir. Birinci yıl %15 olan direnç oranı, dördüncü yılda %67'ye yükselmektedir (7). Tedavi başarısını izlemek ve

başarısızlık halinde alternatif ilaçlarla tedaviye devam edebilmek için, LAM'e karşı direnç gelişiminin saptanması önemlidir (8,9).

HCV'nin, tüm dünyada yaklaşık 170 milyon insanı enfekte ettiği bildirilmektedir. Bir başka ifadeyle dünya nüfusunun yaklaşık %3'ü kronik HCV taşıyıcısıdır. Türkiye'de toplumda HCV görülme sıklığı %0.3-1.8 (ortalama %0.5) arasındadır (10). Akut hepatitlerin %20'sinden, kronik hepatitlerin %70'inden, son dönem sirozun %40'ından, hepatosellüler karsinomun (HCC) %60'ından ve karaciğer transplantasyonunun %30'undan HCV sorumlu tutulmaktadır (11,12).

HCV'nin aşırı genetik heterojenitesi nedeniyle, 6 major genotipi ve 100'den fazla subtipi bulunmaktadır. Genotip 1, 2 ve 3 tüm dünyada bulunurken, diğerleri coğrafi bölgelere göre farklılıklar göstermektedir. Bu genotipler arasında interferona (IFN) yanıt açısından da farklılıklar bulunmaktadır. Tip 1 ve 4, IFN'a daha dirençli iken; tip 2 ve 3, IFN tedavisine daha iyi yanıt vermektedir. Bu nedenle tedavi öncesi genotipleme yapılması gerekmektedir (13,14).

Bu çalışmada Afyonkarahisar bölgesinde saptanan kronik HCV'li hastalarda genotip; LAM tedavisi hiç uygulanmamış ya da halen LAM tedavisi almakta olan kronik HBV'li hastalarda ise genotip, mutasyon ve ilaç dirençlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## II-GENEL BİLGİLER

### 2.1. HEPATİT B VİRÜSÜ

#### 2.1.1. TARİHÇE

Virüslerin neden olduğu hepatit, ilk olarak milattan önce 5. yüzyılda tanımlanmıştır. 19. yüzyılda ise viral hepatite bağlı salgınlar dikkat çekmiştir. Bu salgınlar muhtemelen HAV'üne bağlıdır (15).

Direkt kan ve kan ürünleri ile bulaşan hepatit formu ilk kez 1883'de Almanya Bremen'de, Lurman tarafından çiçek aşısı kampanyası sırasında tersane çalışanları arasında çıkan salgında tanımlanmıştır. Daha sonra 20. yüzyılın ilk yarısında kızamık ve kabakulak immun 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 başlamış; II. Dünya Savaşı sırasında kan transfüzyonu yapılan askerlerde ciddi sorunlara neden olmuştur (16).

Mc Callum ve Bauer, 1947 yılında enfeksiyöz hepatit için 'hepatit A', serum hepatiti için ise 'hepatit B' deyimlerini kullanmıştır. Krugman ve ark.'ları 1960'lı yıllarda yaptıkları çalışmalarla inkübasyon süreleri farklı olan iki hepatit etkeni belirlemiş, bunların HAV ve HBV olduğunu ortaya koymuş ve hepatit B aşısının gelişiminde de büyük rol oynamışlardır. HBV'nin tarihçesinde 1965 yılı dönüm noktasıdır. Serum proteinlerinde kalıtsal polimorfizmi araştıran Blumberg ve arkadaşları, Avustralya'lı bir yerlinin serumunda, çok sayıda kan transfüzyonu yapılmış bir hastanın serumu ile agar jelde presipitasyon veren bir antijen bulunduğunu göstermiş ve günümüzde 'hepatit B yüzey antijeni- HBsAg' olarak bilinen bu proteine 'Avustralya antijeni-Au ag' adını vermişlerdir. 1970'de Dane ve ark.'ları elektron mikroskopik incelemelerde üç değişik partiküle rastlamışlardır. Bunlardan enfektif özelliğe sahip 42 nm çapında olanına, 'Dane partikülü' adı verilmiş ve sonraki yıllarda, kor antijeni, DNA polimeraz ile viral DNA tanımlanmıştır (16,17).

### 2.1.2. SINIFLANDIRMA

HBV, kanatlı ve memelilerde enfeksiyon oluşturan *Hepadnaviridae* ailesinde sınıflandırılmaktadır. Ördekler, ağaçkakanlar ve sincaplarda da tarif edilmiştir. Hücre kültüründe üretilmemesi ve uygun hayvan modelinin olmaması nedeniyle Ağaçkakan ve Kaz Hepatit Virüsleri çalışmalarda sıklıkla kullanılan hayvan hepatit modelleri olarak karşımıza çıkmaktadır. HBV, sadece insanları ve şempanzeleri enfekte etmektedir (16,18).

*Hepadnaviridae* ailesinde bulunan virüslerin, memeli hayvan virüslerinin bulunduğu *Orthohepadnavirüs* ‘‘HBV, ‘Woodchuck Hepatitis Virüs’ (WHV), ‘Ground Squirrel Hepatitis Virüs’ (GSHV)’’ ve kanatlı hayvan virüslerinin bulunduğu *Avihepadnavirüs* ‘‘Duck Hepatitis B Virüs (DHBV)’’ olmak üzere iki cins altında sınıflandırılması önerilmektedir (16,18).

### 2.1.3. VIRÜSÜN YAPISI

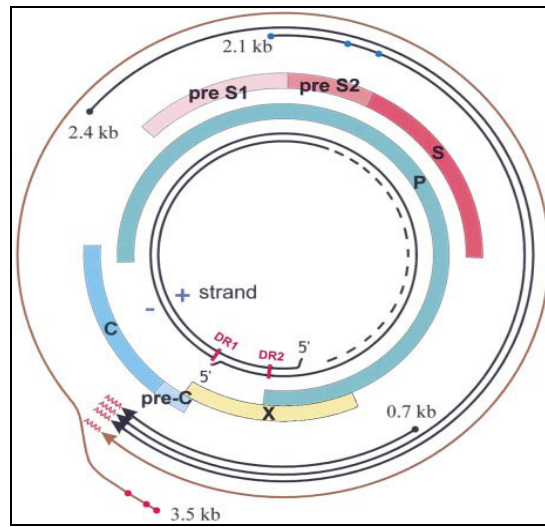
*Hepadnaviridae* ailesinin *Orthohepadnavirus* genusunda yer alan, 42 nm çapında, sferik biçimde ve zarflı bir DNA virüsüdür. Kısmen çift sarmallı olan 3,2 kb uzunluğunda, sirküler DNA genomu içerir. Konak hücreden kazanılmış olan lipid zarf üzerinde üç formda HBsAg bulunur: büyük (L), orta (M) ve küçük (S) yüzey antijenleri. Virüsün kapsidi 27 nm çapındadır; çekirdek antijeni (HBcAg), enfektivite antijeni (HBeAg), viral genom ve polimeraz enzimini içerir (19).

### 2.1.4. VİRAL GENOMUN YAPISI

Kısmen çift sarmallı, halka şeklinde bir DNA genomuna sahiptir. HBV DNA’sı, 3200 nükleotidden oluşan uzun (negatif veya L) ve 1800-2700 nükleotidden oluşan kısa (pozitif veya S) zincir olmak üzere iki sarmaldan meydana gelmiştir. Bu zincirler ortak baz çiftlerine sahip olup, sirküler bir formda bulunmakla beraber 3’ ve 5’ uçları birleşik olmadığından, aslında lineer moleküllerdir. HBV DNA’sının çembersel bütünlüğü her iki zincirin 5’ uçlarında yer alan iki ayrı kohezif bölgenin birbirlerine tutunması ile gerçekleşir. Her iki zincirin kohezif bölgelerinde 10-12 baz çiftinden oluşan, birbirine eş nükleotid dizileri bulunur. ‘Direct Repeat (DR)’ denilen bu bölgeler 1826. ve 1592. nükleotidlerden başlar ve sırasıyla DR1 ve DR2 olarak adlandırılırlar. Genomda birbiriyle örtüşen dört ayrı protein kodlayıcı nükleik asit dizisi (open reading frame-ORF) bulunur (16,19).

HBV DNA'sındaki genler bazı bölgelerde içiçe girmiş, birbirleriyle çakışmış durumdadırlar. Genomun en uzun geni olan P geni; X ve C genleri ile kısmen, S geni ile tamamen çakışmış halde bulunmaktadır. Bu özellik nedeni ile HBV, kendini kodlama kapasitesi en fazla olan virüstür (16).

S geni yüzey proteinlerini, C geni kapsid proteinlerini, X geni X proteinini ve P geni de DNA polimerazı kodlamaktadır. Ancak başlangıç kodonları farklı olduğu için S geni üzerinde pre-S1, Pre-S2 ve S olmak üzere üç, C geni üzerinde pre-C ve C olmak üzere iki farklı başlangıç kodonu bulunmaktadır (19).



Şekil-1. HBV'nin Genom Organizasyonu (20)

## 2.1.5. VİRÜS PROTEİNLERİ

HBV'nin; yüzey proteinleri, kor proteinleri, polimeraz proteini ve X proteini olmak üzere dört temel proteini tanımlanmıştır (15).

### 2.1.5.1. Yüzey (Kılıf) Proteinleri

Genomun S bölgesi, 3 farklı protein kodlar. Büyük zarf proteini (LHBs), pre-S1, pre-S2 ve S ORF'leri tarafından kodlanmaktadır. Orta zarf proteini (MHBs), pre-S2 ve S ORF'lerinin ürünü iken, temel zarf proteini (SHBs, HBsAg), yalnızca S ORF'sinin ürünüdür (15,16).

#### **2.1.5.1.1. LHBs**

Pre-S1, pre-S2 ve S ORF'leri tarafından kodlanır. En fazla Dane partiküllerinin yüzeyinde bulunur. LHBs'nin 21-47. aminoasitleri arasındaki bölgenin hepatositlere tutunma özelliğine sahip olduğu saptanmıştır (16,21).

#### **2.1.5.1.2. MHBs**

Pre-S2 ve S ORF'leri tarafından kodlanır. Replikasyonun olmadığı durumlarda HBsAg içinde yer almaz. Bu nedenle M proteini viral replikasyonun bir göstergesi olarak kabul edilir. M proteininin 124-147. aminoasitleri arasındaki bölgeye karşı gelişen antikorlar tüm HBV subtiplerine karşı koruyucudur (16,22).

#### **2.1.5.1.3. SHBs**

S ORF'si tarafından kodlanır. Zarfın major proteini olarak bilinir. HBsAg üzerinde en az 5 antijenik determinant (a, d/y ve w/r) bulunduğu saptanmıştır. 'a' determinantı 124-147. aminoasitler arasındaki hidrofilik bir bölgedir ve bütün subtiplerde yer almaktadır. 'a' determinantına karşı oluşan antikorlar HBV'nin hepatositlere bağlanmasını engeller ve tüm subtiplere karşı etkili bir bağışıklık sağlar. Viryonun dış yüzünde bulunan 'a' determinantı; aşı veya doğal enfeksiyon sonrası oluşan antiHBs'lerin büyük kısmını bağlama özelliğine sahiptir (15,16).

#### **2.1.5.2. Kor Proteinleri**

Pre C ve C olmak üzere iki bölgeye ayrılan C geni, antijenik özellikleri farklı iki değişik protein (HBeAg ve HBcAg) sentezleme yeteneğine sahiptir. Pre C bölgesi, 29 aminoasitlik bir peptidin üretiminden sorumludur. Bu peptid sentez sırasında oluşan polipeptidin konak hücre endoplazmik retikulumuna yönlendirilmesini sağlar. C bölgesi 183 aminoasitten oluşan bir polipeptid (p23<sup>c</sup>) sentezler. p23<sup>c</sup>'nin karboksi terminal ucundaki 34 aminoasitlik bölümün viral DNA'ya bağlanmadan sorumlu olduğu düşünülmektedir (16).

#### **2.1.5.2.1. HBcAg**

C gen bölgesinden, HBcAg'nin öncülü olan p23<sup>c</sup> sentezlenir. p23<sup>c</sup>, endoplazmik retikuluma gidemez, konak hücre sitoplazmasında kalır, HBcAg'ye dönüşür ve karboksi terminal ucundaki 34 aminoasitlik kısım sayesinde viral DNA'ya sıkıca bağlanır. HBcAg sıklıkla intranükleer yerleşimlidir. Ancak aktif



hastalık döneminde ve aşırı replikasyon gösteren olgularda sitoplazmada da yaygın olarak saptanabilir. Dolaşımında serbest halde HBcAg'ye rastlanmaz (16).

#### **2.1.5.2.2. HBeAg**

Okuma prekor bölgesinden başlarsa, p25c sentezlenir. Bu polipeptid HBeAg'nin öncülüdür. Pre-C bölgesi tarafından kodlanan ilk 29 aminoasitlik kısım, konakçı hücre endoplazmik retikulumuna yönlendirilir ve 34 aminoasitlik bir kısım kesilir. Buradan HBeAg, ya golgi cisimciğine yönlendirilerek hücre dışına salınır ya da çekirdeğe yönlendirilir. HBeAg, persistan enfeksiyonun oluşması için gereklidir. Virüs ile enfekte hepatositlere karşı bağışıklık artınca HBeAg elimine olur, viral yük belirgin olarak düşer (16,23).

#### **2.1.5.3. P Proteini**

P geni, HBV genomunun en uzun genidir ve 832 aminoasitlik bir protein sentezler. P geni revers transkriptaz aktivitesine sahip bir polipeptid kodlar. Bu protein; revers transkriptaz (RT), endonükleaz (RNase H) ve hem DNA hem de RNA'ya bağımlı polimeraz aktivitesine sahiptir (16,24).

#### **2.1.5.4. X Proteini**

X geni, HBV genomundaki en küçük gen bölgesidir. X geni, iki protein sentezler. Bu gen tarafından sentezlenen HBxAg, küçük bazik bir proteindir (16). X proteininin in vitro olarak viral genleri ve konak Major Histokompatibilite Kompleksi (MHC) genlerini aktive ettiği gösterilmiştir. Bu protein viral genom transkripsiyonu ve kronik enfeksiyonda HCC gelişmesinden sorumludur (25).

#### **2.1.6. REPLİKASYON**

HBV'nin insan hepatositlerine tutunma ve giriş için kullandığı yüzey molekülleri kesin olarak aydınlatılamamıştır. Pre-S1 bölgesinin hedef hücreye tutunmada önemli görev taşıyan epitoplara içerdiği saptanmıştır. Pre-S1 bölgesinde tutunma aktivitesinden sorumlu kısım 21-47. aminoasitler olarak tanımlanmış, bu bölgenin virüsün HepG2 tutunması için gerekli ve yeterli olduğu saptanmıştır. Daha sonra yapılan mutagenез çalışmalarında ise bu epitop içerisinde yer alan QLDPAF dizisi tanımlanmıştır. Bu dizinin birçok viral, bakteriyel ve hücre proteinlerinde bulunan bir epitop olması, ayrıca bu ve benzeri dizileri taşıyan proteinlerin hücreye tutunma ve membran füzyonu olaylarında

görev alması; birçok mikroorganizma tarafından hedef hücrelere bağlanmak için benzer moleküllerin kullanıldığına işaret etmektedir. HBV'nin organ ve doku özgülüğünün belirlenmesinde, pre-S1 kısımlarının da etkili olduğu bilinmektedir. Diğer ilginç bir nokta ise X proteininin de amino terminalinde benzer QLDPAR dizisi taşımasıdır. Bu bölgenin pre-S1 tutunma bölgesi ile olan benzerliği, X proteininin de hücreye tutunmada rol oynaması olasılığını akla getirmektedir. Tutunma sonrasında virüs zarfı ve hücre membranı arasında füzyon meydana gelir ve nükleokapsid sitoplazmaya salınır. Kapsidin parçalanması ile viral genomik DNA ve polimeraz çekirdeğe taşınır (26-29).

HBV viryonları, baskın olarak tam negatif iplik ve kısmi olarak tamamlanmış pozitif iplikli çembersel DNA genomu (relaxed circular DNA, rcDNA) taşır. In situ priming mekanizması ile oluşmuş az miktarda lineer DNA da HBV viryonlarında yer alabilmektedir. Replikasyon döngüsünün başlangıcı ile her iki form da cccDNA'ya (covalently closed circular DNA) dönüştürülür. Bu basamak viral genom replikasyonunun ilk ve en önemli aşamasıdır. cccDNA'nın oluşması için negatif DNA ipliğine kovalent olarak bağlanmış olan revers transkriptaz (RT) enzimi yerinden ayrılmakta, pozitif iplikçik tamamlanmakta ve her iki DNA molekülü birbirine ligasyon reaksiyonu ile bağlanmaktadır. HBV'nin hepatositlerde persistansında etkili olan cccDNA, virüsün antiviral tedavi sonrasında izlenen reaktivasyonlarından sorumludur. Bu molekülün meydana gelişi viral DNA'nın nükleer membrandan transportu ile çekirdeğe ulaşması sonrasında virüse ait transkripsiyonlar hücrel RNA polimerazlar tarafından başlatılmaktadır. Viral RNA'lardan virüse ait proteinler; nükleokapsid proteini ya da HBcAg (3.5 kb RNA'dan), HBeAg (3.5 kb RNA'dan), Viral polimeraz (3.5 kb RNA'dan), zarf proteinleri (2.4 ve 2.1 kb RNA'dan) ve X proteini (0.7 kb RNA'dan) sentezlenir. Nükleokapsid ve polimeraz proteinlerinin sentezlendiği 3.5 kb RNA, ek olarak viral genomik DNA için kalıp olan pre-genomik RNA olarak da replikasyonda görev alır. Viral genomik DNA'nın sentezi için RT pre-genomik RNA'nın 5' ucuna bağlanır ve bu kompleks nükleokapsid içine paketlenir; böylece nükleokapsid içinde revers transkripsiyon ve viral DNA'nın sentezi başlar. Burada viral RT'nin kendisi primer görevi yaparak DNA sentezini başlatır. Negatif iplikli DNA oluşuktan sonra RT enzimi RNaz H aktivitesi ile

pregenomik RNA'yı parçalar ve pozitif ipliğin sentezine başlar. Kısmi çift iplikli DNA molekülü oluştuğunda nükleokapsid partikülleri, endoplazmik retikuluma tomurcuklanma ile zarf yapılarını kazanmalarına imkan sağlayacak olgunlaşma sürecine girerler. Oluşan nükleokapsidlerin bir kısmı hücre çekirdeğine geri dönerek hücre içindeki cccDNA kopya havuzunu artırma işlevi de yapabilmektedir. Core proteinlerinin LHBs Ag aminoterminali kısmına bağlanmaları partiküllerin endoplazmik retikulumdan tomurcuklanmasına neden olur. Her üç zarf proteinini içeren viryonlar, endoplazmik retikulumdan Golgi kompleksine taşınır. Bu aşamalar sırasında zarf proteinlerinin glikozilasyonu tamamlanır ve olgun viryon kan dolaşımına salınır (18,30).

### 2.1.7. GENOTİP VE SUBTİPLER

HBV'nin bugüne kadar A'dan H'ye kadar 8 genotipi tanımlanmıştır. Bu genotipler,  $\geq 8\%$  nükleotid farklılığı gösterir (31-36). Aynı zamanda bu genotipler farklı coğrafi dağılım da göstermektedir (20).

Bugüne kadar 4 major (*ayw*, *ayr*, *adw*, *adr*) ve 9 minör (*ayw1*, *ayw2*, *ayw3*, *ayw4*, *ayr*, *adw2*, *adw4*, *adrq-* ve *adrq+*) HbsAg subtipi saptanmıştır. Bütün subtiplerde 'a' determinantı ortaktır ve S proteininin 124-147. aminoasitleri arasında yer alır (20,37). Ülkemizde yapılan çalışmalarda en sık rastlanan genotipin D olduğu ve en sık rastlanan subtipin ise *ayw3* ve *ayw2* olduğu bildirilmiştir (38,39). Dünya'daki HBV genotip ve subtiplerinin coğrafi dağılımı Tablo-I'de gösterilmiştir (38).

**Tablo-I.** Dünya'daki HBV genotip ve subtiplerinin coğrafi dağılımı (38)

Genotip	Subtip	Coğrafi Dağılım
A	adw2, ayw1	Kuzey Batı Avrupa, A.B.D., Afrika
B	adw2, ayw1	Tayvan, Japonya, Endonezya, Çin,
C	adw2, adrq+, adrq-, ayr	Doğu Asya, Tayvan, Kore, Çin, Japonya, Polenezya, Vietnam
D	ayw2, ayw3	Akdeniz bölgesi, Hindistan, Afrika
E	ayw4	Batı Afrika
F	adw4q-, adw2, ayw4	Orta ve Güney Amerika
G	adw2	Fransa, ABD
H	adw3	Orta Amerika

### **2.1.8. MUTASYONLAR**

HBV enfeksiyonu, yüksek düzeyde viryon üretimi ve yıkımı ile karakterizedir. HBV RT enziminin, “proofreading” aktivitesinin olmaması, yüksek viryon üretimi ile birlikte replikasyonda yüksek düzeyde hata meydana gelmesine neden olmaktadır. HBV polimerazının hata oranının yılda nükleotid başına  $1.4 \times 10^{-5}$ - $5 \times 10^{-5}$  olduğu hesaplanmıştır. Bu hata düzeyi, retrovirüslere yaklaşık bir orandır ancak DNA virüslerinden  $10^4$  kat yüksektir. Oluşan viral mutantlar; fonksiyonel kısıtlamalar ve immün sistemin etkileri gibi endojen, aşılama ve ilaç tedavisi gibi eksojen faktörlerle sınırlandırılmakta; tüm bu faktörler yeni mutantların oluşumu için seçici baskı olarak yeniden karşımıza çıkmaktadır. Buna bağlı olarak enfekte kişideki virüs popülasyonu genetik olarak yakın ancak birbirinden farklı olan ve farklı özellikler taşıyan varyantların (türümsümler, quasispecies) bir kombinasyonu olarak izlenmektedir. Konaktaki virüse herhangi bir avantaj sağlayan mutasyonu taşıyan virüsler seçilerek baskın popülasyon haline gelmektedir (40-43).

#### **2.1.8.1. Yüzey (S) Mutasyonları**

PreS ve S bölgesi mutasyonları olarak incelenmektedir (37).

##### **2.1.8.1.1. Pre S Bölgesi**

Bu bölgede, gen bölgesi ile ilgili bir dizinin silinmesi, yer değiştirmesi veya yeniden düzenlenmesi şeklinde mutasyonlar görülebilmektedir (37). PreS2 bölgesindeki delesyonlar virüsün bağışık yanıttan kaçmasını sağlamaktadır (23).

##### **2.1.8.1.2. S Bölgesi**

Bu bölgedeki mutasyonlar, virüsün antijenik yapısını etkileyerek aşılı bireylerde enfeksiyon ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bu mutasyonlar çoğu kez HBsAg 145.aminoasidinde glisin-arjinin dönüşümü (sG145R) ya da 144.aminoasitte aspartat-alanin dönüşümü şeklinde (sD144A) izlenmektedir. Özellikle sG145R mutasyonu aşı başarısızlığı ile ilişkilendirilmiştir (44,45). Aşı ile ilişkili ilk escape mutant 1988 yılında İtalya’da görülmüştür. HBeAg pozitif anneden doğduğu için pasif ve aktif immünizasyon uygulanan bir bebekte yeterli düzeyde anti-HBs bulunmasına karşın HBsAg ve HBeAg’nin pozitifleştiği ve daha sonra kronik hepatit geliştiği saptanmıştır. Yapılan dizi analizi sonucunda ‘a’ determinantının 145. pozisyonunda glisin-arjinin değişimi saptanmıştır (46).

### 2.1.8.2. Core Promoter / Precore ve Core Bölgesi Mutasyonları

Bu bölgede iki önemli mutasyon tanımlanmıştır. Bunlardan ilki, pre-core bölgesinde 1896. nükleotidde (kodon 28: TGG, Triptofan) izlenen G–A dönüşümü TGA stop kodonu oluşturmakta ve HBeAg ekspresyonu durmaktadır (30,47). Diğer bir mutasyon grubu da basal core promoter bölgesini etkilemekte ve pre-core ve core RNA'larının transkripsiyonunda azalma şeklinde kendini göstermektedir. Bu mutasyonlar sıklıkla 1762. ve 1764. pozisyonlarda izlenir. Basal core promoterde A1762T ve G1764A mutasyonları viral genotiplere bağlı olarak yalnız ya da pre-core mutasyonları ile birlikte görülebilirler. A1762T ve G1764A çift mutasyonunun varlığı HBeAg sentezinde azalmaya ve viral yükte artışa neden olmaktadır. Genel olarak bu mutasyon tipi sıklıkla A genotipi ile enfekte kişilerde ortaya çıkmaktadır (48).

### 2.1.8.3. Polimeraz Bölgesinde İzlenen Mutasyonlar

HBV enfeksiyonunun tedavisinde nükleozit/nükleotid analoglarının kullanımı ile, *Pol* geninde mutasyon taşıyan ilaçlara dirençli virüsler seçilmektedir. LAM'e karşı direnç, tedavi alan hastaların %14-32'sinde ilk yılda izlenmekte; 4 yılın sonunda ise %70'e kadar çıkmaktadır. Nükleozit analoglarına direnç oluşturan mutasyonların büyük kısmı polimeraz proteininin katalitik C bölgesinde (YMDD motifi) izlenmektedir. Bunların arasında LAM direncinden sorumlu olan rtM204V (YVDD), rtM204I (YIDD) ve daha yakın zamanda tarif edilen rtM204S (YSDD) mutasyonları sayılabilir (49).

Adefovir Dipivoksil (ADV) direnci, daha düşük olasılıkla 2 yıllık tedavi boyunca %2 oranında gelişmektedir. Dirençten sorumlu mutasyonlar viral polimerazın D motifi 236. kodonda treonin-asparajin dönüşümü şeklinde (rtN236T) ya da B kısmında (rtA181T) izlenmektedir (30,40).

Entekavir'e karşı direncin ise, LAM direnci izlenen iki kişide farklı mutasyon paternleri şeklinde saptandığı bildirilmiştir. Entekavir direnci, 4 nokta mutasyonu gerektirmesi nedeniyle daha nadir ortaya çıkmaktadır (30,40,50).

#### **2.1.8.4. X Bölgesinde İzlenen Mutasyonlar**

Bu bölge mutasyonlarının önemi net değildir. Kronik HBV enfeksiyonlu, HCC'lı, fulminant hepatitli ve sirozun son döneminde bulunan hastalarda X geni üzerindeki 130. (AAG (lizin)→ATG (methionin) ve 131. (GTC (valin)→ATC (izolösin)) kodonlarda nokta mutasyonlar bildirilmiştir. 1770-1777. pozisyonlar arasındaki 8 nükleotidlik delesyonun DNA ekspresyon ve replikasyonunu baskıladığı ve sonuçta HBsAg'nin negatif hale geldiği bildirilmiştir (51).

#### **2.1.9. PATOGENEZ**

Kronik HBV enfeksiyonlarında meydana gelen karaciğer hasarı çoğu kez immün sistem ve HBV ile enfekte hepatositlerin etkileşimine bağlıdır (52).

Akut HBV enfeksiyonu izlenen kişilerde; MHC sınıf II bağımlı CD4+ T helper (Th) ve CD8+ T sitotoksik (Tc) lenfositler rol oynamaktadır. Akut enfeksiyonda Th1 yanıtı baskın olmakta ve İnterlökin-2 (IL-2), IFN-gama gibi sitokinlerin de yardımıyla, virüsün organizmadan temizlenmesi ve enfekte hepatositlerin ortadan kaldırılarak iyileşme mümkün olmaktadır (30,52-54).

Kronik hepatit B'de ise, Tc lenfosit yanıtı düşük düzeyde ya da etkisizdir. Kronik B hepatitli kişilerde, İnterlökin-4 (IL-4), İnterlökin-5 (IL-5), İnterlökin-10 (IL-10) salgılanması ile karakterize Th2 lenfosit yanıtı ve virüsün Tc lenfositleri ile temizlenmesi yerine, humoral yanıtı yönlenmiş bir bağışıklık söz konusudur. Kronik B hepatitinde hücrel sitotoksik yanıt yetersiz kalmaktadır (55-57).

HBV enfeksiyonlarında doğal bağışıklık mekanizmaları da önem taşımaktadır. Bunlar, HBV enfeksiyonunun ilk dönemlerinde gerçekleşir. Yapılan çalışmalar, IFN-gama ve tümör nekrozis faktör alfa'nın (TNF-alfa), perforin ya da Fas-bağımlı apoptotik yolların aktivasyonuna gerek olmadan viral replikasyonun kontrolündeki etkilerini ortaya koymaktadır. Virüs replikasyonundaki bu baskılanma, tipik olarak T lenfositlerin en yüksek düzeyde infiltrasyonu ve karaciğer hasarının başlamasından daha önce gerçekleşmektedir. Bu veriler, doğal bağışıklığın enfekte kişilerdeki viral replikasyonun baskılanmasındaki önemi ve virüse karşı immün yanıtındaki rolüne dikkat çekmektedir (52).

### **2.1.10. KLİNİK**

HBV enfeksiyonu, asemptomatik enfeksiyondan fulminant hepatite, inaktif taşıyıcılıktan karaciğer sirozu ve karaciğer kanserine kadar değişen farklı klinik tablolar göstermektedir (4).

#### **2.1.10.1. Akut HBV Enfeksiyonu Klinik Bulguları**

Klinik gidiş virüs ve konakçıya ait çeşitli faktörlere bağlıdır. Yenidoğan döneminde alınan enfeksiyon %80-90, ilk beş yaşta %30, erişkin çağda ise <%5-10 kronikleşir (19). İnkübasyon dönemi 60-180 gündür. Hepatitin ortaya çıkması HBsAg'nin saptanmasından ortalama 4 hafta sonradır (4). Primer enfeksiyonda HBsAg, inkübasyon periyodu sonrası kanda belirmeye başlar ve bunu anti-HBc antikorlarının kanda görülmesi izler. Bunlar erken enfeksiyonda IgM tipi antikorlardır. Çoğu vakada serumda HBeAg saptanır. Enfeksiyonun klerensi ile birlikte HBsAg ve HBeAg kaybolur, anti HBs antikorları serumda saptanmaya başlar. Kendi kendine sınırlanmış bir enfeksiyonda, viral antijenlerin kaybından sonra ve antiHBs antikorlarının görülmesinden sonra dahi, kanda düşük düzeyde HBV DNA, tüm yaşam boyu olmasa da yıllar boyu saptanabilir (58,59).

Uzamış akut hepatit B'yi, kronik hepatit B'den ayırmada sorun yaşamak olasıdır. Uzamış klinik seyir olağan olabileceği gibi, HDV ile koinfeksiyon veya kronikleşme hatırd tutulmalıdır (4). Akut HBV enfeksiyonunda diğer bir olası durum fulminant hepatittir. Prekor ve kor promoter mutasyonlarına sahip virüslerle fulminant seyir ve kronikleşme arasında bağlantı bildirilmiştir (60,61). Ancak fulminant hepatit patogenezinde tek faktörün bu olamayacağı, konağa ve virüse bağlı pek çok faktörün düşünülmesi gerekliliği kanısına varılmıştır (62).

#### **2.1.10.2. Kronik HBV Enfeksiyonu Klinik Bulguları**

Altı aydan uzun süreli HBsAg pozitifliği, kronik HBV enfeksiyonunun göstergesidir. Bu durumda replikasyon karaciğerde devam eder. Karaciğerde hepatosit ölümüne eşlik eden inflamatuvar infiltratların varlığı kronik viral hepatit için karakteristiktir. Kronikleşme olasılığı, etkenin bulaş yoluna göre değişiklik gösterir. Yüksek endemik alanlarda enfekte anneden yenidoğana perinatal enfeksiyon ve erken çocukluk döneminde HBsAg pozitif aile üyeleriyle temas sonucu horizontal enfeksiyon, HBV bulaşındaki ana yolları oluşturur. Yenidoğan

ve infant döneminde enfeksiyon alındığında, %95 kronikleşme görülürken, neonatal periyod sonrası ilk 6 yaş içerisinde bu oran %30 civarındadır (63).

Kronik HBV enfeksiyonlu olgular arasında aminotransferazları yüksek ve viral replikasyon göstergeleri pozitif saptananlarda aktif viral replikasyon sürdüğünden hastalıkta ilerleme görülür. En önemli komplikasyonları siroz, portal hipertansiyon, asit, özofagus varis kanaması, hepatorenal sendrom ve HCC olarak sıralanabilir. Olguların her yıl %1-10 kadarında spontan HBeAg/AntiHBe serokonversiyonu görülür ve karaciğer hastalığında alevlenme ile birlikte dir. HBsAg kaybının görülme olasılığı ise yılda %1-2 civarındadır (58,64).

### **2.1.11. TANI**

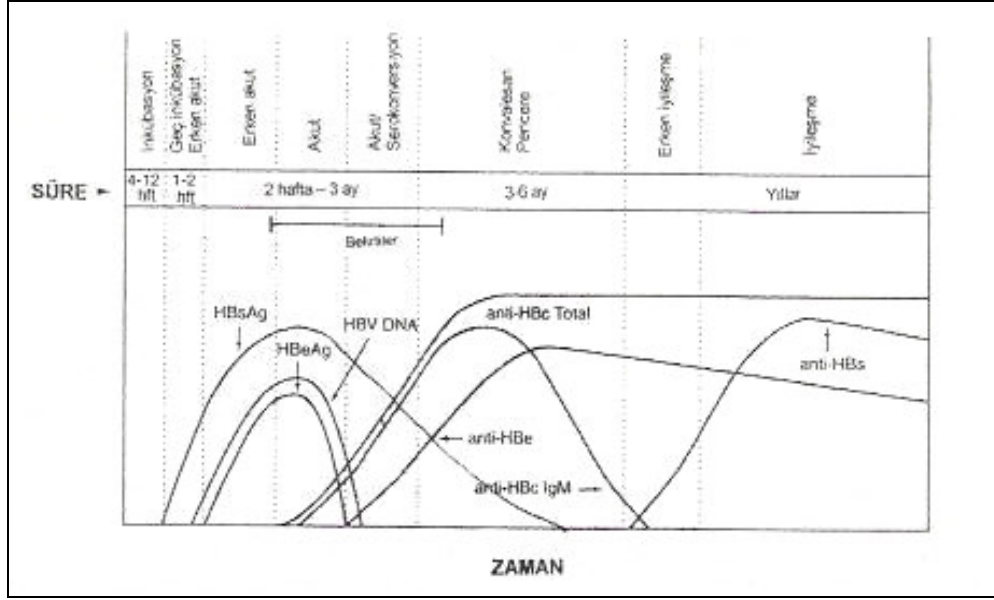
Tanıda, serolojik ve moleküler yöntemlerden yararlanılmaktadır. Bu sayede akut enfeksiyonun erken tanısı, akut ve kronik enfeksiyonun ayırt edilmesi ve vireminin kalıcılığının belirlenmesi mümkündür. Moleküler yöntemlerden serolojik yöntemlerin yetersiz kaldığı durumlarda tanıya gidilmesinde, değişik hepatit B serolojilerinin varlığında antiviral tedaviye karar verme ve tedavinin izlenmesinde, mutant suşların araştırılmasında ve HCC oluşum mekanizmalarının aydınlatılmasında yararlanılmaktadır (65).

#### **2.1.11.1. Serolojik Tanı Yöntemleri**

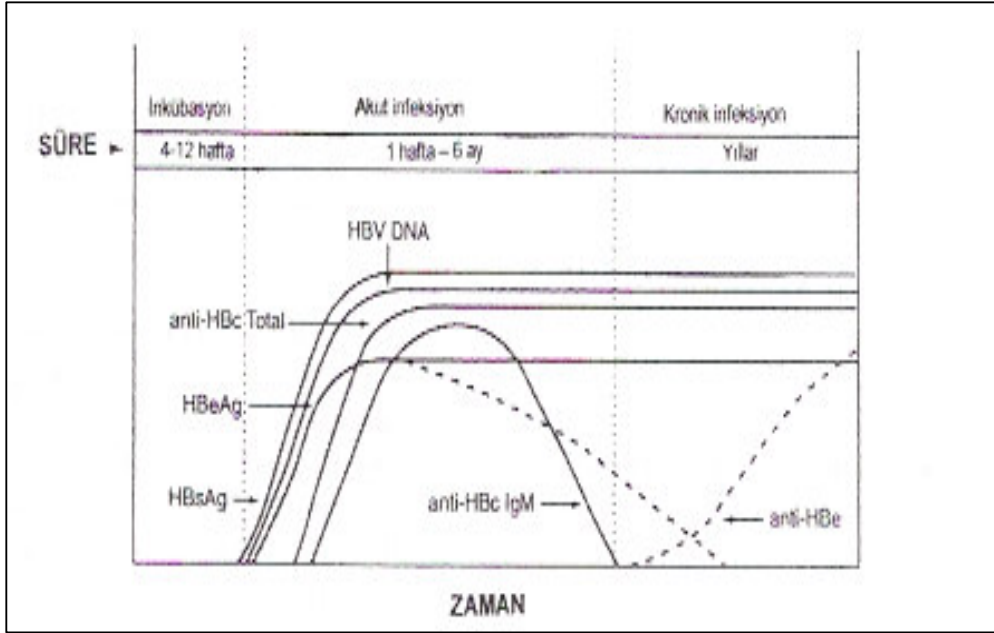
HBsAg, virüse ait ilk saptanan antijendir. Hastalık semptomları ortaya çıkmadan 3-5 hafta önce serumda saptanabilir düzeye ulaşmakta ve iyileşme ile sonlanan olgularda 2-6 ay içinde azalarak kaybolmaktadır. Kaybolduktan bir süre sonra anti-HBs antikorları ortaya çıkmaktadır. Bu antikorların oluşması, bağışıklığı göstermektedir. Anti-HBs, aşılama sonrası immün cevap olarak veya hepatit B immünglobülin (HBIG) verilmesiyle, kan transfüzyonuyla ve anneden bebeğe pasif olarak da transfer edilebilmektedir. HBsAg'nin 6 aydan daha uzun süre pozitif saptanması ise, kronikleşmenin göstergesidir (19,58,66). HBcAg, sadece enfekte karaciğer hücrelerinde saptanabilmektedir. Anti-HBc IgM enfeksiyon başladıktan birkaç hafta sonra pik seviyelere ulaşmakta ve ortaya çıktıktan 4-8 ay sonra ortadan kaybolmaktadır. Daha sonra Anti-HBc Ig G ortaya çıkmakta ve hayat boyu saptanabilir düzeylerde kalmaktadır. HBsAg'nin ortaya çıkmasından kısa bir süre sonra HBeAg ortaya çıkmaktadır. Serumda HBeAg'nin varlığı bulaşıcılık, enfektivite ve aktif viral replikasyon ile ilişkilidir. HBeAg'nin



ortadan kalkması ile anti-HBe antikorları oluşmaktadır. Bu antikorların ortaya çıkması viral replikasyonun azaldığını göstermektedir (4). Akut ve kronik HBV enfeksiyonundaki serolojik göstergeler Şekil-2 ve 3’de gösterilmiştir (19).



Şekil-2. Akut HBV enfeksiyonunda serolojik göstergeler (19)



Şekil-3. Kronik HBV enfeksiyonunda serolojik göstergeler (19)

### **2.1.11.2. Moleküler Tanı Yöntemleri**

HBV DNA'nın serumda saptanması, viral replikasyonun belirlenmesinde önemlidir. HBV DNA, serum transaminaz düzeyleri ile paralel olarak HBsAg'den 3-5 hafta önce saptanabilmektedir. HBV DNA'nın saptanması ve kantitasyonu amacıyla farklı yöntemler geliştirilmiştir. Bunlar hibridizasyon ve nükleik asit amplifikasyonu temelli tekniklerdir. Hibridizasyon temelli tekniklerde yakalama sınırı  $10^{4-5}$  kopya/ml, kantitasyon aralığı 3-4 log'dur. Klasik nükleik asit amplifikasyonunda 10-100 kopya/ml saptayacak duyarlılığa ulaşılır ancak kantitasyon üst sınırı  $10^5$  kopya/ml'yi aşmaz (67).

### **2.1.12. KRONİK B HEPATİTİNDE TEDAVİ**

Tedavide amaç, replikasyonun baskılanması ve gelişebilecek siroz ve HCC gibi komplikasyonların önlenmesidir (68). Kronik B hepatitinde tedavi, HBeAg (+) ve (-) hastalar için bir takım farklılıklar içermektedir. HBeAg pozitif hastalardan, serum HBV DNA  $>10^5$  kopya/ml ve ALT düzeyleri yüksek olanlar ile; HBeAg negatif hastalardan, serum HBV DNA  $>10^4$  kopya/ml, ALT düzeyi normalin 2 katından büyük veya biyopside orta/şiddetli hepatiti olan hastalar tedaviye adaydırlar (68).

IFN ve LAM 'Food and Drug Administration (FDA)' tarafından onay almış ilaçlardır. IFN, tek başına veya LAM ile kombine olarak kullanılmaktadır (69). Günümüzde tedavide hastanın klinik özelliklerine göre IFN, LAM ve ADV kullanılmaktadır (70).

#### **2.1.12.1. İnterferon**

İnterferonlar; makrofajlar, natural killer hücreler ve Tc hücrelerin aktivitesini artırarak, virüsle enfekte olmuş hücrelerin eliminasyonunu sağlarlar. İNF'ların başlıca, antiviral, antiproliferatif, anti-tümoral etkileri vardır (71).

Çeşitli meta-analizler HBeAg pozitif kronik olgularda 4-6 ay haftada 3 gün 9-10 MU IFN-alfa verildiğinde %30 oranında kalıcı HBeAg serokonversiyonu elde edildiğini göstermektedir. HBeAg serokonversiyonu hastalığın aktivitesinin azalması ve histolojik iyileşmeyle paralel gitmektedir. Ülkemizde HBV'nin tek temsilcisi olan genotip D enfeksiyonunda, HBeAg serokonversiyonunun kalıcı olmadığı ve 6 yıllık takip sonunda kalıcı cevap oranının %20'nin altında olduğu

görülmektedir. Genel literatürde standart tedavi ile kalıcı HBV-DNA negatifliği ve ALT normalleşmesi elde etme oranının %10-15 civarında olduğu belirtilmektedir (72).

Pegile interferon (Peg-IFN), IFN'a polietilen glikol eklenmesi ile elde edilen uzun yarı ömürlü IFN'dur. Peg-IFN'ların regüler IFN'lara nazaran üstünlük sağlayıp sağlamadığı açık değildir. Janssen ve ark.'larının Peg-IFN alfa 2b ile yaptıkları çalışmada 1 yıllık tedavinin sonunda HBeAg kaybı %29, HBeAg serokonversiyonu %22, HBV DNA <400 kopya/ml olması %10, HBsAg kaybı %5 olarak saptanmıştır. Hastaların %34'ünde alanin aminotransferaz (ALT) normalleşmiştir. Peg-IFN alfa 2a ile yapılan çalışmalarda Cooksley ve arkadaşları tedavi bittikten sonraki 24. hafta sonunda HBeAg kaybını %35, HBeAg serokonversiyon oranını %33, ALT normalleşmesini %35 olarak saptamıştır. Bu oranlar Peg-IFN alfa 2b ile yakınlık göstermektedir (73,74).

#### **2.1.12.2. Lamivudin**

DNA zincir sentezini bloke ederek, HBV replikasyonunu durdurur. Bu sayede kısa zamanda HBV-DNA negatifleşir ve ALT'de azalma meydana gelir. Ancak virüs hepatositlerin içinde varlığını devam ettirir. Genellikle 1-2 yıllık tedavilerde, tedavi kesildikten sonra virüsün replikasyonu derhal başlamaktadır. Bir yıllık tedavide HBeAg serokonversiyonu oranı %15-16 civarındadır. Dört yıllık tedavide bu oran %40'ları aşmaktadır. Bu durumda tedavinin uzun süre verilmesi mantıklı görünmektedir. Ancak uzun süreli tedavide virüsün varlığını devam ettirmesi ve ilaç baskısı ile, ilacın etki etmediği mutant suşların seçilmesi söz konusudur. Bir yıllık tedavide %20 olan direnç oranı, 5 yılda %70'lere çıkmaktadır. Dirençli mutantlar genellikle 6-9 aylık tedaviden sonra seçilmektedirler. Başlangıç HBV-DNA düzeyi yüksek olanlarda direnç gelişme riski daha fazladır. Bu mutantların polimeraz enziminin aktif katalitik bölgesindeki YMDD motifindeki M-->V veya M-->I değişimi sonucu meydana geldiği bilinmektedir. 180. kodonda oluşan mutasyon virüsün uyumunu artırmakta ve direnç gelişimine katkıda bulunmaktadır. Mutant virüsün orijinal virüse nazaran replikasyon kapasitesinin daha az olduğu belirtilmektedir. Buna delil olarak mutasyon geliştikten sonra HBV-DNA ve ALT düzeylerinin tedavinin başlangıcından daha düşük olması gösterilmektedir. LAM tedavisine ne kadar devam edileceği bilinmemektedir. Çoğu yayınlar HBeAg(+) hastalarda HBeAg

serokonversiyonu sağlandıktan sonra 6-9 ay daha tedaviye devam edildiği takdirde, ilaç kesilse bile nüks ihtimalinin %15'i geçmediğini göstermektedir. HBeAg(+) hastalarda uzun süreli LAM kullanımını araştıran Lok ve arkadaşlarının çalışmasında 998 hasta ortalama 4 yıl izlenmiştir. LAM direnci birinci yıl %23 iken 5 yıl sonunda %65 bulunmuştur (75,76).

### **2.1.12.3. Adefovir Dipivoxil**

Lamivudine benzer mekanizma ile replikasyonu bloke etmektedir. Ayrıca polimeraz proteininin priming fonksiyonunu da bozmaktadır. Bir yıllık kullanımdan sonra ADV'ye karşı da direnç gösteren rtN236T (asparagin-threonin) mutasyonu %2 civarında görülmektedir. Bu mutant LAM'e hassastır. Bir yıllık tedavi sonunda HBeAg(+) hastalarda %12 civarında HBeAg serokonversiyonu görülmektedir. 10 mg/günlük dozda 48 haftanın sonunda %53 histolojik iyileşme, %21 HBV-DNA kaybı, %48 ALT normalleşmesi görülmektedir (77).

### **2.1.13. EPİDEMİYOLOJİ**

HBV, dünya genelinde 350 milyon kişide kronik enfeksiyona, yılda 500 000-1 200 000 ölüme neden olmaktadır. Dünyada HBV ile karşılaşmış kişi sayısı iki milyardır (78).

Dünya HBV enfeksiyonu açısından; düşük, orta ve yüksek endemisite bölgelerine ayrılmıştır. Endemisitenin düşük olduğu bölgelerde (ABD, Kanada, Batı Avrupa, Avustralya, Yeni Zelanda) HBsAg pozitif olanların prevalansı %0.1-2'dir. Ancak bu bölgelerdeki eşcinsellerde, çok eşli heteroseksüellerde, damar içi uyuşturucu bağımlılarında, Eskimolar'da, Yeni Zelanda Maorileri'nde, Avustralya yerlilerinde ve Amerikalı zencilerde enfeksiyon oranı yüksektir. Enfeksiyon genellikle yetişkin çağda kazanılır. Cinsel temas ve perkütanöz temas en önemli bulaş yoludur. Ancak perinatal ya da erken çocukluk döneminde alınan enfeksiyon HBV enfeksiyonuna önemli ölçüde kaynaklık edebilir (2).

Enfeksiyonun epidemiyolojisine etki eden faktörlerden biri de HBV'nin genotipleridir. Enfeksiyon açısından düşük endemisite bölgeleri olan Kuzeybatı Avrupa ülkelerinde virüsün baskın genotipi, genotip A'dır (16). Orta endemisite bölgelerinde (Japonya, Orta Asya, Orta Doğu, Orta Amerika) HBsAg pozitifliği %2-5 oranındadır. Enfeksiyon çoğunlukla çocukluk, ergenlik ve genç erişkinlik

döneminde alınır. Başlıca bulaş yolu, perkütanöz ya da horizontaldir. Özellikle Akdeniz ülkelerindeki annelerde HBeAg pozitifliği az olduğu için perinatal bulaş nadirdir (2). Bu bölgelerden Batı Amazon bölgesinde HBV'ye bağlı fulminant hepatit siktir ve enfeksiyonun en önemli geçiş yolu cinsel temastır. Baskın HBV genotipinin genotip F ve H olduğu belirtilmektedir (79,80). Rusya'da 1-14 yaş arası karaciğer hastalarında HBV ile karşılaşma oranı %65.6, karaciğer hastalığı olmayanlarda HBV ile karşılaşma oranı %14.4 olarak tespit edilmiştir. Bu bölgede ise HBV genotipinin %85 oranında genotip D olduğu bildirilmektedir (81). Yüksek endemisite bölgelerinde (Sahra altı Afrika, Güneydoğu Asya, Çin, Alaska) HBsAg pozitifliği %5-20 oranındadır. Maternal, perinatal ve horizontal bulaş, ana bulaş yoludur. Asya'da perinatal bulaşma, Afrika'da horizontal bulaşma ön plandadır (2). Tayvan'da HBsAg pozitifliği %15-20 oranındadır ve bunun %40-50'si perinatal yolla olmuştur. Bu bölgelerden Hong Kong'da baskın HBV genotipi, genotip B ve C'dir (82). Tablo-II'de Dünya'daki endemisite bölgelerine ait bilgiler özetlenmiştir (2).

**Tablo-II.** Dünya'da HBV endemisite bölgeleri (2)

Özellik	Yüksek endemisite	Orta endemisite	Düşük endemisite
HBsAg pozitifliği	<%10	%2-10	<%2
Anti-HBs pozitifliği	%70-90	%20-60	%5-10
Bölgeler	Güneydoğu Asya, Çin, Alaska, Pasifik adaları, Amazon, Afrika	Doğu Avrupa, Güney Avrupa, Orta Asya, Güney Amerika, Orta Amerika, Orta Doğu, Japonya	ABD, Kanada, Batı Avrupa, Avustralya, Yeni Zelanda
Enfeksiyonun alındığı yaş	Yenidoğan, erken çocukluk dönemi	Yenidoğan, çocuk, erişkin	Erişkin yaş
Geçiş yolu	Horizontal, perinatal	Horizontal	Seksüel, perkütan

Ülkemiz orta derecede endemik bir bölgede yer almaktadır. Taşıyıcılık oranı yaklaşık %6 civarında olmakla birlikte, bölgesel farklılıklar göstermektedir. Batı bölgelerinde ortalama %2'ye kadar düşerken, doğu bölgelerinde %10'un üzerinde değerler bildirilmektedir (3).

### **2.1.13.1. Bulaş Yolları**

#### **2.1.13.1.1. Enfekte kan ve vücut sıvıları ile temas (perkütan)**

Çoğul transfüzyon yapılan hastalar, hemodiyaliz hastaları, intravenöz (IV) ilaç bağımlıları, dövme yaptıranlar, özellikle cerrahlar, patologlar, hemodiyaliz çalışanları olmak üzere sağlık çalışanları risk gruplarıdır. Virüs insan vücudu dışında 7 günden uzun süre canlı kalabildiği için enfekte diş fırçası ve jiletler de bulaş kaynağı olabilirler (2).

#### **2.1.13.1.2. Cinsel temas**

En çok risk taşıyanlar homoseksüellerdir. Ayrıca eşleri HBV ile enfekte olanlar, başka bir cinsel yolla bulaşan hastalığı olanlar da risk altındadır (2).

#### **2.1.13.1.3. Enfekte anneden yenidoğana bulaş (perinatal-vertikal)**

Bulaş; nadiren gebelik sırasında ya da doğum sırasında ve doğum sonrası olabilir. HBeAg pozitif anneden doğan çocukların %70-90'ı enfekte olur. Bunlarda enfeksiyon %90 kronikleşir. HBeAg negatif anneden doğanların ise %10-40'ı enfekte olur. Bunların da %40-70'inde enfeksiyon kronikleşir. Ayrıca anne sütünde de HBsAg gösterilmiştir (2).

#### **2.1.13.1.4. Enfekte kişilerle cinsellik içermeyen temas (horizontal)**

Çeşitli vücut sıvılarında HBsAg bulunmuştur. Plevra ve periton sıvılarında serumdaki kadar viryon bulunur. Tükürük ve semendeki virüs yükü serumdakinden azdır ancak sürekli enfeksiyöz viryonlar bulunur. Endemik bölgelerde virüsün cilt çatlakları ve muköz membranlardan geçişi çocuklarda enfeksiyona neden olabilir. Anneleri HBsAg pozitif çocuklar doğumda enfeksiyonu almadılarsa, %40 olasılıkla ilk beş yıl içinde enfekte olabilirler (2).

## **2.2. HEPATİT C VİRÜSÜ**

### **2.2.1. TARİHÇE**

HAV ve HBV için 1975 yılında serolojik testlerin geliştirilmesinden sonra non-A, non-B (NANB) hepatit problemi ortaya çıkmıştır. Daha sonra transfüzyon sonrası ortaya çıkan hepatit vakalarının çoğunun ne HAV ne de HBV'den kaynaklandığı ve kan transfüzyonu sonrası ortaya çıkan NANB hepatit riskinin  $\geq$ %10 olduğu görülmüştür (83). 1989'da karakterize edilememiş NANB hepatit

ajanını içeren plazmadan komplementer DNA datası oluşturulmuş, NANB hepatit tanısı konulan bir hastanın serumu taranmış ve spesifik olarak NANB hepatit enfeksiyonları ile ilişkili bir antijen kodladığı gösterilmiş komplementer DNA klonu izole edilmiştir. Bu klonun konak DNA'sından gelmediği, fakat NANB hepatit enfeksiyonlarında bulunan bir RNA molekülünden geldiği bulunmuştur (84). Bunun yanı sıra yine 1989 yılında HCV'ye karşı oluşan antikorlar için geliştirilen yeni bir yöntemin, NANB hepatit vakalarının %88'inin HCV'ye karşı oluşan antikorlardan serokonverte olduğu, antikorun gelişiminin hepatitin seyriinde geçici bir ilişkiden kaynaklandığı ve enfekte hastaların enfekte donörlerle bağlantılı olabileceği gösterilmiştir (85). 1990 yılında NANB hepatitin temel nedeninin HCV olduğu kesinleşmiş ve çoğu batı ülkelerinde donör taramaları başlatılmıştır. HCV'ye karşı oluşan antikorlar için geliştirilen I. jenerasyon yöntemler hepatit insidansında %70 azalmayla sonuçlanmıştır. 1992'de daha sensitif II. jenerasyon yöntemlerin geliştirilmesiyle HCV geçişi azalmıştır (86). Bugün HCV enfeksiyonu için en önemli risk faktörü IV ilaç kullanımındır (87).

### **2.2.2. SINIFLANDIRMA, TAKSONOMİ VE GENOTİPLER**

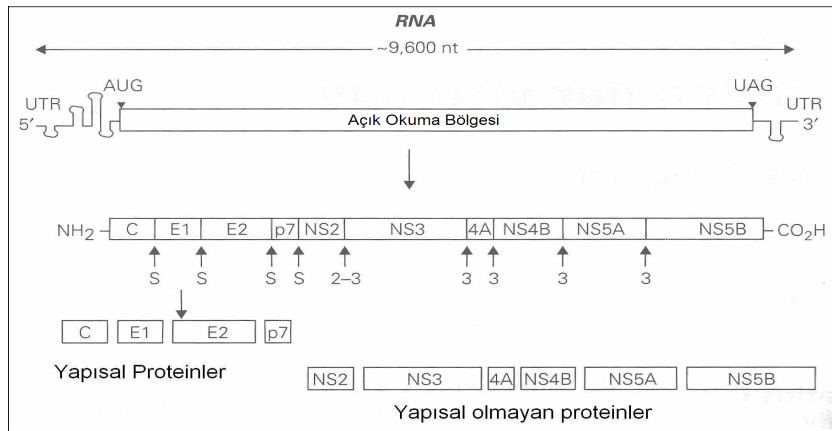
Sekizinci Uluslararası virüs taksonomisi birliğinin (ICVT) 2005'te yayınladığı rapora göre HCV, GB virüs B (GBV-B) ile birlikte *Flaviviridae* ailesinin *Hepacivirus* genusu içinde sınıflandırılmıştır (88). HCV kökenlerinde tiplendirme viral genomdaki değişikliklerin belirlenmesine dayalıdır. Dünyanın farklı bölgelerinden elde edilen izolatların nükleotid dizileri karşılaştırılarak yapılan çalışmalar, 6 ana genotipin ve her tipin içinde çok sayıda subtipin varlığını ortaya koymuştur. İkinci Uluslararası HCV ve İlişkili Virüsler Konferansında, üzerinde tamamen uzlaşılan subtip ve genotipler; Genotip 1 (1a, 1b, 1c), genotip 2 (2a, 2b, 2c, 2k), genotip 3 (3a, 3b, 3k), genotip 4 (4a), genotip 5 (5a), genotip 6 (6a, 6b, 6d, 6g, 6h, 6k) olarak bildirilmiştir. İleride bazı değişiklikler yapılması olası subtipler ise: Genotip 1 (1d....1l), genotip 2 (2d....2q), genotip 3 (3c....3i), genotip 4 (4b....4t), genotip 6 (6c....6q) olarak bildirilmiştir (88).

### **2.2.3. VİRÜSÜN YAPISI**

HCV, yaklaşık 50 nm çapında, lipid bir zarf taşıyan küçük bir virüstür. HCV'nin immün elektron mikroskobu ile 55-65 nm büyüklüğünde, üzerinde zarfı delerek çıkan ince dikensi yapılar taşıyan partikülleri görüntülenmiştir. Deterjan ile işlem gören viryon 33 nm'lik kor partiküllerinden oluşmaktadır (89).

## 2.2.4. VİRAL GENOMUN YAPISI

HCV, yaklaşık 9500 nükleotid içeren genoma sahip tek zincirli pozitif sens bir RNA virüsüdür. 3000 aminoasitten oluşan geniş bir poliprotein kodlayan tek ORF içerir. Bu ORF'nin 5' ve 3' uçlarında yerleşmiş olan kodlamayan bölgeler (NCR), viral proteinlerin translasyonunda ve virüsün replikasyonunda görev alırlar. ORF'nin bitiminden hemen sonra başlayan 3'-NCR içinde yer alan 99 bazlık çok iyi korunmuş bölge ise NS5B (non-strüktürel 5B) içindeki korunmuş bir kök-halka yapısı ile etkileşerek RNA replikasyonunda görev alır. Virüsün 5'-NCR bölgesi ile 3'-NCR'nin ilk 99 nükleotidlik kısmı en iyi korunmuş bölgeleridir (90). 5'-NCR bölgesi 340 baz çiftinden oluşur ve core (C) , envelope 1 (E1), envelope 2 (E2), p7, non-strüktürel bölge 2 (NS2), non-strüktürel bölge 3 (NS3), non-strüktürel bölge 4A ve 4B (NS4A-B), non-strüktürel bölge 5A ve 5B (NS5A-B) proteinlerini kodlar. 5'-NCR bölgesi tanı testlerinin hedef bölgesidir (91).



Şekil-4. HCV'nin genom organizasyonu ve kodladığı proteinler (89)

## 2.2.5. VİRAL PROTEİNLER

### 2.2.5.1. Yapısal Proteinler

#### 2.2.5.1.1. Core Proteini

HCV genomunun core bölgesi, poliprotein ilk 191 aminoasitlik bölümünü kodlar. Core bölgesi genomda 5'-NCR bölgesinden sonra en iyi korunmuş bölgedir. Bu bölgenin RNA bağlama aktivitesi gösterdiği bildirilmiştir. Aynı bölgenin genotipler arasında çok korunmuş olması biyolojik açıdan çok önemli bir işlevi olduğunu düşündürmektedir (92,93).



### **2.2.5.1.2. Zarf Glikoproteinleri**

E1 ve E2 zarf glikoproteinleri, tip 1 transmembran proteinleridir. HCV genomları arasında en çok genetik varyasyon gösteren bölge ise E2'nin aşırı değişken bölgesidir. 'Hypervariable region 1' (HVR1) adı verilen bu çok değişken bölge E2'nin 1-27. aminoasitleri arasında bulunur. HVR1 farklı genotipler ve türümsüler (quasispecies) arasında değişkenlik gösteren bir bölge olmasına karşın belirgin bir genotip ile ilişkisi yoktur ve bu nedenle de genotip veya türümsü ayırımında kullanılamaz. E2 proteinlerinin virüsün konak hücreye girişinde reseptör veya reseptörlerle girdiği etkileşim sonucunda hücre yüzeyine tutunmada rol oynadığı düşünülmektedir (94).

### **2.2.5.1.3. ARFP/F (Alternative reading frame/Frameshift protein)**

Core gen bölgesi içinde tanımlanan alternatif bir okuma çerçevesidir. HCV replikasyonu için doğrudan gerekli olmayan bu proteinin işlevi henüz netleşmemiştir (95).

### **2.2.5.1.4. p7 proteini**

Virüsün p7 proteini, 63 aminoasitten oluşan bir polipeptiddir ve yapısal ve yapısal olmayan bölge arasında yer almaktadır. Henüz p7 proteininin tüm yapısal ve işlevsel özellikleri aydınlatılamamış olmasına karşın yeni çalışmalar bu proteinin iyon kanal etkinliğine sahip olduğunu göstermektedir (96-98).

## **2.2.5.2. Yapısal Olmayan Proteinler**

### **2.2.5.2.1. NS2-3 Proteini**

NS2 proteini, viral proteinin amino ucundan bir hücresel sinyal peptidaz, karboksi ucundan ise büyük bölümü NS2 ve bir bölümü NS3 domaininde bulunan HCV proteaz tarafından kesilerek ayrılır. İn vitro hücre kültürü çalışmalarında, NS2/3 sistein proteaz aktivitesinin çinkoya bağımlı bir otoproteolitik aktivite olduğunu düşündürmektedir. NS3 proteini, serin proteaz ve RNA helikaz/nükleozid trifosfataz aktiviteleri gösteren çok işlevli bir proteindir. NS3'ün 1/3 amino ucu serin proteaz aktivitesi gösterirken, 2/3 karboksi ucu helikaz ve nükleozid trifosfataz aktivitesi gösterir (99,100).

#### **2.2.5.2.2. NS4A ve NS4B Proteini**

NS4 bölgesi, toplam 315 aminoasit uzunluğundadır. NS4 bölgesinin amino ucunda bulunan NS4A proteini 54 aminoasit uzunluğundadır ve NS3 serin proteaz ile sıkı bir kompleks oluşturarak NS3'ün hücrel membranlara tutturulmasını sağlar. NS4A, NS3 serin proteazın NS3/NS4, NS4A/NS4B ve NS4B/NS5 alanlarındaki kesim aktivitesinde önemli bir kofaktör olarak görev almaktadır (100). NS4B ise endoplazmik retikulumla integre membran proteini olarak bulunur. Viral replikasyon sırasında endoplazmik retikulumda kotranslasyonel aktivite gösterdiği düşünülen NS4B'nin işlevinin HCV replikasyon kompleksinde özellikle r-endoplazmik retikulum ve jukstanükleer membranlarda meydana gelen değişiklikler sırasında kalıp rolü görmesi olduğu tahmin edilmektedir (101,102).

#### **2.2.5.2.3. NS5A ve NS5B Proteini**

NS5A, çok fonksiyonlu bir serin fosfoproteinidir. HCV replikasyonu ve patogenezi ile ilişkili çok sayıda mekanizma ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (103-105). NS5B, HCV poliproteininin karboksil ucunda yer alan en son viral proteindir. RNA bağımlı RNA polimeraz etkinliği gösterir (106).

#### **2.2.6. REPLİKASYON**

HCV, konak hücreye reseptöre bağımlı endositoz veya benzeri bir yolla girer ve ligandı da HCV'nin E2 glikoproteinidir. HCV'nin kullandığı hücrel reseptörün eritrosit ve trombositler haricinde tüm hücrelerin yüzeyinde yaygın olarak eksprese edilen bir tetraspanin olan CD81 (TAPA-1) olduğu ve HCV'nin bu reseptöre E2 glikoprotein bölgesi ile tutunduğu son yıllarda HUH-7.5 hücre hattında yapılan *in vitro* çalışmalarda gösterilmiştir. HCV ile enfekte şempanzelerde HCV E2 bölgesinin CD81 ile kaplanmış boncuklara tutunduğu ve bunun HCV anti-E2 antikorları ile inhibe edildiği gösterilmiştir (107,108).

Düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü (LDLR) de HCV için bir reseptördür. LDLR, lipoproteinleri reseptöre bağımlı endositoz ile hücre içine alır. Reseptör, hücre yüzeyinde LDL'ye bağlandıktan sonra kltrin-kaplı keseler aracılığıyla hücre içine girmesini sağlar. Bazı çalışmalarda bu endositozun anti-LDLR antikorları ile inhibe edildiği *in vitro* olarak gösterilmiştir (109).

Dolaşımdaki modifiye olmuş (oksidlenmiş, asetillenmiş v.s) LDL'leri tanıyan çöpçü reseptör B1 (Scavenger receptor B1 veya SR-B1) hepatositlerde çok yüksek düzeylerde eksprese edilir ve hücre membranında lipid raft adı verilen bölmelerde yer alır. HCV E2 glikoproteininin, SR-B1'e tutunduğu bildirilmiş ve bu olayın yalıtı özgül olarak HCV E2'nin HVR1 bölgesine karşı hazırlanmış monoklonal antikorlarla inhibe edildiği gösterilmiştir (110).

HCV, replikasyon sırasında konak hücrenin sitoplazmik membranında değişiklikler meydana getirir. Replikon oluşturan hücrelerde HCV'ye ait yapısal olmayan protein, RNA'ya bağımlı RNA polimeraz aktiviteleri membranöz ağ adı verilen hücre içi veziküler yapılar üzerinden gerçekleşir. Son yapılan çalışmalar, bu membran ağının akışkanlığının viral replikasyon için önemli olduğunu göstermektedir. İn vitro hücre kültürü sistemlerinde bu akışkanlıktaki değişikliklerin membran üzerinde replikasyon kompleksinin oluşumunu inhibe ettiği ve replikasyonu durdurduğu bildirilmiştir (102). HCV'nin replikasyon kompleksi içinde RNA'nın nasıl sentezlendiği konusunda çok az şey bilinmektedir. HCV'nin, pozitif iplikli genomu kalıp olarak kullanarak bir ara negatif iplik formu sentezleyip ve bu ara formu yeniden genomların sentezlemesinde kalıp olarak kullandığı düşünülmektedir (111).

## **2.2.7. HCV MUTASYONLARI**

### **2.2.7.1. Viral Genomdaki Varyasyonlar**

HCV'deki genetik heterojenlik virüsün replikasyonu sırasında gelişen mutasyonların birikimi sonucu oluşmaktadır. HCV genomu, yaklaşık 9600 nükleotid içeren pozitif polariteli tek zincirli RNA'dır. Genom 3' ve 5' uçlarda oldukça korunmuş olan iki adet translasyona uğramayan bölge (Untranslated region=UTR) bulundurmaktadır. Bu iki uç arasında büyük bir prekürsör proteini kodlayan bir ORF bulunmaktadır (112,113). Genomun 5' ucunda bulunan UTR bölgesi, virüs suşları arasında oldukça yüksek oranda (%92'den fazla) korunmuş nükleotid dizisine sahiptir. Virüsün replikasyonu ve viral proteinlerin translasyonunda önemli rol oynar (114). 3' UTR, düşük oranda korunmuş yaklaşık 40 nükleotidlik bölge, bir internal poly (U)/polyrimidine dizi ve bunu takip eden 98 nükleotidlik bir kuyruk içermektedir. Bu son kuyruk, virüs kökenleri arasında yüksek oranda korunmuş baz dizisi içermektedir. HCV genomunun ortak yapısı olan bu 3' kuyruğun viral genomun replikasyon

başlangıcında önemli rol aldığı düşünülmektedir. Kor ve NS3 bölgeleri de nispeten iyi korunmuş bölümlerdir (112).

HCV genomu, dizi değişikliği gösterdiğinden, genomdaki mutasyonların sık olduğu düşünülmektedir. Mutasyon oranı HCV genomunun domeinleri arasında değişim göstermektedir. Zarf proteinlerini kodlayan bölge, diğer bölgelere kıyasla birkaç kat daha fazla mutasyon oranına sahiptir. Hepatitin farklı klinik evrelerinden elde edilen HCV genomlarının E1 ve E2'yi kodlayan bölgelerin genetik analizinden, HVR1'in enfeksiyonun başlangıcından sonra HCV'deki genetik mutasyonlar için en sıcak bölge olduğu bulunmuştur (112,113). HVR1'deki önemli dizi değişikliği, ona HCV tür ayrımında marker olarak kullanma imkanı sağlamaktadır. HVR2, 7 aminoasit içermekte ve E2 zarf proteininin 91-97. pozisyonuna yerleşmiştir. HVR2 maksimum (%100) aminoasit dizilim değişimi gösterir ve B hücre epitoplari bulundurmaz (112).

#### **2.2.7.2. HCV Genotipleri**

HCV'nin en az 6 genotipi ve 100'den fazla subtipi ile türümsü yapıları bulunmaktadır (13). Genotipler 1'den 6'ya kadar olan rakamlarla, alttipler ise a, b, c,... gibi küçük harflerle ifade edilmektedir. Genotip 1b'nin üç ana alt tipi (W:worldwide, J:Japon ve NJ:Non-Japon) bulunmaktadır (115).

HCV genotipleri dünyaya dağılmış durumdadır. Genotip 1, batı ülkelerinde en yaygın olan tip olup, IFN-alfa veya IFN-alfa+ribavirin kombinasyonuna en düşük oranda yanıt vermektedir. Genotip 1b, dünyadaki bütün izolatların %40-80 kadarını oluşturmaktadır. Genotip 1b dışında genotip 2a ve 2b de dünyada geniş bir dağılım göstermekte, özellikle Japonya ve Kuzey İtalya'da yaygın tiplerdir (116-118).

Genotip 1a ve 1b, ABD'de en yaygın tipler olup, bunu genotip 2 izlemektedir. Batı Avrupa ve Güney-Doğu Asya'da genotip 1b en yaygın genotiptir. Alttip 2a ve 2b Amerika, Avrupa ve Japonya'da nispeten yaygın tipler olmakla birlikte, 2c yaygın olarak Kuzey İtalya'da bulunmaktadır. Genotip 3a Avrupa ve Amerika'daki damar içi uyuşturucu kullananlarda yaygındır. Genotip 3 çoğunlukla Hindistan, Pakistan, Avustralya ve İskoçya; genotip 4 Orta Doğu ve Afrika'da predominant; genotip 4a Mısır; genotip 5 Güney Afrika; genotip 6

Hong Kong, Viyetnam, Tayland'da yaygın olan tiplerdir. Güney Afrika'daki olguların %30-50'sinden genotip 5a, Hong Kong, Viyetnam ve Macau'daki olguların 1/3'ünden genotip 6a sorumludur (116-118). Asya kendi içinde ele alındığında; genotip 1b Japonya, Güney Kore, Çin ve Tayvan'da; genotip 3 Taylan, Miyanmar ve Nepal gibi Güney-doğu Asya'nın bazı kısımlarında tanımlanmıştır (116).

### **2.2.7.3. 'Quasispecies' (Türümsü) Yapı**

Viral replikasyon sürecinde oluşan mutasyonların birikiminin bir sonucu olarak HCV genomu, anlamlı derecede konak içi genetik heterojenlik göstermektedir. HCV bulunduran bireyde, virüsün çoğalması sırasında oluşan bu mutasyonların birikimi sonucu 'quasispecies' ya da türümsü adı verilen yapı oluşmaktadır. Türümsü populasyon, bir kişide bulunan heterojen viral genomların karışımıdır. Amplifikasyon sırasındaki polimeraz kaynaklı hatalar veya amplifikasyon ve klonlama aşamalarındaki seleksiyonlar türümsü oluşumu sağlamaktadır (119). Enfekte bir kişideki HCV genomları arasında yapılan dizi analizlerinden, nükleotid dizilimindeki değişme oranının ortalama %0.9 olduğu anlaşılmıştır. Bu durum, türümsü oluşumuyla sonuçlanmaktadır. Türümsü yapı, 5'UTR hariç HCV genomunun her bölgesine dağılmış durumdadır. HVR1, HCV genomunda türümsü yapı gösteren en karakteristik bölgedir (112).

### **2.2.8. PATOGENEZ**

HCV replikasyonunun primer bölgesi karaciğerdir ve enfeksiyon sırasında en yüksek düzeyde HCV RNA'yı karaciğer dokusu içerir. Enfekte dokunun gramında yaklaşık  $10^8$ - $10^{11}$  kopya arasında HCV RNA bulunur. Yine de enfekte karaciğerdeki hepatositlerin sadece %5-19'unda in situ hibridizasyon ile HCV RNA pozitifdir ve buna bağlı olarak HCV antijenlerinin ekspresyon oranları da düşüktür (%1-10). Virüsün doğrudan sitopatik etkisinin olmadığı düşünülmektedir. Karaciğer hücrelerinde görülen hasarın bağışık yanıt ve virüsün hücre içinde etkilediği sinyal ileti yolları ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (120).

Yüksek spesifiteye sahip Revers transkriptaz-PCR (RT-PCR) tekniği ile yapılan araştırmalarda HCV RNA'nın negatif ipliğinin karaciğer dışında sıklıkla lenf nodu ve pankreas, daha az sıklıkta olmak üzere de adrenal bezler, kemik iliği,

tiroid dokusu ve dalakta saptanabildiği bildirilmiştir. HCV'nin periferik kan mononükleer hücrelerinde replike olup olmadığı ise henüz tartışmalıdır (120).

### **2.2.9. İMMÜNİTE**

HCV, enfekte konak hücreleri için sitopatik değildir. İmmun sistem, ortaya çıkan karaciğer hasarında önemli role sahiptir. Enfekte olan konakta doğal ve kazanılmış immünite ortaya çıksa da virüsü ortadan kaldırmaya yetmez. HCV, konağa girdikten sonra replikasyona devam eder. Doğal ve kazanılmış immünitedeki değişik aksaklıklar nedeniyle virüs kontrol altına alınamaz ve kronik hepatit süreci gelişir (121).

#### **2.2.9.1. Humoral İmmun Yanıt**

HCV enfeksiyonundan genellikle 7-31 hafta sonra HCV'ye özgül antikorlar serumda saptanabilir düzeye çıkar. Bu antikorlar iyileştikten 10-20 yıl sonra kaybolabilir. HCV'ye karşı humoral immün yanıt, HCV'nin kor, zarf, NS3 ve NS4 proteinlerindeki epitoplara hedefler (122).

HCV enfeksiyonlarının nasıl kronikleştiği ve virüsün immün yanıtta nasıl kaçtığı halen tam olarak bilinmemektedir. E2 proteininin HVR1 bölgesi nötralizan antikorların major hedefi olarak tanımlanmıştır. HVR1'in çok değişken olması bağışık yanıtta kaçabilen türümsülerin ortaya çıkmasına neden olur (122).

HVR-1 dışında zarf glikoproteinlerinin başka bazı dizilerini hedefleyen nötralizan antikorlar da meydana gelmektedir. Rekombinant zarf glikoproteinlerinin memeli hücrelerinde eksprese ettirilmesi ile hazırlanan aşılara yanıt olarak ortaya çıkan özgül antikorların şempanzeleri düşük doz homolog HCV ile enfeksiyondan koruduğu gösterilmiştir (123).

#### **2.2.9.2. Hüresel İmmun Yanıt**

Hüresel immün yanıt, konağın korunmasında en önemli savunma mekanizmasını oluşturmaktadır. Akut, kendi kendini sınırlayan HCV enfeksiyonlarının geliştiği hastalarda güçlü bir Th yanıtı, aksine bu bağışık yanıtın zayıf ve yeterli zamanda ortaya çıkmadığı hastalarda ise persistan enfeksiyon ve kronik hepatit gelişmektedir. Akut HCV enfeksiyonunun iyileşmesinden sonra HCV'ye özgül T hücre yanıtının devam ettiği gözlenmektedir (124).

Akut HCV enfeksiyonunda erken, güçlü ve geniş bir Tc lenfosit yanıtı enfeksiyonun kendi kendini sınırlaması açısından önemlidir. HCV'ye karşı Tc lenfosit yanıtının koruyucu etkisinin araştırılması için yapılan bir çalışmada, HCV ile sürekli karşılaşan sağlıklı bireylerde HCV'ye karşı humoral immün yanıt olmaksızın Th ve Tc yanıtlarında sürekli bir uyarım olduğu bildirilmiştir (124).

### **2.2.9.3. Bağışık Yanıta Bağlı Karaciğer Hasarı**

Bu hasar, HCV'ye özgül T hücrelerinin karaciğeri infiltre etmesi ile başlar. Bu hücreler klonal artışa gitmeksizin sürekli olarak periferik kandan yenilenmektedir. CD4+ Th hücreleri portal alanda birikirken, CD8+ Tc lenfositler hepatik lobülleri infiltre ederler. B hücreleri ise portal yollarda yerleşen lenfoid foliküllerin germinal merkezlerinde yerleşmektedir (124).

## **2.2.10. KLİNİK**

### **2.2.10.1. Akut HCV Enfeksiyonu**

Olguların çoğu subklinik ve anikterik seyrettiği için tanı oldukça güçtür. İnkübasyon süresi ortalama 6-8 haftadır (125). Temastan sonra, genellikle karaciğer enzimlerinin yükselmesinden 1-4 hafta önce, kanda HCV-RNA pozitifleşir. Enfeksiyonun ilk 8-12 haftasında viremi pik yapar. Anti-HCV antikorları virüs alındıktan 20-150 (ortalama 50 gün) sonra pozitifleşir, ALT yükselmesi ise genellikle 4. haftadan sonra olur (126). Hastaların %15-20'si tam olarak iyileşirken, geri kalanında hastalık kronikleşir (125,126).

### **2.2.10.2. Kronik HCV Enfeksiyonu**

HCV ile enfekte kişilerin %55-85'inde enfeksiyon kronikleşmektedir (127). Hastaların çoğunda genellikle akut hepatit geçirme öyküsü ve herhangi bir yakınma yoktur. Genellikle kan bağışi sırasında veya başka bir amaçla yapılan tetkikler sonucunda tesadüfen farkedilir. En sık bildirilen semptom yorgunluktur (126). Serum ALT düzeyi genellikle normalin 3 katını geçmez ve karakteristik olarak dalgalı seyir gösterir. Kronik hepatit C'nin ilginç özelliklerinden biri de otoantikorların oluşmasıdır. Bazı hastalarda serumda, tip 2 otoimmün hepatitte görülen LKM-1 (Liver Kidney Mikrozomal-1) antikorları tespit edilir (128).

Kronik enfeksiyonun en önemli sonucu, hepatik fibrozisin ve bunun sonucunda siroz ve HCC'nin gelişmesidir. Bu uzun süreli komplikasyonlar

genellikle enfeksiyonun başlangıcından 20 yıl ve üzerindeki sürelerde olurlar. Bununla birlikte daha hızlı ilerleyen olgular da vardır. HCV enfeksiyonu alındıktan sonra hastaların %2-20'sinde 10-20 yıl sonra siroz gelişir (127).

Kronik hepatit C'nin en iyi prognostik göstergesi karaciğer histolojisidir. Hafif nekroz ve inflamasyonu, sınırlı fibrozisi olan hastaların prognozu oldukça iyidir; siroza ilerleme oranları düşüktür. Bunun yanında, orta ya da şiddetli nekroinflamasyonu veya fibrozisi olan hastalarda 10-20 yıl sonra siroza ilerleme ihtimali yüksektir (128).

### **2.2.10.3. Hepatosellüler Karsinom**

Hepatosellüler karsinom, kronik hepatit C'nin geç bir komplikasyonudur. Sirozlu hastaların yaklaşık %25'inde 5 yıl içerisinde son dönem karaciğer hastalığı (özefagus varisi, asit, hepatik ensefalopati) ve HCC gelişir. Siroz oluştuktan sonra HCC'ya ilerleme hızı yılda %1-2'dir (127,128). Siroza ilerlememiş kronik hepatit C'de HCC riski düşüktür. HCC riski, yaşla birlikte anlamlı olarak artmaktadır. Kronik HCV enfeksiyonu ya da sirozu olan kişilerde her 6 ayda bir ultrasonografi ve alfa-fetoprotein (AFP) bakılarak HCC yönünden takip edilmelidir (129).

### **2.2.11. TANI**

#### **2.2.11.1. Serolojik Tanı Yöntemleri**

Tanıda ilk kullanılan yöntem anti-HCV Ig M'ye yönelik EIA'dir (enzyme immunoassay). Genom yapısal ve yapısal olmayan proteinlere ayrılan 3011 ile 3033 aminoasitten oluşan polyproteini kodlar. Bu proteinlerin değişik epitoplarına karşı antikorları saptayabilen 3 kuşak EIA yöntemi geliştirilmiştir (130).

Birinci kuşak ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay ) testleri NS proteininin c100-3 peptidinden hazırlanmıştır. Daha sonraları buna elde edilen diğer rekombinant HCV antijenleri (c22-3 ve c200 peptidleri) de eklenerek çeşitli ticari ikinci kuşak HCV EIA sistemleri üretime ve kullanıma geçmiştir. Günümüzde kullanılan en yeni ve antikor taramada geçerli kabul edilen üçüncü kuşak EIA sistemleri ise, ikinci kuşak sistemlerdeki antijen havuzuna NS5 proteininin de eklenmesi ile hazırlanmıştır (13).



Üçüncü kuşak EIA sistemlerinin duyarlılığı %95'in üzerindedir ve serokonversiyon süresi ortalama 12 haftaya inmiştir. Yüksek risk gruplarında yapılan taramalarda anti-HCV EIA testi pozitifliklerinin 'recombinant immunoblot assay' (RIBA) ile doğrulanması önerilmektedir (13).

#### **2.2.11.2. Moleküler Tanı Yöntemleri**

HCV enfeksiyonu tanısında ve izleminde kullanılmak üzere çeşitli moleküler yöntemler bulunmaktadır. HCV tanısında yüksek duyarlılığı ile önemli avantaj sağlayan kalitatif yöntemler kullanılır. Bu yöntemler ELISA'ya göre özellikle pencere dönemindeki olguların yakalanması bakımından önemli bir avantaj sağlamaktadır (90).

Plazmada HCV RNA varlığı aktif enfeksiyonu gösterir ve HCV RNA etkenle karşılaşma sonrası 1-3 haftada saptanabilir. Tek bir HCV RNA yöntemi ile negatif sonuç elde edilmesi, aktif enfeksiyon olasılığını ekarte ettirmez (13). Testlerin önemli bir kullanım alanı da HCV tanısı konmuş kişilerde enfeksiyonun ve sağaltımın izlenmesidir. Bu amaçla kullanılan yöntemler kalitatif, kantitatif ve genotiplendirme yöntemleridir (90).

##### **2.2.11.2.1. Kalitatif Yöntemler**

Kalitatif yöntemler, hedef bölgenin 'klasik' PCR, 'real time' PCR veya 'Transkripsiyon-mediated Amplifikasyon' (TMA) yöntemlerinden birinin kullanılarak amplifiye edilmesi prensibine dayanmaktadır. Kalitatif yöntemler,  $\leq 50$  IU/ml HCV RNA yükünü ve tüm HCV genotiplerini saptayabilmelidir. Kalitatif ve kantitatif RT-PCR temelli yöntemler (Amplicor HCV Monitor v2.0, Cobas Amplicor HCV Monitor v2.0) için en alt saptama sınırları 50 IU/ml'dir. Bu sınır, TMA temelli Versant HCV RNA kalitatif yöntemi için 10 IU/ml, kalitatif ve kantitatif olarak da uygulanabilen Real-Time PCR yöntemi için 15 IU/ml'dir (90).

##### **2.2.11.2.2. Kantitatif Yöntemler**

Bu testler HCV viral yükünün ve sağaltımının belirlenmesinde kullanılırlar. HCV RNA, hedef amplifikasyon (kompetitif PCR veya real-time PCR) veya sinyal amplifikasyon yöntemleri (branched DNA (bDNA) yöntemi) ile kantitatif olarak saptanabilir (131). Ticari olarak mevcut beş adet standardize yöntem vardır. Bunlardan, Amplicor HCV Monitor v2.0 ve bunun semi-otomatize

versiyonu Cobas Amplicor HCV Monitor v2.0 ve LCx HCV RNA Quantitative yöntemleri kompetitif PCR yöntemine; Versant HCV RNA 3.0 Quantitative yöntemi bDNA yöntemine; Cobas TaqMan HCV Test ve Abbott Real-Time HCV yöntemi, Real-Time PCR amplifikasyon temeline dayanmaktadır (90).

### **2.2.11.2.3. Genotipleme Yöntemleri**

HCV'nin aşırı genetik heterojenitesi nedeniyle, 6 major genotipi ve 100'den fazla subtipi vardır. Farklı genotipler yaklaşık %65 sekans homolojisi paylaşırlar. Genotip 1, 2 ve 3 tüm dünyada bulunurken, diğerleri coğrafi bölgelere göre farklılıklar gösterirler. Bu genotipler arasında IFN'a yanıt açısından da farklılıklar bulunmaktadır. Tip 1 ve 4 IFN'a daha dirençli iken, tip 2 ve 3 IFN tedavisine daha iyi yanıt vermektedir. Bu nedenle tedaviye başlamadan önce genotipleme yapılması gerekmektedir (13,14).

HCV genotiplerinin belirlenmesinde çok sayıda yöntem kullanılmaktadır. Genotiplemede bugün kullanılan ve en kesin sonucu veren yöntem genomun C, E1 ya da NS5B bölgesinin PCR yöntemi ile çoğaltılarak dizi analizinin yapılmasıdır. Dizi analizi temelli yöntemler ancak belli laboratuvarlarda uygulanabilen, özel cihaz donanımı gerektiren yöntemlerdir. Bu yüzden HCV genotiplerinin belirlenmesinde daha basit yöntemler uygulanmaktadır (14). Klinik uygulamada HCV genotipleme çeşitli ticari kitlerle yapılabilmektedir; genomun 5' UTR bölgesinin dizi analizinin yapılması ile sonuç veren, Trugene™ HCV 5'UTR Genotyping kit (BAYER Corporation Diagnostic Division) ile çalışılan yöntem veya 5'UTR bölgesinde lokalize genotip spesifik problemler kullanılarak uygulanan revers hibridizasyon yöntemidir (İNNO-LİPA HCV II, Innogenetics, Ghent, Belgium veya Versant HCV Genotyping, Bayer HealthCare) ( 90,132).

Bu yöntemlerle yanlış tipleme nadirdir ancak vakaların %10-25'inde yanlış subtipleme olabilir. Bu hatalar klinik bir sonuç doğurmaz. Çünkü sadece genotipleme tedavi kararında etkilidir. NS5B bölgesinin direkt sekanlamasına dayalı yöntem araştırma aşamasındadır (Trugene™ NS5B HCV Genotyping kit, Bayer HealthCare ) (90).

### **2.2.12. TEDAVİ**

Kronik HCV'de tedavi endikasyonları; saptanabilir HCV bulunması, artmış ALT seviyeleri, karaciğer fibrozisi ve inflamasyonun histolojik olarak saptanmasıdır. Tedavide IFN-alfa ve ribavirin kullanılmaktadır (13). IFN-alfa tedavisi ile birlikte HCV'nin serumdaki düzeylerinde hızlı bir azalma ve uzun dönemde serum ve karaciğerde HCV RNA'nın ortadan kaldırılması sağlanabilmiştir. Ancak tek başına IFN-alfa tedavisinin HCV'nin ortadan kaldırılmasında sağladığı başarı sınırlı kalmaktadır. Yapılan araştırmalarda 12 aylık IFN-alfa tedavisi sonunda HCV olgularının %10-20'sinde uzun süreli ve güçlü bir yanıt alınmıştır (13). HCV'ye karşı antiviral sağaltımda esas ilerleme, IFN-alfa tedavisine bir guanozin analogu olan ribavirinin eklenmesi ile sağlanmıştır. Bu kombine tedavinin uygulanması ile birlikte HCV enfeksiyonlarının antiviral tedaviye uzun süreli ve güçlü yanıtı yaklaşık %40 'lara çıkmıştır. Son olarak da IFN-alfa'nın yerine polietilen glikol takılmış formu olan Peg-IFN-alfa'nın kullanıma girmesi ile birlikte tedaviye yanıt oranlarının daha da yükselerek genotip 1 enfeksiyonlu hastalarda %42, genotip 2 ve 3 ile enfekte hastalarda yaklaşık %80'lere çıktığı bildirilmiştir (133).

Yukarıda belirtilen sonuçlar her ne kadar HCV'nin antiviral sağaltımında belirgin bir gelişmeyi gösteriyorsa da halen hastaların yaklaşık olarak yarısında tedaviye kalıcı yanıt alınmamaktadır. Ayrıca IFN-alfa çok pahalı ve ciddi yan etkileri nedeniyle bazı hastalarda kullanılması sakıncalı olan bir ajandır. Bütün bu verilerin ışığında net olan husus, HCV tedavisi ile ilgili olarak daha etkin ve yan etkisi daha az antiviral ajanlara gereksinim olduğudur (134).

### **2.2.13. EPİDEMİYOLOJİ**

HCV enfeksiyonu tüm dünyada yaygın, oldukça ciddi bir sağlık sorunudur. Dünyada yaklaşık 200 milyon insanın HCV ile enfekte olduğu bildirilmektedir. Bir başka ifadeyle dünya nüfusunun yaklaşık %3'ü kronik HCV taşıyıcısıdır (135). Gelişmiş ülkelerde anti-HCV sıklığı %1-2 arasında değişmektedir (12).

HCV enfeksiyonu prevalansı bölgesel farklılıklar göstermektedir. Örneğin; Kuzey Avrupa'da %1'in altındayken, Kuzey Afrika'da %2.9'un üzerindedir. En düşük prevalans %0.01-0.1 ile İngiltere ve İskandinav ülkelerinde, en yüksek

prevalans ise %15-20 ile Mısır'da rapor edilmiştir (136). Türkiye'de toplumda HCV görülme sıklığı Viral Hepatitle Savaşım Derneği verilerine göre %0.3-1.8 (ortalama %0.5) arasındadır (135).

### **2.2.13.1. Bulaş Yolları**

HCV'nin temel bulaş yolu parenteraldir. Ayrıca tükürük, idrar ve semen gibi vücut sıvılarında virüsün çıkarılması enfeksiyonun, yakın temas, cinsel ilişki gibi yollarla da bulaşabileceğini düşündürmektedir (12).

HCV enfeksiyonunun temel risk faktörleri arasında; kan ve kan ürünlerinin transfüzyonu, damar içi uyuşturucu kullanımı, hemodiyaliz, yüksek riskli cinsel davranışlar, cerrahi girişim öyküsü, kontamine iğne batması ve HCV pozitif olgulardan yapılan organ nakilleri sayılabilir. Yine de olguların büyük bir bölümünde bulaş yolu bilinmemektedir (137).

HCV'nin enfekte anneden bebeğe bulaş riski %3-6 arasındadır. Perinatal bulaşı etkileyen iki önemli değişken viral yük (annede viral yük  $\geq 10^6$  kopya/ml ise risk %10'a çıkmaktadır) ve annede HIV koenfeksiyonudur. Yapılan çalışmalarda, doğum biçiminin ve emzirmenin HCV bulaşına neden olduğuna ilişkin kanıt bulunamamıştır (135).

### III-GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmaya Eylül 2007-Mart 2008 tarihleri arasında Afyon Kocatepe Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi polikliniklerine HBV ya da HCV şüpheli/pozitif olarak başvuran, Kan Merkezi'nde saptanan ve kliniklere yönlendirilerek HBV ve HCV tanısı alan ayrıca proje kapsamında (AKÜ BAPK-07TIP20) diğer testleri çalışılan; 44'ü HBV DNA, 30'u HCV RNA pozitif olmak üzere toplam 74 serum örneği dahil edilmiştir. Yine proje kapsamında Kan merkezi'ndeki donör kanlarından HBsAg'si negatif olanlarda anti-HBs, anti-HBc IgM, anti-HBc IgG, HBeAg ve anti-HBe çalışılarak mutasyon açısından analiz yapılmıştır. Serum örneği alınan kişilerden standart bir veri toplama formu ile bilgiler toparlanmıştır (Ek-1).

Bu bireylerin serumları 5000 devirde 10 dakika santrifüj edilerek ayrılmıştır. Serumlar saklama kaplarında 3 ayı parçaya ayrılarak testlerin yapılacağı tarihe kadar -20°C'de saklanmıştır. Bu serum örneklerinin hepatit testleri mikropartikül ELISA yöntemi ile çalışılarak değerlendirilmiştir. Hepatit testlerinde farklı patern gösteren HBV DNA ve HCV RNA'ları pozitif toplam 74 örnek çalışmaya dahil edilmiştir. Bunların 44'ü HBV enfeksiyonu (19'u halen LAM tedavisi almakta olan ve tedavi sırasında klinik olarak LAM direncinden şüphelenilenlerden seçilmiştir), 30'u ise HCV enfeksiyonu tanısı ile izlenen hastalara ait serum örneklerinden seçilmiştir. Sonuçta HBV DNA ve HCV RNA açısından pozitif bulunan ekstraksiyon ürünlerinde dizi analizi yöntemi (ABI 310, ABD) ile genotipleme ve mutasyon, HBV'li hastalarda ilaç direnci, HCV'li hastalarda ise filogenetik analiz araştırmaları, İontek Laboratuvarlar'ının olanakları kullanılarak çalışılmıştır.

### **3.1. ARAÇ VE MALZEMELER**

#### **3.1.1. HBV DNA/HCV RNA Ekstraksiyon Kiti**

HBV DNA/HCV RNA'nın ekstraksiyonu için "QIAGEN QIAamp MinElute Virus Spin Ekstraksiyon kiti" (QIAGEN, 57704) kullanılmıştır.

##### **3.1.1.1.HBV DNA/HCV RNA Ekstraksiyonu için Kullanılan Malzemeler**

25 µl protease, örnek başına 6.2 µl carrier RNA ve 220 µl buffer AL, 750 µl %96-100'lük etanol, 500'er µl Buffer AW1 ve Buffer AW2 (QIAGEN, 57704), 20-150 (43 µl) Buffer AVE ya da 20-150 (43 µl) RNase'dan arındırılmış H<sub>2</sub>O, 2 ml'lik collection tüpleri ve minElute kolon kullanılmıştır.

##### **3.1.2. HBV DNA/HCV RNA'nın PCR ile Saptanmasında Kullanılan Cihaz**

"IQ<sup>TM</sup> 5 Multicolor Real-Time PCR cihazı" (Bio-Rad, ABD) kullanılmıştır.

##### **3.1.2.1. HBV DNA/HCV RNA'nın PCR ile Saptanmasında Kullanılan Malzemeler**

Örnek sayısı kadar hesaplanan miktarda PCR buffer, primer 1 ve 2 (İontek), distile su, örnek (DNA/RNA), örnek sayısı kadar hesaplanan miktarda RT mix (HCV RNA için) kullanılmıştır.

##### **3.1.3. Agaroz Jel Elektroforezi için Kullanılan Malzemeler**

0.5-1 µl 6X Loading Dye solution (Fermentas), 3-5 µl PCR ürünü (DNA/RNA), 3 µl DNA ladder (Fermentas), 1 µl SYBR green I kullanılmıştır.

##### **3.1.4. PCR Ürünü Saflaştırma Kiti**

"High Pure PCR Product Purification Kit" (Roche ) kullanılmıştır.

#### **3.1.4.1. PCR Ürünü Safılaştırma Kiti İÇeriğindeki Malzemeler**

30-150 ml guanidin tiosiyanatlı binding buffer, 40-200 ml etanol ilave edilmiş 10-50 ml wash buffer, 30 ml ellution Buffer (Tris-HCl buffer, pH 8.5) kullanılmıştır.

#### **3.1.5. Dizi Analizi Reaksiyonu için Gerekli Malzemeler**

Dizi analizi için ekstrakte edilmiş DNA/RNA, 4 µl mix(DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit, Amersham), 0,6 µl İontek tarafından tasarlanan dizileme primeri ve H<sub>2</sub>O kullanılmıştır.

#### **3.1.6. Dizileme Çöktürme/Safılaştırma için Gerekli Malzemeler**

1 µl Na-asetat, 10 µl H<sub>2</sub>O, 280 µl etanol (%100), 15 µl template suppression reagent kullanılmıştır.

#### **3.1.7. Dizileme cihazı**

“ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, ABD” kullanılmıştır.

### **3.2. YÖNTEM**

Yöntem olarak Dizi Analizi Reaksiyonu kullanılmıştır. Dizi Analizi Reaksiyonunun basamakları aşağıdaki gibidir:

1-Serum Örneklerinden HBV DNA/HCV RNA Ekstraksiyonu

2-PCR

3-Agaroz Jel Elektrofrez (PCR Ürünlerinin Analizi)

4-PCR Ürünlerinin Safılaştırılması (Saf ürün eldesi)

5-Agaroz Jel Elektrofrez (PCR Ürünlerinin Analizi)

6-Dizi Analizi Reaksiyonu

7-Dizileme çöktürme/safılaştırma

8-Otomatik Dizi Analizi Cihazına Yükleme (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer)

### **3.2.1. HBV**

#### **3.2.1.1. Serum Örneklerinden HBV DNA Ekstraksiyonu**

Ekstraksiyon ‘‘QIAGEN QIAamp MinElute Virus Spin Ekstraksiyon kiti’’ ve ‘‘mikrosantrifüj’’ kullanılarak 200 µl serum örneğinden üretici firmanın önerileri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyona başlamadan önce tüm örnekler ve 13. basamaktaki Buffer AVE oda ısısına getirilmiştir. Isı bloğu 56°C'ye ayarlanmıştır. Buffer AW1, Buffer AW2 ve QIAGEN Protease hazırlanmıştır. Carrier RNA Buffer AL'ye eklenmiştir. HBV DNA ekstraksiyon basamakları aşağıdaki gibidir:

Önce 1.5 ml mikrosantrifüj tüpüne 25 µl QIAGEN Protease pipetlenmiştir. Üzerine 200 µl serum eklenmiştir. Örnek başına 220 µl Buffer AL+6.2 µl carrier RNA hazırlanmıştır (Tablo III'de özetlenmiştir). Bu karışımdan 200 µl alınarak örneğin üzerine eklenmiştir. Mikrosantrifüj tüpünün kapağı kapatılarak 15 saniye vorteksle karıştırılmıştır. Isı bloğunda 56°C'de 15 dakika inkübe edilmiştir. Mikrosantrifüj tüpünün kenarındaki damlacıkları aşağıya indirmek için spin santrifüj edilmiştir. Örneğe 250 µl etanol (%96-100) eklenmiştir. Mikrosantrifüj tüpünün kapağı kapatılarak 15 saniye vorteksle karıştırılmıştır. Etanol eklenmiş karışım oda sıcaklığında (15–25°C) 5 dakika inkübe edilmiştir. Mikrosantrifüj tüpünün kenarındaki damlacıkları aşağıya indirmek için tekrar spin santrifüj edilmiştir. Mikrosantrifüj tüpünün içindeki karışım QIAamp MinElute kolonuna dikkatlice koyulmuştur. Kapağı kapatılıp 6000 x g (8000 rpm) hızda 1 dakika santrifüjlenmiştir. Alttaki 1.5 ml'lik tüp, içinde biriken karışım ile birlikte atılmış ve QIAamp MinElute kolonu temiz bir 2 ml'lik collection tüpünün içine yerleştirilmiştir (Eğer santrifüjlemeden sonra karışımın tamamı kolondan geçmemişse, QIAamp MinElute kolonu tamamen boşalınca kadar yüksek devirde santrifüjlenmelidir). QIAamp MinElute kolon dikkatlice açılmış ve çepere değilmeden 500 µl Buffer AW1 eklenmiştir. Kapağı kapatılıp 6000 x g (8000 rpm) hızda 1 dakika santrifüjlenmiştir. Collection tüp içinde biriken sıvıyla birlikte atılmış ve QIAamp MinElute kolonu temiz bir 2 ml'lik collection tüpünün içine yerleştirilmiştir. QIAamp MinElute kolon dikkatlice açılmış ve çepere değilmeden 500 µl Buffer AW2 eklenmiştir. Kapağı kapatılıp 6000 x g (8000



rpm) hızda 1 dakika santrifüjlenmiştir. Collection tüp içinde biriken sıvıyla birlikte atılmış ve QIAmp MinElute kolonu temiz bir 2 ml'lik collection tüpünün içine yerleştirilmiştir. QIAmp MinElute kolon dikkatlice açılmış ve çepere değilmeden 500 µl etanol (% 96-100) eklenmiştir. Kapağı kapatılıp 6000 x g (8000 rpm) hızda 1 dakika santrifüjlenmiştir. Collection tüp içinde biriken sıvıyla birlikte atılmıştır. QIAmp MinElute kolon, 2 ml'lik temiz bir collection tüpünün içine yerleştirilmiştir. 20.000 x g (14.000 rpm) hızda 3 dakika santrifüjlenerek kolon tamamen kurutulmuştur. QIAmp MinElute kolon, 2 ml'lik temiz bir collection tüpünün içine yerleştirilmiştir. Kapağı açılıp kolonun tamamı kuruyana kadar 56°C'de 3 dakika inkübe edilmiştir. QIAmp MinElute kolon, temiz 1.5 ml'lik bir mikrosantrifüj tüpünün içine yerleştirilmiştir. Kapağı dikkatlice açılıp tam ortasına 20-150 (43 µl) Buffer AVE ya da RNase'dan arındırılmış su koyulmuştur. Kapağı kapatılıp 1 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. 20.000 x g (14.000 rpm) hızda 1 dakika santrifüjlenmiştir. Elde edilen HBV DNA süspansiyonu direkt olarak PCR için kullanılmak üzere + 4 °C'ye alınmıştır.

**Tablo-III.** Buffer AL, Carrier RNA/AVE Tablosu

<b>Örnek Sayısı</b>	<b>Buffer AL (ml)</b>	<b>Carrier RNA/AVE (µl)</b>
1	0.22	6.2
2	0.44	12.3
3	0.66	18.5
4	0.88	24.6
5	1.10	30.8
6	1.32	37.0
7	1.54	43.1
8	1.76	49.3
9	1.98	55.4
10	2.20	61.6
11	2.42	67.8
12	2.64	73.9
13	2.86	80.1
14	3.08	86.3
15	3.30	92.4
16	3.52	98.6
17	3.74	104.7
18	3.96	110.9
19	4.18	117.0
20	4.40	123.2
21	4.62	129.4
22	4.84	135.5
23	5.06	141.7

**3.2.1.2. HBV DNA'nın PCR ile Saptanması ve Amplifikasyonu**

PCR IQ <sup>TM</sup> 5 Multicolor Real Time PCR cihazında aşağıdaki prosedür uygulanarak gerçekleştirilmiştir.

Örnek sayısı kadar ince çeperli 0.2'lik ependorf tüp numaralandırılmıştır. Bir adet büyük ependorf tüp alınmış, örnek sayısı kadar hesaplanan miktarda dH<sub>2</sub>O ependorf içine konulmuştur. Üzerine örnek sayısı kadar hesaplanan miktarda İontek Laboratuvarı tarafından tasarlanan 2 adet primer (primer 1 ve primer 2) ve PCR buffer eklenmiştir. Bu karışım örnek sayısına bölünerek herbir ince çeperli 0.2'lik ependorf tüplere aktarılmıştır. 0.2'lik ependorf tüplerin herbirine örneklerin tamamı sırayla eklenmiştir. 0.2'lik ependorf tüpler IQ<sup>TM</sup> 5 Multicolor Real Time PCR cihazına yerleştirilmiştir. PCR'da kullanılan primerler aşağıda gösterilmiştir.

HBV-primer 1: TCGTGGTGGACTTCTCTCAATT

HBV-primer 2: CKTTGACADACTTTCCAATCAAT

#### **3.2.1.2.1. Amplifikasyon Programı**

IQ<sup>TM</sup> 5 Multicolor Real Time PCR cihazı (Bio-Rad, ABD) aşağıda belirtilen programlara ayarlanarak Real Time PCR uygulanmıştır.

HBV DNA amplifikasyon programı:

95 °C'de 15:00 dk

95 °C'de 00:45 dk

56 °C'de 00:45 dk

72 °C'de 00:45 dk

2 tekrar 45 siklus

22 °C'de ~

#### **3.2.1.3. Agaroz Jel Elektrofrez-i**

PCR ürünlerinin analizi agaroz jel elektrofrez-i yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Agaroz jel elektrofrez-i aşağıdaki prosedür uygulanarak gerçekleştirilmiştir.

#### **3.2.1.3.1. Agaroz Jel Elektrofrez-i Aşamaları**

Örnek başına 1 µl 6X yükleme solüsyonu parafilm üzerine konulmuştur. Parafilmdeki yükleme solüsyonunun herbirinin üzerine 3 µl örnek ilave edilmiştir.

Parafilmın sonuna tek başına 3 µl marker konulmuştur. Örneklerin ve markerın üzerine 1'er µl SYBR green I eklenmiştir. Mikropipet toplam hacme ayarlanmıştır. Örnekler mikropipetle 1-2 defa karıştırıldıktan sonra alınıp jele yüklenmiştir. Agaroz jel elektroforezi cihazının (Bio-Rad Wide Mini Subcell GT) voltajı 170 volta ayarlanmış, kısa örnekler (< 200 bp) 15 dakika, uzun örnekler (>200 bp) 20 dakika elektroforeze tabii tutulmuştur. Gel Doc-2000 cihazının (Bio-Rad) Gel Doc-UV bölümüne yerleştirilip, kapağı kapatılmıştır. Bantlar aranarak sonuçlar değerlendirilmiştir.

#### **3.2.1.4. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması**

Dizi analizi reaksiyonuna alınacak PCR ürünleri içinde primer, dNTP ve tuz kalıntıları bulunabilmektedir. Bunlar dizi analizi reaksiyonlarını etkileyebilmektedir. Bu nedenle ürünler ticari bir saflaştırma sistemi ile (High-Pure PCR product purification kit, Roche, ABD), üretici firmanın önerileri doğrultusunda saflaştırılmıştır. PCR ürünleri saflaştırma protokolü aşağıda belirtildiği şekilde uygulanmıştır.

25 µl PCR ürünü üzerine 200 µl 'Binding Buffer' eklenmiştir. 12.500 rpm'de 1,5 dakika santrifüj edilmiştir. Üzerine 500 µl 'Wash Buffer' eklenmiştir. Tekrar 12.500 rpm'de 1,5 dakika santrifüj edilmiştir. Üzerine 200 µl 'Wash Buffer' eklenmiş ve 12.500 rpm'de 1,5 dakika santrifüj edilmiştir. Üzerine 30 µl 'Elution Buffer' eklenerek 12.500 rpm'de 1,5 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen saflaştırılmış DNA parçalara ayrılarak, kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklanmıştır.

#### **3.2.1.5. Agaroz Jel Elektroforezi-II**

Saflaştırılmış DNA'ya yukarıda anlatıldığı gibi tekrar Agaroz jel elektroforezi uygulanmıştır.

#### **3.2.1.6. Dizi Analizi Reaksiyonu**

Dizi analizi için ekstrakte edilmiş ("QIAGEN QIAamp MinElute Virus Spin Ekstraksiyon kiti" kullanılarak elde edilmiş ürün) DNA kullanılarak PCR ile amplifikasyon gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonda İontek laboratuvarı tarafından

tasarlanan 0,6 µl dizileme primeri, 4 µl mix, dizi analizi reaksiyonu için ekstrakte edilip saflaştırılmış DNA ve H<sub>2</sub>O kullanılmıştır. Reaksiyonda kullanılan primer ve mix miktarı sabit, DNA ve su miktarı değişkendir. Reaksiyonda kullanılacak mix, örnek, primer ve dH<sub>2</sub>O miktarı toplamda 10 µl olacak şekilde hazırlanmıştır. Örnek miktarı UV altındaki marker ışımaya ve diğer örneklerle olan orantısına bakılarak belirlenmiştir.

### **3.2.1.6.1. Dizi Analizi Reaksiyonu Aşamaları**

Örnek sayısı kadar 0.2 ml'lik ependorf alınmış ve tek tek örnekler dağıtılmıştır. Her bir ependorfa belirlenen miktarda dH<sub>2</sub>O eklenmiştir. Sırasıyla primer ve mix ependorflara dağıtılmıştır. Ependorflar IQ<sup>TM</sup> 5 Multicolor Real Time PCR cihazına yerleştirilmiştir.

HBV Dizi analizi için aşağıdaki program uygulanmıştır:

95 °C'de 15:00 dk

95 °C'de 00:45 dk

56 °C'de 00:45 dk

72 °C'de 00:45 dk

2 tekrar 45 siklus

22 °C'de ~

### **3.2.1.7. Dizileme Çöktürme/Saflaştırma**

Elde edilen DNA saflaştırılmıştır. Bu reaksiyon için 1 µl Na-asetat, 10 µl H<sub>2</sub>O, 280 µl etanol (%100) kullanılmıştır. Reaksiyon aşağıdaki prosedür izlenerek tamamlanmıştır.

Dizileme reaksiyonundan çıkan ince çeperli 0.2 ml'lik ependorf tüplerdeki örnek üzerine sırasıyla 1 µl Na-asetat, 10 µl H<sub>2</sub>O, 80 µl etanol (%100) eklenmiştir. Bu karışıma vortex yapılmış ve 12.500 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Herbir ependorf üzerine 200 µl etanol eklenmiş ve tekrar 12.500 rpm'de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Alkolden tamamen kurtulana kadar ısı

bloğunda tutulmuştur. DNA'ya ortam oluşturmak için 15'er µl Template suppression reagent ependorflara dağıtılmıştır. Vortex ve spin santrifüj yapılmıştır.

### **3.2.1.8. Dizi Analizi**

QIAGEN QIAamp MinElute Virus Spin Ekstraksiyon kiti' ile ekstraksiyonu yapıp PCR ile amplifiye edilen ve saflaştırılan ürünün DNA dizileri İontek Laboratuvarı tarafından tasarlanan dizileme primeri, mix, DNA ve H<sub>2</sub>O kullanılarak otomatik ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, ABD) cihazında analiz edilmiştir.

### **3.2.2. HCV**

#### **3.2.2.1. Serum Örneklerinden HCV RNA Ekstraksiyonu**

Ekstraksiyon “QIAGEN QIAamp MinElute Virus Spin Ekstraksiyon kiti” ve “mikrosantrifüj” kullanılarak 200 µl serum örneğinden üretici firmanın önerileri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyona başlamadan önce tüm örnekler ve 13. basamaktaki Buffer AVE oda ısısına getirilmiştir. Isı bloğu 56°C'ye ayarlanmıştır. Buffer AW1, Buffer AW2 ve QIAGEN Protease hazırlanmıştır. Carrier RNA Buffer AL'ye eklenmiştir. HCV RNA ekstraksiyon basamakları aşağıdaki gibi uygulanmıştır.

1.5 ml mikrosantrifüj tüpüne 25 µl QIAGEN Protease pipetlenmiştir. Üzerine 200 µl serum eklenmiştir. Örnek başına 220 µl Buffer AL+6.2 µl carrier RNA hazırlanmıştır (Bakınız Tablo III). Bu karışımdan 200 µl alınarak örneğin üzerine eklenmiştir. Mikrosantrifüj tüpünün kapağı kapatılarak 15 saniye vorteksle karıştırılmıştır. Isı bloğunda 56°C'de 15 dakika inkübe edilmiştir. Mikrosantrifüj tüpünün kenarındaki damlacıkları aşağıya indirmek için spin santrifüj edilmiştir. Örneğe 250 µl etanol (%96-100) eklenmiştir. Mikrosantrifüj tüpünün kapağı kapatılarak 15 saniye vorteksle karıştırılmıştır. Etanol eklenmiş karışım oda sıcaklığında (15–25°C) 5 dakika inkübe edilmiştir. Mikrosantrifüj tüpünün kenarındaki damlacıkları aşağıya indirmek için spin santrifüj edilmiştir. Mikrosantrifüj tüpünün içindeki karışım QIAamp MinElute kolonuna dikkatlice koyulmuştur. Kapağı kapatılıp 6000 x g (8000 rpm) hızda 1 dakika

santrifüjlenmiştir. Alttaki 1.5 ml'lik tüp, içinde biriken karışım ile birlikte atılmış ve QIAmp MinElute kolonu temiz bir 2 ml'lik collection tüpünün içine yerleştirilmiştir (Eğer santrifüjlemeden sonra karışımın tamamı kolondan geçmemişse, QIAmp MinElute kolonu tamamen boşalınca kadar yüksek devirde santrifüjlenmelidir). QIAmp MinElute kolon dikkatlice açılmış ve çepere değilmeden 500 µl Buffer AW1 eklenmiştir. Kapağı kapatılıp 6000 x g (8000 rpm) hızda 1 dakika santrifüjlenmiştir. Collection tüp içinde biriken sıvıyla birlikte atılmış ve QIAmp MinElute kolonu temiz bir 2 ml'lik collection tüpünün içine yerleştirilmiştir. QIAmp MinElute kolon dikkatlice açılmış ve çepere değilmeden 500 µl Buffer AW2 eklenmiştir. Kapağı kapatılıp 6000 x g (8000 rpm) hızda 1 dakika santrifüjlenmiştir. Collection tüp içinde biriken sıvıyla birlikte atılmış ve QIAmp MinElute kolonu temiz bir 2 ml'lik collection tüpünün içine yerleştirilmiştir. QIAmp MinElute kolon dikkatlice açılmış ve çepere değilmeden 500 µl etanol (%96-100) eklenmiştir. Kapağı kapatılıp 6000 x g (8000 rpm) hızda 1 dakika santrifüjlenmiştir. Collection tüp içinde biriken sıvıyla birlikte atılmıştır. QIAmp MinElute kolon, 2 ml'lik temiz bir collection tüpünün içine yerleştirilmiştir. 20.000 x g (14.000 rpm) hızda 3 dakika santrifüjlenerek kolon tamamen kurutulmuştur. QIAmp MinElute kolon, 2 ml'lik temiz bir collection tüpünün içine yerleştirilmiştir. Kapağı açılıp kolonun tamamı kuruyana kadar 56°C'de 3 dakika inkübe edilmiştir. QIAmp MinElute kolon, temiz 1.5 ml'lik bir mikrosantrifüj tüpünün içine yerleştirilmiştir. Kapağı dikkatlice açılıp tam ortasına 20-150 (43 µl) Buffer AVE ya da RNase'dan arındırılmış su koyulmuştur. Kapağı kapatılıp 1 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. 20.000 x g (14.000 rpm) hızda 1 dakika santrifüjlenmiştir. Elde edilen HCV RNA süspansiyonu direkt olarak PCR için kullanılmak üzere + 4 °C'ye alınmıştır.

### **3.2.2.2. HCV RNA'nın PCR ile Saptanması ve Amplifikasyonu**

PCR IQ™ 5 Multicolor Real Time PCR cihazında aşağıdaki prosedür uygulanarak gerçekleştirilmiştir.

Örnek sayısı kadar ince çepirli 0.2'lik ependorf tüp numaralandırılmıştır. Bir adet büyük ependorf tüp alınmış, örnek sayısı kadar hesaplanan miktarda

dH<sub>2</sub>O ependorf tüp içine konulmuştur. Üzerine örnek sayısı kadar hesaplanan miktarda İontek Laboratuvarı tarafından tasarlanan 2 adet primer (primer 1 ve primer 2), PCR buffer ve RT mix eklenmiştir. Bu karışım örnek sayısına bölünerek her bir ince çeperli 0.2'lik ependorf tüplere aktarılmıştır. Bu ependorfların herbirine örneklerin tamamı sırayla eklenmiş ve ependorflar IQ<sup>TM</sup> 5 Multicolor Real Time PCR cihazına yerleştirilmiştir. PCR'da kullanılan primerler aşağıda gösterilmiştir.

HCV-Primer-1: TGGGGTTCTCGTATGATACCC

HCV-Primer-2: CCTGGTCATAGCCTCCGTGAA

#### **3.2.2.2.1. Amplifikasyon Programı**

IQ<sup>TM</sup> 5 Multicolor Real Time PCR cihazı (Bio-Rad, ABD) aşağıda belirtilen programlara ayarlanarak Real Time PCR uygulanmıştır.

HCV RNA amplifikasyon programı

50 °C'de 30:00 dk

95 °C'de 15:00 dk

94 °C'de 00:20 dk

54.8 °C'de 01.00 dk

3 tekrar 50 siklus

22 °C'de ~

#### **3.2.2.3. Agaroz Jel Elektroforezi-I**

PCR ürünlerinin analizi agaroz jel elektroforezi yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Agaroz jel elektroforezi aşağıdaki prosedür uygulanarak gerçekleştirilmiştir.

#### **3.2.2.3.1. Agaroz Jel Elektroforezi Aşamaları**

Örnek başına 1 µl 6X yükleme solüsyonu parafilm üzerine konulmuştur. Parafilmdeki yükleme solüsyonunun herbirinin üzerine 3 µl örnek ilave edilmiştir. Parafilm sonuna tek başına 3 µl marker konulmuştur. Örneklerin ve markerin



üzerine 1'er µl SYBR green I eklenmiştir. Mikropipet toplam hacme ayarlanmıştır. Örnekler mikropipetle 1-2 defa karıştırıldıktan sonra alınıp jele yüklenmiştir. Agaroz jel elektroforezi cihazının (Bio-Rad Wide Mini Subcell GT, ABD) voltajı 170 volta ayarlanmış, kısa örnekler (< 200 bp) 15 dakika, uzun örnekler (>200 bp) 20 dakika elektroforeze tabii tutulmuştur. Gel Doc-2000 cihazının (Bio-Rad) Gel Doc-UV bölümüne yerleştirilip, kapağı kapatılmıştır. Bantlar aranarak sonuçlar değerlendirilmiştir.

#### **3.2.2.4. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması**

Dizi analizi reaksiyonuna alınacak PCR ürünleri içinde primer, dNTP ve tuz kalıntıları bulunabilmektedir. Bunlar dizi analizi reaksiyonlarını etkileyebilmektedir. Bu nedenle ürünler ticari bir saflaştırma sistemi ile (High-Pure PCR product purification kit, Roche, ABD), üretici firmanın önerileri doğrultusunda saflaştırılmıştır. PCR ürünleri saflaştırma protokolü aşağıda belirtildiği şekilde uygulanmıştır.

25 µl PCR ürünü üzerine 200 µl 'Binding Buffer' eklenmiş ve 12.500 rpm'de 1,5 dakika santrifüj edilmiştir. Üzerine 500 µl 'Wash Buffer' eklenmiştir. 12.500 rpm'de 1,5 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra 200 µl 'Wash Buffer' eklenerek tekrar 12.500 rpm'de 1,5 dakika santrifüj edilmiştir. 30 µl 'Elution Buffer' eklenmiştir. 12.500 rpm'de 1,5 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen saflaştırılmış RNA parçalara ayrılarak kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklanmıştır.

#### **3.2.2.5. Agaroz Jel Elektroforezi-II**

Saflaştırılmış PCR ürünlerine yukarıda anlatıldığı gibi tekrar Agaroz jel elektroforezi uygulanmıştır.

#### **3.2.2.6. Dizi Analizi Reaksiyonu**

Dizi analizi için ekstrakte edilmiş ("QIAGEN QIAamp MinElute Virus Spin Ekstraksiyon kiti" kullanılarak elde edilmiş ürün) RNA kullanılarak PCR ile amplifikasyon gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonda İontek Laboratuvarı tarafından

tasarlanan 0,6 µl dizileme primeri, 4 µl mix, dizi analizi reaksiyonu için ekstrakte edilip saflaştırılmış RNA ve H<sub>2</sub>O kullanılmıştır. Reaksiyonda kullanılan primer ve mix miktarı sabit, RNA ve su miktarı değişkendir. Reaksiyonda kullanılacak mix, örnek, primer ve dH<sub>2</sub>O miktarı toplamda 10 µl olacak şekilde hazırlanmıştır. Örnek miktarı UV altındaki marker ışımaya ve diğer örneklerle olan orantısına bakılarak belirlenmiştir.

### **3.2.2.6.1. Dizi Analizi Reaksiyonu Aşamaları**

Örnek sayısı kadar 0.2 ml'lik ependorf tüp alınmış ve tek tek örnekler dağıtılmıştır. Her bir ependorf tüpe belirlenen miktarda dH<sub>2</sub>O eklenmiştir. Sırasıyla primer ve mix ependorf tüplere dağıtılmıştır. Bu ependorf tüpler IQ<sup>TM</sup> 5 Multicolor Real Time PCR cihazına yerleştirilmiştir.

HCV Dizi analizi için aşağıdaki program uygulanmıştır:

50 °C'de 30:00 dk

95 °C'de 15:00 dk

94 °C'de 00:20 dk

54.8 °C'de 01.00 dk

3 tekrar 50 siklus

22 °C'de ~

### **3.2.2.7. Dizileme Çöktürme/Saflaştırma**

Elde edilen RNA saflaştırılmıştır. Bu reaksiyon için 1 µl Na-asetat, 10 µl H<sub>2</sub>O, 280 µl etanol (%100) kullanılmıştır. Reaksiyon aşağıdaki prosedür izlenerek tamamlanmıştır.

Dizileme reaksiyonundan çıkan ince çeperli 0.2 ml'lik ependorflardaki örnek üzerine sırasıyla 1 µl Na-asetat, 10 µl H<sub>2</sub>O, 80 µl etanol (%100) eklenmiştir. Bu karışıma vortex yapılmıştır. 12.500 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Her bir ependorf tüp üzerine 200 µl etanol eklenmiştir. 12.500 rpm'de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Alkolden tamamen kurtulana kadar ısı bloğunda

tutulmuştur. RNA'ya ortam oluşturmak için 15'er µl Template suppression reagent ependorflara dağıtılmıştır. Vortex ve spin santrifüj yapılmıştır.

#### **3.2.2.8. Dizi Analizi ve Filogenetik Analiz**

QIAGEN QIAamp MinElute Virus Spin Ekstraksiyon kiti'' ile ekstraksiyonu yapıp PCR ile amplifiye edilen ve saflaştırılan ürünün RNA dizileri İontek laboratuvarı tarafından tasarlanan dizileme primeri, mix, RNA ve H<sub>2</sub>O kullanılarak otomatik ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, ABD) cihazında analiz edilmiştir. Diziler Clustal W programı kullanılarak hizalanmıştır. Filogenetik ağaç çizimi ve analizi, Neighbor-joining metod kullanılarak Mega version 3.0 bilgisayar yazılım programı ile gerçekleştirilmiştir.

## IV-BULGULAR

Bu çalışma, 44'ü HBV DNA, 30'u HCV RNA pozitif olmak üzere toplam 74 hastada yapılmıştır. HBV'li hastaların 25'i (%56.8) LAM tedavisi hiç almamışlardan, 19'u (%43.2) halen LAM tedavisi alanlardan seçilmiştir.

HBV'li serum örneklerinde genotipleme, mutasyonel analiz ve ilaç direnci; HCV'li serum örneklerinde ise genotipleme ve filogenetik analiz araştırmaları yapılmıştır. Çalışma grubundaki HBV'li hastaların tümü HBsAg ve HBV DNA olumlu, anti HCV, anti delta total antikorları olumsuz; yine bu gruptaki HCV'li hastaların hepsi anti-HCV IgM ve HCV RNA olumlu, HBsAg, anti delta total antikorları olumsuz bulunmuştur. HBV ve HCV'li hastalardan veri toplama formu ile elde edilen bilgiler Tablo-IV ve V'de özetlenmiştir.

**Tablo-IV. HBV'li hasta sonuçları**

No	Yaş	Cinsiyet	Klinik	Kan nakli	C. girişim	Diyaliz	Aile öyküsü	HBsAg	HBV DNA	Anti-HDV	Anti-HCV	Genotip	Mutasyon	İlaç direnci	T. ilişkisi	T. süresi	T. tarihi
1	34	E	Enf	-	-	-	-	+	+	-	-	D	Q215S	Lam	T.Ö	-	-
2	57	E	Enf	-	-	-	-	+	+	-	-	D	-	-	T.S	34 ay	2000
3	42	E	Enf	-	-	-	-	+	+	-	-	D	-	-	T.O	-	-
4	52	E	Enf	+	-	-	-	+	+	-	-	D	-	-	T.O	-	-
5	17	E	Enf	-	-	-	+	+	+	-	-	D	-	-	T.O	-	-
6	51	E	Enf	-	-	-	-	+	+	-	-	D	-	-	T.O	-	-
7	59	E	Enf	-	-	-	-	+	+	-	-	D	-	-	T.O	-	-
8	67	K	Enf	-	-	-	-	+	+	-	-	D	-	-	T.O	-	-
9	31	E	Gast	-	+	-	+	+	+	-	-	D	-	-	T.O	-	-
10	55	E	Gast	-	-	-	+	+	+	-	-	D	-	-	T.S	24 ay	2005
11	38	E	Enf	-	-	-	-	+	+	-	-	D	-	-	T.S	5 ay	2006
12	41	E	Enf	-	-	-	+	+	+	-	-	D	-	-	T.O	-	-
13	38	E	Enf	-	-	-	-	+	+	-	-	D	-	-	T.O	-	-
14	20	K	Enf	-	-	-	+	+	+	-	-	D	L80I, M204I	Lam	T.S	23 ay	2004
15	28	E	Enf	-	-	-	+	+	+	-	-	D	V214A	ADV	T.S	18 ay	2006
16	21	K	Enf	-	-	-	+	+	+	-	-	D	M204I	Lam	T.S	24 ay	2004
17	46	E	Enf	-	-	-	+	+	+	-	-	D	-	-	T.O	-	-
18	53	E	Gast	-	-	-	-	+	+	-	-	D	-	-	T.O	-	-
19	63	K	Gast	-	+	-	+	+	+	-	-	D	A181T,N236T	ADV	T.S	5 yıl	2000
20	51	E	Enf	-	+	-	-	+	+	-	-	D	V84M, V173L	ADV,Lam	T.S	4 yıl	2003
21	43	E	Gast	-	+	-	-	+	+	-	-	D	-	-	T.O	-	-
22	38	K	Enf	-	-	-	+	+	+	-	-	D	-	-	T.O	-	-
23	24	K	Enf	+	+	-	-	+	+	-	-	D	-	-	T.O	-	-
24	47	E	Enf	-	-	-	-	+	+	-	-	D	-	-	T.O	-	-
25	36	K	K.B	-	+	-	+	+	+	-	-	D	-	-	T.O	-	-
26	48	K	Enf	-	-	-	+	+	+	-	-	D	-	-	T.O	-	-
27	21	E	Enf	-	-	-	+	+	+	-	-	D	-	-	T.O	-	-
28	38	E	K.B	-	+	-	-	+	+	-	-	D	-	-	T.O	-	-
29	51	E	K.B	-	-	-	+	+	+	-	-	D	M204I	Lam	T.S	7 yıl	1998
30	26	E	Enf	-	-	-	-	+	+	-	-	D	-	-	T.S	27 ay	2004
31	55	E	Enf	-	-	-	-	+	+	-	-	D	M204I	Lam	T.S	7 yıl	1998
32	71	E	Enf	-	+	-	-	+	+	-	-	D	-	-	T.S	14 ay	2003
33	57	E	Enf	-	+	-	-	+	+	-	-	D	-	-	T.S	4 yıl	2001
34	58	E	Enf	-	+	-	+	+	+	-	-	D	M204I	Lam	T.S	15 ay	2006
35	47	K	Enf	-	+	-	+	+	+	-	-	D	Q215S	Lam	T.S	1 ay	1998
36	28	E	Enf	-	-	-	+	+	+	-	-	D	M204I, L80V	Lam	T.S	24 ay	2005
37	41	K	Enf	-	+	-	-	+	+	-	-	D	M204LL180M	Lam	T.S	3 ay	2007
38	42	K	Enf	-	+	-	+	+	+	-	-	D	M204IQ215S	Lam	T.S	13 ay	1998
39	38	E	Enf	-	-	-	+	+	+	-	-	D	-	-	T.S	3 ay	2007
40	52	E	Enf	-	-	-	-	+	+	-	-	D	-	-	T.O	-	-
41	25	E	Enf	-	-	-	-	+	+	-	-	D	M204I	Lam	T.O	-	-
42	27	K	Enf	-	-	-	-	+	+	-	-	D	M204I	Lam	T.O	-	-
43	45	K	Enf	-	-	-	+	+	+	-	-	D	-	-	T.O	-	-
44	27	E	Enf	-	+	-	+	+	+	-	-	D	-	-	T.O	-	-

**Tablo-V. HCV'li hasta sonuçları**

No	Yaş	Cinsiyet	Klinik	Kan nakli	C. girişim	Diyaliz	Aile öyküsü	Anti- HCV	HCV RNA	HBsAg	Anti-HDV	Genotip
1	33	K	Gast	+	+	+	-	+	+	-	-	1a
2	43	K	Enf	-	+	-	-	+	+	-	-	1a
3	32	K	Enf	-	-	-	-	+	+	-	-	1c
4	44	K	Gast	-	-	+	-	+	+	-	-	1a
5	43	E	Gast	-	-	-	-	+	+	-	-	1b
6	67	K	Enf	+	+	-	-	+	+	-	-	1b
7	34	E	Gast	-	-	+	-	+	+	-	-	1a
8	38	K	Gast	-	+	-	-	+	+	-	-	1b
9	40	K	Enf	-	-	-	-	+	+	-	-	4a
10	40	E	Gast	+	-	-	-	+	+	-	-	1b
11	28	E	Gast	+	+	+	-	+	+	-	-	1b
12	40	K	Enf	+	-	-	-	+	+	-	-	1b
13	56	E	Enf	+	+	-	-	+	+	-	-	1b
14	60	K	Enf	-	+	-	-	+	+	-	-	4a
15	34	K	Gast	-	+	-	-	+	+	-	-	1b
16	64	K	Enf	-	-	-	-	+	+	-	-	1b
17	63	K	Enf	-	-	-	-	+	+	-	-	1b
18	68	K	Gast	+	+	-	-	+	+	-	-	4a
19	35	K	Enf	+	-	-	-	+	+	-	-	1b
20	52	E	Enf	-	-	-	-	+	+	-	-	1b
21	34	K	Enf	+	+	-	-	+	+	-	-	1b
22	44	K	Enf	-	-	-	-	+	+	-	-	1b
23	57	K	Enf	-	+	-	-	+	+	-	-	1a
24	63	K	Enf	-	-	-	-	+	+	-	-	1b
25	57	K	Enf	-	-	-	-	+	+	-	-	4a
26	47	K	Enf	+	-	-	-	+	+	-	-	1b
27	68	K	Gast	+	+	-	-	+	+	-	-	1b
28	35	E	Enf	-	-	-	-	+	+	-	-	1a
29	50	K	Enf	+	+	-	-	+	+	-	-	1b
30	55	E	Gast	+	-	-	-	+	+	-	-	1b

E: Erkek  
K: Kadın  
Gast: Gastroenteroloji AD  
T.ilişkisi: Tedavi ilişkisi  
T.tarihi: İlk tanı tarihi

C.girişim: Cerrahi girişim  
Enf: Enfeksiyon Hastalıkları AD  
K.B: Kan Bankası  
T.süresi: Tedavi süresi

HBV'li 44 hastanın 31'i (%70.5) erkektir. Yaşları 17-71 arasında olup yaş ortalaması  $42 \pm 13.57$ 'dir. Kliniklere göre dağılımı incelendiğinde Enfeksiyon Hastalıkları polikliniğinden 36 hasta (%81.8), Gastroenteroloji polikliniğinden 5 hasta (%11.4), Kan Merkezi'nden 3 hasta (%6.8) şeklinde dağıldığı gözlenmiştir.

Çalışma grubundaki 30 HCV'li hastanın 22'si (%73.3) kadındır. Yaşları 28-68 arasında olup yaş ortalaması  $47 \pm 12.4$ 'dür. Kliniklere göre dağılımı incelendiğinde Enfeksiyon Hastalıkları polikliniğinden 19 hasta (%63.3), Gastroenteroloji polikliniğinden 11 hasta (%36.7) şeklinde dağıldığı gözlenmiştir.

Çalışmaya dahil edilen tüm hastaların (HBV ve HCV) yaş ve cinsiyete göre dağılımı Tablo-VI'da gösterilmiştir.

**Tablo-VI.** HBV/HCV'li hastaların yaş ve cinsiyete göre dağılımı

Hasta	Yaş	Cinsiyet		Toplam
		Erkek	Kadın	
HBV enfeksiyonlu	17-29	7	4	11
	30-44	9	4	13
	45-59	14	3	17
	>60	1	2	3
	<b>Toplam</b>	<b>31</b>	<b>13</b>	<b>44</b>
	HCV enfeksiyonlu	28-39	3	6
40-49		2	6	8
50-59		3	3	6
>60		-	7	7
<b>Toplam</b>		<b>8</b>	<b>22</b>	<b>30</b>

Çalışma grubundaki 44 HBV'li hastada risk faktörü olarak 21'inde (%47.7) aile öyküsü, 13'ünde (%29.5) cerrahi girişim öyküsü, 2'sinde (%4.5)

geçmişte transfüzyon öyküsü ve 8'inde (%18.3) diğer risk faktörleri tespit edilmiştir.

Çalışma grubundaki 30 HCV'li hastada ise risk faktörü olarak 13'ünde (%43.3) geçmişte transfüzyon öyküsü, 13'ünde (%43.3) cerrahi girişim öyküsü ve 4'ünde (%13.3) diyalize girme öyküsü tespit edilmiştir.

Çalışmaya dahil edilen tüm hastaların (HBV ve HCV) risk faktörlerine göre enfeksiyon etkenlerinin dağılımı Tablo-VII'de gösterilmiştir.

**Tablo-VII.** Risk faktörlerine göre enfeksiyon etkenlerinin dağılımı

RİSK FAKTÖRÜ	ETKEN			
	HBV		HCV	
	n	%	n	%
<b>Diyalize girme</b>	-	-	4	13.3
<b>Transfüzyon öyküsü</b>	2	4.5	13	43.3
<b>Cerrahi girişim öyküsü</b>	13	29.5	13	43.3
<b>Aile öyküsü</b>	21	47.7	-	-
<b>Diğer</b>	8	18.3	-	-

Bu çalışmada HBsAg'si pozitif 25'i LAM tedavisi hiç uygulanmamış, 19'u halen LAM tedavisi almakta olan toplam 44 hastaya ait serum örneklerinin hepsi "QIAGEN QIAamp MinElute Virus Spin Ekstraksiyon kiti" (QIAGEN, 57704) ile HBV DNA açısından pozitif bulunmuştur. DNA Polimeraz geninin 80-260. kodonları arasındaki bölge PCR ile çoğaltılıp, dizi analizi yapılarak genotipleme, mutasyonel analiz ve ilaç direnci araştırmaları yapılmıştır.

Çalışmaya dahil edilen toplam 44 HBV'li hastanın tamamında (%100) genotip D bulunmuştur. Aynı dizilerde yapılan mutasyonel analiz ve ilaç direnci araştırmalarında ise; 6 hastada (%13.6) M204I mutasyonu (LAM direnci), 2 hastada (%4.5) Q215S mutasyonu (LAM direnci), birer hastada (%2.3) V214A mutasyonu (ADV direnci), L80I+M204I mutasyonu (LAM direnci),



A181T+N236T mutasyonu (ADV direnci), V84M+V173L mutasyonu (ADV ve LAM direnci), L80V+M204I mutasyonu (LAM direnci), Q215S+M204I mutasyonu (LAM direnci), ve M204I+L180M mutasyonu (LAM direnci) saptanmıştır. Geri kalan 29 hastada (%65.9) ise mutasyon ya da ilaç direncine rastlanmamıştır. HBV'li hastalarda saptanan mutasyonların dağılımı Tablo-VIII'de, bu mutasyonların hasta gruplarına göre dağılımı ise Tablo-IX'da gösterilmiştir.

**Tablo-VIII.HBV mutasyonlarının dağılımı**

<b>Mutasyon</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
<b>M204I</b>	6	13,6
<b>V214A</b>	1	2,3
<b>Q215S</b>	2	4,5
<b>L80I+M204I</b>	1	2,3
<b>A181T+N236T</b>	1	2,3
<b>V84M+V173L</b>	1	2,3
<b>L80V+M204I</b>	1	2,3
<b>M204I+Q215S</b>	1	2,3
<b>M204I+L180M</b>	1	2,3
<b>Toplam</b>	<b>15</b>	<b>34,1</b>

**Tablo-IX.** HBV mutasyonlarının hasta gruplarına göre dağılımı

Mutasyon	Tedavi öncesi (Primer direnç)		Tedavi sırasında (Sekonder direnç)	
	(n=25)	%	(n=19)	%
M204I	2	%8	4	%21
V214A	-	-	1	%5.2
Q215S	1	%4	1	%5.2
L80I+M204I	-	-	1	%5.2
A181T+N236T	-	-	1	%5.2
V84M+V173L	-	-	1	%5.2
L80V+M204I	-	-	1	%5.2
M204I+Q215S	-	-	1	%5.2
M204I+L180M	-	-	1	%5.2
<b>Toplam</b>	<b>3</b>	<b>%12</b>	<b>12</b>	<b>%52.6</b>

LAM tedavisi hiç uygulanmamış 25 hastanın 3'ünde, sadece LAM direnci saptanmıştır. Halen LAM tedavisi almakta olan 19 hastanın ise 9'unda sadece LAM direnci, 2'sinde sadece ADV direnci, 1'inde LAM ve ADV direnci birlikte saptanmıştır. Sonuç olarak toplam 44 HBV'li hastanın 12'sinde (%27.3) sadece LAM direnci, 2'sinde (%4.5) sadece ADV direnci ve 1'inde (%2.3) LAM ve ADV direnci birlikte olmak üzere toplam 15 hastada (%34.1) ilaç direnci saptanmıştır (Tablo X).

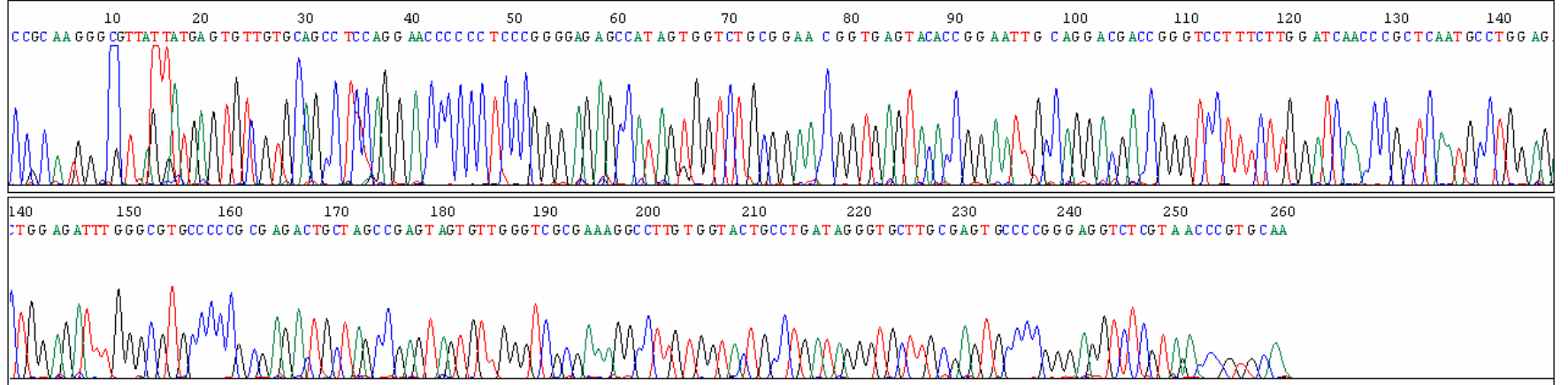
**Tablo-X.** HBV ilaç direncinin dağılımı

<b>İlaç Direnci</b>	<b>Tedavi Öncesi (Primer direnç) (n=25)</b>	<b>Tedavi Sırasında (Sekonder direnç) (n=19)</b>	<b>Toplam</b>
<b>Sadece LAM</b>	3	9	12
<b>Sadece ADV</b>	-	2	2
<b>LAM+ADV</b>	-	1	1
<b>Toplam</b>	<b>3</b>	<b>12</b>	<b>15</b>

Bu çalışmada test edilen anti-HCV Ig M'si pozitif 30 serum örneğinin ise hepsi "QIAGEN QIAamp MinElute Virus Spin Ekstraksiyon kiti" ile HCV RNA açısından pozitif bulunmuş ve dizi analizi yöntemi ile genotipleme yapılmıştır. Genotipleme için HCV genomunun 5'NCR'sinin genotip belirleyici dizileri otomatik ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, 4330878, ABD) cihazında analiz edilmiştir. Diziler Clustal W programı kullanılarak hizalanmıştır. Filogenetik ağaç çizimi ve analizi, NEIGHBOR-JOINING metod kullanılarak MEGA version 3.0 bilgisayar yazılım programı ile gerçekleştirilmiştir.

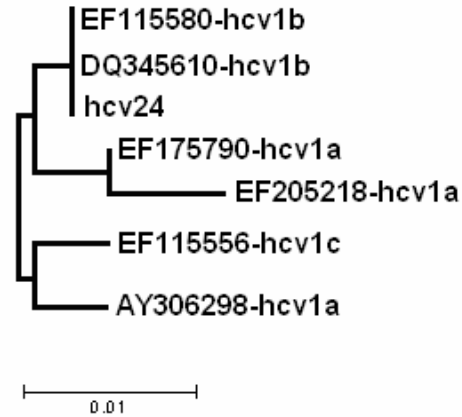
ABI PRISM 310 Genetic Analyzer cihazında analiz edilen HCV dizilerinden 24. örneğin nükleotid dizilimi Şekil-5'de ve MEGA version 3.0 programı kullanılarak çizilen filogenetik ağaçta HCV-24 örneğinin konumu Şekil-6'da gösterilmiştir.

Şekil-5: ABI Prizm cihazında HCV-24 numaralı örneğin nükleotid dizilimi



**Şekil-6:** MEGA Programında HCV-24 numaralı örneğin genotiplemesi ve filogenetik ağaçtaki konumu

**EF115580**→**HCV1B**→\*\*\*CTCCAGGACCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCCTTTCTTGATCAACCCGCTCAATG  
CCTGG  
**DQ345610**→**HCV1B**→\*\*\*CTCCAGGACCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCCTTTCTTGATCAACCCGCTCAATG  
CCTGG  
**EF175790**→**HCV1A**→\*\*\*CTCCAGGACCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCCTTTCTTGATAAACCCGCTCAATG  
CCTGG  
**EF205218**→**HCV1A**→\*\*\*CTCCAGGACCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCCTTTCTTGATCAACCCGCTCAATG  
CCTGG  
**EF115556**→**HCV1C**→\*\*\*CTCCAGGACCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCCTTTCTTGATAAACCCGCTCAATG  
CCTGG  
**AY306298**→**HCV1A**→\*\*\*CTCCAGGACCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCCTTTCTTGATAAACCCGCTCAATG  
CCTGG  
**HCV24**→**HCV1B**→\*\*\*\*\*CTCCAGGACCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCCTTTCTTGATCAACCCGCTCAATG  
CTGGAGATTGGGCGTGCCCCGCGAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTGCGGAAAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGGGTGCTTGCAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAACCCGTGCAA



HCV RNA'sı pozitif toplam 30 hastanın 19'unda (%63.3) subtip 1b, 6'sında (%20) subtip 1a, 4'ünde (%13.3) subtip 4a, 1'inde (%3.3) subtip 1c bulunmuştur. Toplam 26(%86.6) hastada genotip 1 baskın olan genotip olarak belirlenmiştir. Çalışmada saptanan HCV genotiplerinin dağılımı Tablo-XI'da gösterilmiştir.

**Tablo-XI.** Çalışmada saptanan HCV genotiplerinin dağılımı

<b>HCV Genotip</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
<b>1a</b>	6	20
<b>1b</b>	19	63.3
<b>4a</b>	4	13.3
<b>1c</b>	1	3.3

## V-TARTIŞMA

HBV ve HCV enfeksiyonları tüm dünyada önemli halk sağlığı problemleri arasındadır ve kronik hepatit, siroz, HCC gibi antitelere neden olmaktadır. Yakın zamanda yapılan araştırmalar dünyada yaklaşık 2 milyar insanın HBV ile karşılaştığını, 170 milyon insanın da HCV ile enfekte olduğunu göstermektedir (138).

HBV enfeksiyonunun dünyadaki en yaygın enfeksiyonlardan olduğu ve yaklaşık 400 milyon hepatit B taşıyıcısının bulunduğu düşünölmektedir. Her yıl %33'ü HCC'dan, geri kalanı karaciğer hastalığının son dönem komplikasyonlarından olmak üzere yaklaşık 1 milyon insan HBV enfeksiyonundan kaybedilmektedir (139).

HBV, tüm genomundaki yaklaşık >%8 nükleotid farklılığı nedeniyle A'dan H'ye kadar 8 genotipe ayrılmıştır (140). Aynı zamanda bu genotipler farklı coğrafi dağılımlar da göstermektedir. Genotip B ve C Asya'da daha sık görölmürken, A ve D genotipleri sıklıkla batı ölkelerinde ve Hindistan'da görölmektedir. Genotip E Afrika ölkeleri ile sınırlı iken, F genotipi yaygın olarak Orta ve Güney Amerika'da saptanmaktadır (20).

HBV taşıyıcılık oranları, dünyanın değişik bölgelerinde önemli farklılıklar göstermektedir ve bu bir ölçüde genetik dağılım farklılığı ile paraleldir. HBV taşıyıcılık oranları ve bulaş yolları göz önüne alınarak; dünya düşük, orta ve yüksek endemisite bölgelerine ayrılmıştır. Düşük endemisite özelliği gösteren Kuzey Amerika ve Batı Avrupa'daki persistan taşıyıcılar arasında genotip A baskındır. Bu bölgelerdeki başlıca bulaşma yolu perkütanöz ve cinsel temastır (2,38,141). Batı Amazon bölgesi gibi yüksek endemisite bölgelerinde baskın HBV genotipinin genotip F ve H olduğu belirtilmektedir. Bu bölgelerde enfeksiyonun en önemli geçiş yolu ise cinsel temastır (79,80). HBV bulaşında vertikal geçişin

ilk sırada olduğu Doğu Asya ülkelerinde genotip B ve C'nin prevalansı yüksektir. Bu durum kısmen vertikal geçişten sorumlu olan, HBeAg pozitifliği ile seyreden replikatif dönemin daha uzun oluğu ile açıklanmaktadır (2,82). Genotip A ve Genotip D'nin yaygın olarak görüldüğu Akdeniz ve Sahra altı Afrika ülkeleri orta derecede endemik olup, bulaşta horizontal geçiş daha önemlidir (2,38).

Özellikle ülkemizin de içinde bulunduğu Akdeniz bölgesinde, genotip D baskın olarak görülmektedir. Erken horizontal bulaş, enfeksiyonun yayılmasında en önemli geçiş yoludur (2,38). Elde ettiğimiz sonuçlara göre; içinde bulunduğumuz coğrafi bölge ile uyumlu olarak, çalışılan tüm HBV suşları genotip D ile uyumlu bulunmuştur.

HBV genotipleri, epidemiyolojik marker olarak kullanılmasının dışında, klinik uygulamaların daha bilinçli gerçekteşmesine yardımcı olması açısından da önemlidir. Çok sayıda çalışmada genotip C ile enfekte olan hastaların genotip B veya D ile enfekte olan hastalara göre daha sık ileri evre karaciğer hastalığı geliştirebileceğini göstermiştir. Yine genotip C ile enfekte hastalarda HBeAg serokonversiyon oranı genotip B ile enfekte olanlardan daha düşük ve genotip B veya C ile enfekte olan hastalarda anti-HBe antikor prevalansı, genotip D ile enfekte olanlardan daha düşük sıklıkta bulunmuştur (139). Kronik HBV enfeksiyonunun ve HBV'ye bağlı HCC'nin yaygın olarak bulunduğu Doğu Asya'da, genotip B ve C'nin baskın olarak gözlendiği, ciddi karaciğer hasarı ile seyrettikleri ve özellikle de genotip C'nin tedaviye yanıtının düşük olduğu saptanmıştır (5,142). Genotip C'nin ileri yaşlarda ciddi karaciğer hasarıyla siroz ve HCC'ya yol açtığı gözlenirken, genotip B'nin genç yaşta direkt HCC yaptığı saptanmıştır (5).

Farklı HBV genotipi olan hastalar arasında farklı klinik ve virolojik özellikler olabildiğinden kronik HBV enfeksiyonu olan hastalarda, HBV



genotiplerinin tanımlanması etyolojik, klinik ve virolojik araştırmalar için daha fazla bilginin kazanılmasına yardımcı olacaktır (143).

Türkiye’deki HBV genotiplerinin dağılımı ile ilgili çalışmalar yok denecek kadar azdır (Tablo-XII). Bozdayı ve ark. (144) 67 örnekte pre-S2 gen bölgesinin dizi analizini gerçekleştirmiş, Gen Bankasında daha önce yayınlanmış dizilerle karşılaştırarak tümünün genotip D, subtip ayw ile uyumlu olduğunu saptamışlardır. Mısırlıoğlu ve ark. (145) da 57 HBsAg pozitif çocuk hasta grubunda yaptıkları çalışmada, S gen bölgesi sekanslaması ile tüm HBV örneklerinin genotip D olduğunu ortaya koymuşlardır. Sunbul ve ark. (146) Türkiye’nin 15 farklı merkezindeki toplam 88 kronik hepatit B’li hasta ile yaptıkları çalışmada %85.9’unda genotip D’yi saptamışlardır. Onganer ve ark.’ları (147) akut ve kronik HBV enfeksiyonlu 50 hastanın S gen bölgesinin genotiplerini RFLP ile belirlemişlerdir. Çalışmalarında 42 hastada (%84) genotip D, 6 hastada (%12) genotip A ve 2 hastada (%4) genotip F olmak üzere 3 farklı genotip saptamışlardır. Çalışmada saptanan A ve F genotipleri Türk insanının Kuzey Avrupa (A) ve Güney Amerika (F) ile ilişkisine bağlanmıştır. Bizim çalışmamızda tüm HBV suşları genotip D ile uyumlu bulunmuştur. Farklı genotiplerin saptanamaması ise Afyon bölgesinin kapalı bir toplum olmasına bağlı olabilir.

**Tablo-XII.** Türkiye’de değişik merkezlerde yapılan HBV genotip tayini

Araştırıcı	Sayı	Genotip A	Genotip D	Genotip F	Genotip G	Subtip ayw
<b>Bozdayı ve ark.(144)</b>	67	-	%100	-	-	%100
<b>Mısırlıoğlu ve ark. (145)</b>	57	-	%100	-	-	-
<b>Sunbul ve ark. (146)</b>	88	-	%85.9	-	-	-
<b>Onganer ve ark.’ları (147)</b>	50	%12	%84	%4	-	-

Günümüzde kronik B hepatiti tedavisinde IFN dışında onaylanmış ve yaygın olarak kullanılan nükleozit analogu ilaçlar bulunmaktadır. Bu ilaçlardan en sık kullanılanı LAM'dir. LAM, HBV replikasyonunu baskılamakta etkili olmakla birlikte, uzun süreli kullanımlarında ilaca dirençli HBV suşları ortaya çıkmaktadır. LAM direnci, polimeraz geni C alt bölgesinde bulunan YMDD motifinde mutasyon oluşması ile ortaya çıkmaktadır (148). Dirence neden olan bu mutasyonlar metiyoninin valin veya izolösine dönüşmesi (rtM204I/V) şeklinde görülmektedir (149).

Lamivudin tedavisi sırasında ortaya çıkan bu mutasyonlar, genellikle tedavinin altıncı ayından sonra görülmeye başlar ve görülme sıklığı, tedavi süresi uzadıkça artar. Tedavinin birinci yılında mutasyon oranı %15 civarında iken, dördüncü yılda bu oran %67'ye yükselmektedir (7). LAM'e direnç gelişen hastalarda, önce virolojik, sonra fizyolojik parametrelerde bozulma görülmektedir (150,151) Bu hastalarda sırasıyla HBV DNA düzeyi yükselmekte, karaciğer fonksiyon testleri bozulmakta ve kompanse sirozu olanlarda dekompanse siroza ilerleme görülmektedir. Bu nedenle lamivudin tedavisi alan hastaların tedavi başarısı ve direnç gelişimi açısından izlenmesi, gerektiğinde ilaç değişikliği yapılması önerilmektedir (152).

HBV serotipi ya da genotipinin; LAM tedavi sonucuna, LAM'e direnç gelişimine (YMDD mutasyonu) ve YMDD mutantlarının ortaya çıkmasına eşlik eden hepatit alevlenmesine etkisinin olup olmadığı ile ilgili çok sayıda veri bulunmaktadır (143). Hong Kong'da yapılan 2 çalışmada HBV genotipinin LAM tedavi cevabına etkisinin olmadığı gösterilmiştir (153-155). Buna rağmen Chin ve ark.'ları (156) LAM'e sürekli cevap oranının genotip B'li hastalarda genotip C'li hastalara göre daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir. İspanya'da Buti ve ark.'ları (157) LAM tedavi sonucunun genotip A ve D için karşılaştırılabileceğini belirtmişlerdir. Bu sonuçlar HBV genotipinin LAM tedavi sonucu üzerinde sürekli bir etkisinin olmadığını göstermiştir.

Almanya’da Zöllner ve ark.’ları (158) serotip adw (Avrupa’da sadece genotip A) ve serotip ayw’li (Avrupa’da sadece genotip D) HBV enfekte hastalarda subtipllemeye bağımlı LAM direnç gelişimini araştırmışlardır. Sonuç olarak, LAM direnç gelişiminde HBV serotip adw’nin, ayw’ye göre 20 kat daha yüksek risk taşıdığını göstermişlerdir. Buna rağmen uzun süren klinik gözlem sonuçları, YMDD mutasyonunun ortaya çıkışının genotip A’lı hastalarda genotip D’lilerden hafifçe yüksek olduğunu ve bu farkın sadece tedavinin 1. yılında ortaya çıktığını göstermiştir. Aynı zamanda bu çalışma uzun süren LAM tedavisi sırasında (>5 yıl) direnç gelişiminin HBV genotipinden etkilenmediğini göstermiştir (158). Bu nedenle, HBV serotip veya genotipleri LAM’e direnç gelişiminde çok az bir rol oynamaktadır. Bizim çalışmamızda tüm HBV suşları genotip D ile uyumlu bulunduğundan, LAM’e direnç gelişiminin genotipten bağımsız olduğu düşünülmüştür.

ADV tedavisine antiviral cevabın HBV genotipi ile ilişkisinin araştırıldığı bir çalışmaya toplam 694 kronik hepatit B’li hasta dahil edilmiştir. Bu hastaların %23’ü genotip A’lı, %19’u genotip B’li, %30’u genotip C’li, %25’i genotip D’li ve %2’si genotip E, F ve G’li hastalardan oluşturulmuştur. 48 haftalık ADV tedavisi sonucunda tedavi sonucunun genotipten etkilenmediği bulunmuştur (159).

Yakın zamanda yapılan birçok çalışmada ADV tedavisi alan hastalarda, HBV genotipleri arasında HBeAg serokonversiyon oranı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığını göstermiştir (143). Bizim çalışmamızda da ADV direnci gelişen 2 hastanın genotipi de genotip D olduğundan, farklı genotipler ile ADV direnç gelişimi arasında bir ilişki olduğu düşünülmemiştir.

Hubert ve ark.’ları (160) Vietnam orijinli kronik HBV’li bir hastada LAM tedavisi sırasında polimeraz geninin katalitik bölgesinin C katlantısındaki YMDD motifinde yeni bir varyant saptamışlardır. YMDD motifindeki metionin (rtM204)

serine (rtS204) değişmiştir. Bu değişiklik 195. pozisyondaki tirozinin valine dönüşmesi ile sonuçlanmıştır. YSDD varyantının saptanması, HBV DNA seviyesinin yükselmesinden sonra gözlenmiştir. Bu mutasyonu 180. pozisyondaki lösinin metionine (rtL180M) değişimi takip etmiştir. YMDD motifinde daha önce tanımlanan 2 mutasyon rtM204I ve rtM204V'dir ve her ikisi de HBV replikasyonunda azalma ile sonuçlanmaktadır. LAM direncinden sorumlu major mutasyonun polimeraz geninin katalitik bölgesinin C katlantısında yer aldığı gösterilmiştir. İkinci bir mutasyon (rtL180M) polimeraz geninin katalitik bölgesinin B katlantısından kaynaklanmakta ve sıklıkla rtM204V veya rtM204I mutasyonları ile ilişkilidir. Bizim çalışmamızda da saptadığımız M204I+L180M mutasyonu LAM tedavisi sırasında saptanmış ve yukarıdaki verilerle uyumlu bulunmuştur.

Ülkemizde 2007 yılında Aygen ve ark.ları (161) 245'i kronik hepatit B ve 38'i inaktif HBsAg taşıyıcısı olmak üzere toplam 283 kronik hepatit B'li hastada, 17 merkezin katılımı ile LAM direncini araştırmışlardır. Hastalar kronik hepatit B tanısı ile herhangi bir tedavi alan ve almayanlardan seçilmiştir. Genotipleme ve LAM direnci araştırmaları Dizi analizi yöntemi ile yapılmıştır. Hastaların tamamında genotip D saptanmıştır. Bu hastaların 25'inde (%10.7) LAM direnci saptanmıştır. Bu 25 hastanın da 17'sinde (%42.5) sekonder direnç, 8'inde (%4.1) primer direnç saptanmıştır. LAM tedavisi almış hastalarda saptanmış YMDD mutasyonlarının antiviral tedavi almamış hastalarda da görülmesi oldukça çarpıcı bir sonuçtur. Bununla birlikte bu hastalarda bu değişikliklerin kesin sebebi tam olarak bilinmemektedir. Fakat muhtemel sebebin; bu mutantların doğal tip virüsle birlikte az miktarda bulunan ve ilaç kullanılmadan önce de zaten var olan virüsler olması yüksek bir ihtimaldir. Nitekim mutant tip virüs saptadığımız tüm hastalarda doğal tip virüs belirgin derecede baskın karakter göstermektedir. Ayrıca mutant virüslerin replikasyon yetenekleri doğal tipe nazaran yaklaşık 200 kat daha düşüktür (162). Dolayısıyla doğal tip virüs topluluğunun baskılanmadan mutant tipin baskın hale gelmesi mümkün görünmemektedir. Bizim çalışmamızda

da hastaların tamamı genotip D HBV ile enfekte bulunmuştur. Yine bu hastalardan LAM tedavisi hiç uygulanmayanlarda direnç oranı %12, halen LAM tedavisi almakta olanlarda ise bu oran %52.6 bulunmuştur. Bu sonuçlar bize primer direnç açısından, tedavi almamış hastalarda nükleozid tedavi öncesinde YMDD motif mutasyonlarının belirlenmesinin tedavi seçimine olumlu katkı sağlayacağını göstermektedir.

LAM ile karşılaştırılacak olunursa, ADV'ye karşı direnç gelişimi daha nadirdir ve tedavi sırasında daha geç dönemlerde ortaya çıkmaktadır. Bugüne kadar ADV direncine neden olan mutasyonlar rtN236T ve rtA181V olarak tanımlanmıştır. rtN236T mutasyonuna daha sık rastlanmaktadır ve polimeraz geninin katalitik bölgesinin D katlantısında 236. pozisyondaki asparajinin treonine değişimi sonucunda oluşmaktadır. rtA181V mutasyonu ise polimeraz geninin katalitik bölgesinin B katlantısında 181. pozisyondaki alaninin, valin veya treonine değişimi sonucunda oluşmaktadır. ADV direnci 1. ve 5. yılda sırasıyla %0 ve %28'dir (163). Bizim çalışmamızda da 1 hastada A181T+N236T mutasyonu birlikte saptanmıştır.

ADV'e karşı direnç mutasyonları, 48 haftadan uzun süre tedavi edilen hastalarda gözlenmiştir. LAM ve ADV kombinasyonu ile tedavi edilen hastaların; ADV'e direnç gelişimine neden olacak mutasyonları nadiren oluşturabileceği ve LAM direncine düşük olasılıkla sebep olabileceği bazı çalışmalarda gösterilmiştir (164). Bizim çalışmamızda da HBV-19 no'lu hastada LAM ve ADV kombinasyonu kullanılmış ve sadece ADV'e karşı direnç saptanmış, LAM'e karşı dirence rastlanmamıştır.

Tüm dünyada anti-HCV Ig M pozitif kişi sayısının 170 milyon, prevalansının ise %3 olduğu tahmin edilmektedir. Bunların da yaklaşık %75'inin kronik hastalığı olduğu düşünülmektedir (139). Bu yüzden HCV, kronik karaciğer hastalığının en önemli nedenlerinden biridir. Avrupa'daki akut hepatit vakalarının

%20'sinden, tüm kronik hepatit vakalarının %70'inden, karaciğer sirozunun %40'ından, HCC'nin %60'ından ve karaciğer transplantasyonunun %30'undan HCV sorumludur (165).

HCV'nin en az 6 genotipi, 100'den fazla alttipi ve türümsü yapıları bulunmaktadır (13). Ülkeler arasında HCV genotiplerinin frekansı değişmekle birlikte, 6 genotip dünyaya dağılmış durumdadır. Genotip 1b dünyadaki bütün izolatların %40-80 kadarını oluşturmaktadır. Genotip 1b dışında, genotip 2a ve 2b de dünyada geniş bir dağılım göstermekte, özellikle Japonya ve Kuzey İtalya'da yaygın olarak bulunmaktadır (116-118).

Genotip 1a ve 1b ABD'de en yaygın genotipler olup, bunu genotip 2 izlemektedir. Batı Avrupa ve Güneydoğu Asya'da genotip 1b en yaygın genotiptir. Genotip 2a ve 2b Amerika, Avrupa ve Japonya'da nispeten yaygın genotipler olmakla birlikte, 2c yaygın olarak Kuzey İtalya'da bulunmaktadır. Genotip 3a Avrupa ve Amerika'da IV ilaç bağımlılarında yaygındır. Genotip 3 çoğunlukla Hindistan, Pakistan, Avustralya ve İskoçya; genotip 4 Orta Doğu ve Afrika'da predominant; genotip 4a Mısır; genotip 5 Güney Afrika; genotip 6 Hong Kong, Vietnam, Tayland'da yaygın olan genotiplerdir. Güney Afrika'daki olguların %30-50'sinden genotip 5a, Hong Kong, Viyetnam ve Macau'daki olguların 1/3'ünden genotip 6a sorumludur (116-118). Asya kendi içinde ele alındığında; genotip 1b'nin Japonya, Güney Kore, Çin ve Tayvan'da; genotip 3'ün Miyanmar ve Nepal gibi güneydoğu Asya'nın bazı kısımlarında tanımlandığı görülmektedir (116).

Türkiye, major genotiplerin kendi aralarında farklılık gösterdiği Avrupa ve Orta doğu ülkeleri arasında yer almaktadır. Türkiye'de farklı gruplarla yapılan HCV genotipleme çalışmalarında genotip 1b predominant genotip olarak bulunmuştur. Türkiye'deki HCV genotip dağılımında bölgesel farklılıklar iyi dökümanite edilmemiştir. Türkiye'nin güneyindeki HCV genotiplerini rapor eden

bir çalışmada genotip 1b, hastaların %91'ini etkileyen predominant genotip olarak rapor edilmiştir (166). Bizim çalışmamızın sonuçları da benzer genotip dağılımını göstermektedir.

Çalışmamızda anti HCV Ig M ve HCV RNA'sı pozitif toplam 30 hastanın serum örneğinde genotipleme yapılmıştır. Genotipleme için HCV genomunun 5'NCR'sinin genotip belirleyici dizileri sekans yöntemi ile analiz edilmiştir. HCV RNA'sı pozitif toplam 30 hastadan 19'unda (%63.3) subtip 1b, 6'sında (%20) subtip 1a, 4'ünde (%13.3) subtip 4a, 1'inde (%3.3) subtip 1c bulunmuştur. Toplam 26 hastada (%86.6) genotip 1 baskın olan genotip olarak belirlenmiştir. Genotip 1'in baskın genotip olarak belirlenmesi, Türkiye geneliyle uyumlu olup ülkemizde ve bölgemizde genotip 1'in yaygın olduğunu göstermektedir. Çalışmamızın subtip değerlendirmesinde ise 19 hastada (%63.3) subtip 1b saptanmıştır. Bu sonuç da diğer çalışmalarla uyumlu olup subtip 1b'nin baskın tip olduğu görülmektedir.

Türkiye'de yapılan HCV genotipleme çalışmalarında HCV enfeksiyonlarının yaklaşık %90'ında genotip 1 bulunmuştur. Bunların da büyük çoğunluğunu genotip 1b oluşturmuş, genotip 2, 3 ve 4 HCV enfeksiyonlarına daha az sıklıkta rastlanmıştır (167). Bizim çalışmamızda da hastaların büyük çoğunluğunu genotip 1b oluşturmuş, genotip 1a, 1c ve 4a daha az sıklıkta saptanmıştır.

Bölgemizde 2006 yılında Altındış ve ark'ları (168) tarafından sekanslama yöntemi ile yapılan önceki bir çalışmada da predominant olarak genotip 1b (%96.7) bulunmuş, bunu genotip 1a (%3.3) izlemiştir. Aynı çalışmada genotipleme, Line prob yöntemi ile de çalışılmış ve genotip 1b (%93) predominant olmak üzere sırasıyla genotip 1a (%3.3) ve mix tip (%3.3) bulunmuştur. Bu sonuç da bizim çalışmamızla uyumlu olup genotip 1b predominant genotip olarak bulunmuştur.

Altındış ve ark.'ları (169) yaptıkları diğer bir çalışmada HCV RNA'sı pozitif 35 Türk askerinden 34'ünde (%97.2) genotip 1b, 1'inde (%2.8) genotip 1a saptamışlardır. Aynı çalışmada 5 Kuzey Kıbrıs askerinden 4'ünde (%80) genotip 1b, 1'inde (%20) genotip 1a saptanmıştır. Çalışmada sivil HCV enfeksiyonlarında da genotip araştırılmış, 13 sivil hastanın 11'inde (%84.6) genotip 1b, 1'inde (%7.7) genotip 1a ve 1 hastada da (%7.7) genotip 2 saptanmıştır.

Erensoy ve ark.'larının (170) Türkiye'nin batı bölgesinde yaptıkları bir çalışmada kronik HCV enfeksiyonlu 345 hastanın 335'inde (%97.1) genotip 1 saptanmıştır. Bu 335 hastanın ise 34'ünde (%9.9) subtip 1a, 301'inde (%87.2) subtip 1b saptanmıştır. 5 hastada (%1.4) genotip 3a; 3 hastada (%0.9) genotip 2a; 2 hastada (%0.6) genotip 4 saptanmıştır. Genotip 5 ve 6'ya rastlanmamıştır.

Yalçın ve ark. (166) Diyarbakır bölgesinde yaptıkları çalışmada 50 kronik HCV enfeksiyonlu hastanın 28'inde HCV RNA'yı pozitif saptamışlar, bu 28 hastanın tümünü (%100) genotip 1b olarak rapor etmişlerdir.

Yıldız ve ark. (167) Türkiye'nin güney bölgelerinde yaşayan kronik HCV hastalarında yaptıkları çalışmada 79 HCV RNA pozitif örneğin 72'sinde (%91) genotip 1b, 5 hastada (%6) genotip 1a saptamışlardır. Diğer iki hastadan biri genotip 2a, diğeri genotip 4c olarak bulunmuştur.

Selçuk ve ark. (171) HCV RNA'sı pozitif olan toplam 130 diyaliz hastasında yaptıkları çalışmada 121 hastada (%93.19) genotip 1 bulmuşlardır. Subtip dağılımlarına göre 89 hastada (%68.5) genotip 1b, 32'sinde (%24.6) genotip 1a, 9 hastada (%7) ise genotip 4 bulmuşlardır.

Bozdayı ve ark. (172) Ankara bölgesindeki 94 hemodiyaliz hastasında HCV enfeksiyonunu araştırmışlardır. Bu hastalardan 36'sında HCV RNA pozitif olup, 28'i (%77.7) genotip 1b, 8'i (%22.3) genotip 1a olarak saptanmıştır.



Gökahmetoğlu ve ark.'larının (173) Kayseri bölgesindeki HCV genotip dağılımlarını araştırdıkları bir çalışmaya toplam 57 kronik hepatit C'li hasta dahil edilmiştir. HCV RNA düzeyi Real Time PCR ile araştırılmış ve HCV genotipleri RFLP ile belirlenmiştir. Buna göre HCV genotiplerinin 55'i (%96.5) genotip 1b, 2'si (%3.5) genotip 1a olarak bulunmuştur.

Abacıoğlu ve ark. (174) İzmir bölgesinde yaptıkları çalışmada 89 HCV enfeksiyonlu hastada genotip araştırmışlar; 57 hastada (%94.4) genotip 1 saptamışlar, bu hastaların da %75.3'önünde genotip 1b, %19.1'inde genotip 1a'yı saptamışlardır. Geriye kalan 32 hastanın %3.4'ünde genotip 2a, %2.2'sinde genotip 4 saptamışlardır.

Savaş ve ark.'larının (175) Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji kliniğinde kronik HCV enfeksiyonu tanısı almış 70 hastada yaptıkları genotipleme çalışmasında 54'ünde (%77.1) genotip 1b saptamışlardır.

il ve ark.'ları (176) Güneydoğu Anadolu bölgesinde 22 HCV RNA'sı pozitif hastada yaptıkları çalışmada, genotip 1a, 1b ve 3a olmak üzere 3 farklı HCV genotipi saptamışlardır. Beş hastada (%22.7) genotip 1a, 16 hastada (%72.8) genotip 1b ve 1 hastada (%4.5) genotip 3a tespit etmişlerdir.

şahin ve ark.'larının (177) Malatya'da yaşayan 1295 kişide HCV antikorlarının ve genotiplerinin dağılımlarını araştırdıkları bir çalışmada, genotipleme Line probe yöntemi ile yapılmış ve predominant genotip olarak genotip 1b (%93.1) saptanmıştır. Ayrıca 2 hastada (%3.5) genotip 1a ve 1 hastada (%1.72) genotip 1b/3a ve 1 hastada (%1.72) genotip 1b/4a saptanmıştır.

Ülkemizde bu konuda yapılan diğer çalışmalarda da benzer sonuçlar bulunmuştur. Örneğin; Akkız ve arkadaşlarının (178) yaptığı çalışmada, genotip 1b %98, genotip 1a ise %2, Uzunlimaloğlu ve arkadaşlarının (179) yaptığı

Çalışmada, genotip 1b %87, genotip 2b %8, genotip 1a %5 olarak bulunmuştur. Ayrıca Sönmez ve ark.'larının (180) Türk hastalardaki HCV genotiplerini araştırdıkları bir çalışmada, genotip 1b'yi %69.5 oranında tespit etmişlerdir. Tuncer ve ark.'ları (181) yaptıkları bir çalışmada hastalar arasında en yaygın genotipin genotip 1b (%72) olduğunu rapor etmişlerdir. Kılıç ve ark.'ları (182) ise yaptıkları çalışmada hemodiyaliz hastalarının %88'inde genotip 1b'yi saptamışlardır. Türkiye'de değişik merkezlerde yapılan HCV genotipleme sonuçları Tablo-XIII'de özetlenmiştir.

**Tablo-XIII.** Türkiye’de değişik merkezlerde yapılan HCV genotip tayini

Araştırıcı	Genotip 1a	Genotip 1b	Genotip 2a	Genotip 2b	Genotip 3a	Genotip 4	Belirlenemeyen
Altındiş ve ark.(168)	%3.3	%96.7	-	-	-	-	-
Erensoy ve ark.(170)	%9.9	%87.2	%0.9	-	%1.4	%0.6	-
Yalçın ve ark.(166)	-	%100	-	-	-	-	-
Yıldız ve ark.(167)	%6	%91	%1.3	-	-	%1.3	-
Selçuk ve ark.(171)	%24.6	%68.5	-	-	-	%7	-
Bozdayı ve ark.(172)	%22.3	%77.7	-	-	-	-	-
Gökahmetoğlu ve ark. (173)	%3.5	%96.5	-	-	-	-	-
Abacıoğlu ve ark.(174)	%19.1	%75.3	%3.4	-	-	%2.2	-
Savaş ve ark.(175)	-	%77.1	-	-	-	-	%22.9
Çil ve ark.(176)	%22.7	%72.8	-	-	%4.5	-	-
şahin ve ark.(177)	%3.5	%93.1	-	-	%1.7	%1.7	-
Akkız ve ark.(178)	%2	%98	-	-	-	-	-
Uzunalimoğlu ve ark.(179)	%5	%87	-	%8	-	-	-
Sönmez ve ark.(180)	-	%69.5	-	-	-	-	%30.5
Tuncer ve ark.(181)	-	%72	-	-	-	-	%28
Kılıç ve ark.(182)	-	%88	-	-	-	-	%12

Bu konuda çalışmamızın sonuçları Türkiye geneliyle uyum göstermektedir. Ülkemizdeki bu prevalans ABD ile uyumlu iken, Japonya, Avrupa ve Orta Doğu ülkeleri ile farklılık göstermektedir (183-185).

Sonuç olarak çalışmamızda; ülkemizin içinde bulunduğu coğrafi bölge ile uyumlu olarak, HBV DNA'sı pozitif kronik karaciğer hastalarının tamamı genotip D HBV ile enfekte bulunmuştur. Aynı hastalarda yapılan mutasyonel analiz ve ilaç direnci araştırmalarında, ADV direnci ve LAM'e primer ve sekonder direnç saptanmıştır. Bu sonuçlar bize primer direnç açısından, tedavi almamış hastalarda nükleozid tedavi öncesinde YMDD motif mutasyonlarının belirlenmesinin tedavi seçimine olumlu katkı sağlayacağını düşündürmektedir. Yine çalışmamızda HCV RNA'sı pozitif kronik karaciğer hastalarının büyük bir çoğunluğunda genotip 1 predominant olarak saptanmıştır. Bu sonuç yurdumuzun diğer yörelerindeki sonuçlarla uyumlu bulunmuştur. Çalışmamızda elde edilen HCV genotipleme sonuçları, kronik hepatit C'de tedavi rejimlerinin etkinliğinin virüs genotipinden etkilenmesi nedeniyle, bölgemiz için HCV'ye bağlı kronik karaciğer hastalığının takip ve tedavisinde yol gösterici olacağını düşündürmektedir. Bu çalışma, bu konuda bölgemizde ilk olduğu için önemli görünmektedir.

## VI-SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar ve önerileri, maddeler halinde aşağıdaki şekilde özetlemek mümkündür.

1. Çalışmaya dahil ettiğimiz 44 HBV enfeksiyonlu (25'i lamivudin tedavisi hiç almamış) hastada dizi analizi yöntemi ile yaptığımız genotipleme sonucunda hastaların tamamı genotip D ile enfekte bulunmuştur.

2. Aynı dizilerde yapılan mutasyonel analiz ve ilaç direnci araştırmalarında ise;6 hastada (%13.6) M204I mutasyonu (LAM direnci), 2 hastada (%4.5) Q215S mutasyonu (LAM direnci), birer hastada (%2.3) V214A mutasyonu (ADV direnci), L80I+M204I mutasyonu (LAM direnci), A181T+N236T mutasyonu (ADV direnci), V84M+V173L mutasyonu (ADV ve LAM direnci), L80V+M204I mutasyonu (LAM direnci), Q215S+M204I mutasyonu (LAM direnci), ve M204I+L180M mutasyonu (LAM direnci) saptanmıştır. Geri kalan 29 hastada (%65.9) ise mutasyon ya da ilaç direncine rastlanmamıştır.

3. Bu mutasyonlardan 3 tanesi (1 adet Q215S mutasyonu (LAM direnci) ve 2 adet M204I mutasyonu (LAM direnci)) LAM tedavisi hiç almamış hastalarda saptanmıştır. Yine bu hastalardan LAM tedavisi hiç almamışlarda direnç oranı %12, halen LAM tedavisi almakta olanlarda ise bu oran %52.6 bulunmuştur. LAM tedavisi almakta olan hastalarda saptanmış YMDD mutasyonlarının, antiviral tedavi almamış hastalarda da görülmesi oldukça çarpıcı bir sonuçtur. Bu sonuçlar bize primer direnç açısından, tedavi almamış hastalarda nükleozid tedavi öncesinde YMDD motif mutasyonlarının belirlenmesinin tedavi seçimine olumlu katkı sağlayacağını düşündürmektedir.

4. Kronik HBV enfeksiyonunda, tedavi başarısını izlemek ve başarısızlık halinde alternatif ilaçlarla tedaviye devam edebilmek için LAM'e karşı direnç gelişiminin saptanmasının önemli olduğu düşünülmüştür.

5. Çalışmaya dahil ettiğimiz 30 HCV enfeksiyonlu hastada ise dizi analizi yöntemi ile yaptığımız genotipleme sonucunda 19'unda (%63.3) subtip 1b, 6'sında (%20) subtip 1a, 4'ünde (%13.3) subtip 4a, 1'inde (%3.3) subtip 1c bulunmuştur. Toplam 26 hastada (%86.6) genotip 1 baskın olan genotip olarak belirlenmiştir.

6. Kronik HCV enfeksiyonunda, HCV genotipleri arasında tedaviye yanıt açısından farklılıklar bulunmaktadır. Bu nedenle tedavi öncesi genotipleme yapılmasının uygun bir yaklaşım olduğu düşünülmüştür.

## VII-ÖZET

Bu çalışma, Eylül 2007-Mart 2008 tarihleri arasında, Afyon Kocatepe Üniversitesi Hastanesi polikliniklerine ve Kan Merkezine başvuran ya da rutin taramalarda hepatit saptanan bireylerden, toplam 74 hastada yapılmıştır. Bunların 44'ü HBV (25'i LAM tedavisi hiç almamış) 30'u ise HCV'li hastalardan seçilmiştir.

HBV DNA açısından pozitif bulunan 44 serum örneğinde genotipleme, mutasyonel analiz ve antiviral ilaç direnci araştırmaları yapılmıştır. Hepatit B'de DNA Polimeraz geninin 80-260. kodonları arasındaki bölge PCR ile çoğaltılarak dizi analizi yapılmıştır. Hastaların tamamı genotip D olarak belirlenmiştir. Aynı dizilerde yapılan mutasyonel analiz ve ilaç direnci araştırmalarında ise;6 hastada (%13.6) M204I mutasyonu (LAM direnci), 2 hastada (%4.5) Q215S mutasyonu (LAM direnci), birer hastada (%2.3) V214A mutasyonu (ADV direnci), L80I+M204I mutasyonu (LAM direnci), A181T+N236T mutasyonu (ADV direnci), V84M+V173L mutasyonu (ADV ve LAM direnci), L80V+M204I mutasyonu (LAM direnci), Q215S+M204I mutasyonu (LAM direnci), ve M204I+L180M mutasyonu (LAM direnci) saptanmıştır. Geri kalan 29 hastada (%65.9) ise mutasyon ya da ilaç direnci saptanmamıştır.

HCV RNA açısından pozitif bulunan 30 serum örneğinde ise dizi analizi yöntemi ile genotipleme yapılmıştır (ABI 310, AB). Genotipleme için HCV genomunun 5'NCR bölgesindeki genotip belirleyici dizileri analiz edilmiştir. HCV RNA'sı pozitif toplam 30 hastanın 19'unda (%63.3) subtip 1b, 6'sında (%20) subtip 1a, 4'ünde (%13.3) subtip 4a, 1'inde (%3.3) subtip 1c bulunmuştur. Toplam 26 hastada (%86.6) genotip 1 baskın olan genotip olarak belirlenmiştir.

Sonuçta, HCV'li hastaların çoğunluğunda genotip 1b, HBV'li hastaların da tamamında genotip D saptanmış olup; belirlenen genotip, antiviral ilaç dirençleri ve mutasyonların, bölgemizdeki kronik hepatitli hastaların takip ve tedavisinde yol gösterici olacağı düşünülmektedir.

## VIII-SUMMARY

This study was performed between September 2007-March 2008 on 74 patients who admitted to Afyon Kocatepe University Hospital polyclinics and Blood Bank or individuals who were detected hepatitis during screening. These were chosen from 44 HBV infected (25 of them never treated with LAM), 30 HCV infected patients.

The genotyping, mutational analysis and antiviral drug resistance examinations were performed on 44 serum samples with positive HBV DNA. The region between 80-260 codons in HBV DNA polymerase gene at Hepatitis B, was amplified by PCR and then sequence analysis was performed. It was determined that all the patients were belonging to genotype D. The mutational analysis and antiviral drug resistance tests which were done at the same sequences; 6 patient (13.6%) M204I mutation (LAM resistance), 2 patient (4.5%) Q215S mutation (LAM resistance), in one each patient (2.3%) V214A mutation (ADV resistance), L80I+M204I mutation (LAM resistance), A181T+N236T mutation (ADV resistance), V84M+V173L mutation (ADV and LAM resistance), L80V+M204I mutation (LAM resistance), Q215S+M204I mutation (LAM resistance), and M204I+L180M mutation (LAM resistance) were detected. The mutational analysis and antiviral drug resistance was not showed in the rest of 29(65.9%) patients.

The genotyping (ABI 310, AB) was performed by sequencing analysis on 30 serum samples with positive HCV RNA. The sequences which determined genotype in 5'NCR region of HCV genome were analysed for genotyping. It was found on 19 patients (63.3%) subtype 1b, 6 patients (20%) subtype 1a, 4 patients (13.3%) subtype 4a and 1 patient (3.3%) subtype 1c of 30 patients, who was HCV RNA positive. Genotype 1 was determined predominantly in total of 26 (86.6%) patients.



In conclusion, genotype 1b was detected in most of the HCV patients, genotype D was detected in all of HBV patients. It is considered that, detected genotype, antiviral drug resistance and mutations will guide us for clinical management and treatment of chronic hepatitis patients.

## IX-KAYNAKLAR

1. Yenen OŞ. Akut viral hepatitler. In: Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M, eds. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. 2.baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2002:820-835.
2. Taşyaran MA. HBV infeksiyonu epidemiyolojisi. In: Tekeli E, Balık İ, eds. Viral Hepatit 2003. 1.baskı, İstanbul: Deniz Ofset, 2003:121-128.
3. Mıstık R, Balık İ. Türkiye’de viral hepatitlerin epidemiyolojik analizi. In: Kılıçturgay K, Badur S, eds. Viral Hepatit 2001. 1.baskı, İstanbul: Deniz Ofset, 2001:10-55.
4. Kurt H. Hepatit B virüs infeksiyonu. In: Tekeli E, Balık İ, eds. Viral Hepatit 2003. 1.baskı, İstanbul: Deniz Ofset, 2003:129-135.
5. Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. Gastroenterol 2000;118:554-559.
6. Lindh M, Hannoun C, Dhillon AP, Norkrans G, Horal P. Core promoter mutations and genotypes in relation to viral replication and liver damage in East Asian hepatitis B virus carriers. J. Infect Dis 1999;179:775-782.
7. Leung NW, Lai CL, Chang TT. Extended lamivudine treatment in patients with chronic hepatitis B enhances hepatitis B e antigen seroconversion rates: results after 3 years of therapy. Hepatology 2001;33:1527-1532.
8. Zoulim F. Detection of hepatitis B virus resistance to antivirals. J Clin Virol 2001;21:243-253.
9. Whalley SA, Brown D, Teo CG. Monitoring the emergence of hepatitis B virus polymerase gene variants during lamivudine therapy using the Lightcycler. J Clin Microbiol 2001;39:1456-1459.

10. Akkız H. Epidemiyoloji ve korunma. In: Tekeli E, Balık İ, eds. Viral Hepatit 2003. 1.baskı, İstanbul: Deniz Ofset, 2003:199-221.
11. Ökten A. Hepatit C virüsü enfeksiyonu-Genel bakış. In: Tekeli E, Balık İ, eds. Viral Hepatit 2003. 1.baskı, İstanbul: Deniz Ofset, 2003:184-185.
12. Sünbül M. HCV enfeksiyonunun epidemiyolojisi ve korunma. In: Tabak F, Tekeli E, Balık İ, eds. Viral Hepatit 2007. 1.baskı, İstanbul: Deniz Ofset, 2007:208-219.
13. Richter SS. Laboratory assays for diagnosis and management of hepatitis C virus infection. J Clin Microbiol 2002;40:4407-4412.
14. Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deleage G, Enomoto N, Feinstone S, Halfon P, Inchauspe G, Kuiken C, Maertens G, Mizokami M, Murphy DG, Okamoto H, Pawlotsky JM, Penin F, Sablon E, Shin-I T, Stuyver LJ, Thiel HJ, Viazov S, Weiner AJ, Widell A. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. Hepatology 2005; 42: 962-973.
15. Mahoney FJ. Update on diagnosis, management and prevention of hepatitis B virus infection. Clin Microbiol 1999;12:351-366.
16. Kıyan M. Hepatit B virüsü. In: Tekeli E, Balık İ, eds. Viral Hepatit 2003. 1.baskı, İstanbul: Deniz Ofset, 2003:86-120.
17. Ustaçelebi Ş, Ergünay K. HBV'nin moleküler virolojisi. In: Tabak F, Tekeli E, Balık İ, eds. Viral Hepatit 2007. 1.baskı, İstanbul: Deniz Ofset, 2007:96-107.
18. Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology. Microbiol Mol Bio 2000;64:51-68.
19. Bilgiç A, Özacar T. Hepatit B virüsü. In: Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M, eds. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. 2.baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2002:1350-1370.

20. Kidd-Ljunggren K, Miyakawa Y, Kidd AH. Genetic variability in hepatitis B viruses. *J Gen Virol* 2002;83:1267-1280.
21. Chen YJ, Zhou YL, Xia J, Xia WW. Evaluation and clinical significance of HBV large protein (LHBs) in diagnosis of hepatitis B. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi* 2007;21:241-243.
22. Huang TJ, Lu CC, Tsai JC, Yao WJ, Lu X, Lai MD, Liu HS, Shiao AL. Novel autoregulatory function of hepatitis B virus M protein on surface gene expression. *J Biol Chem* 2005;280:27742-27754.
23. Locarnini S, McMillan J, Bartholomeusz A. The hepatitis B virus and common mutants. *Semin Liver Dis* 2003;23:5-20.
24. Wang G-H, Seeger C. The reverse transcriptase of hepatitis B virus acts as a protein primer for viral DNA synthesis. *Cell* 1992;71:663-670.
25. Andrisani OM, Barnabas S. The transcriptional function of the hepatitis B virus X protein and its role in hepatocarcinogenesis. *Int J Oncol* 1999;15:373-379.
26. Cooper A, Paran N, Shaul Y. The earliest steps in hepatitis B virus infection. *Biochem Biophys Acta* 2003;1614:89-96.
27. Neurath AR, Kent SB, Strick N, Parker K. Identification and chemical synthesis of a host cell receptor binding site on hepatitis B virus. *Cell* 1986;46:429-436.
28. Hartmann-Stuhler C, Prange R. Hepatitis B virus large envelope protein interacts with gamma2-adaptin, a clathrin adaptor-related protein. *J Virol* 2001;75:5343-5351.
29. Kann M, Bischof A, Gerlich WH. In vitro model for the nuclear transport of the hepadnavirus genome. *J Virol* 1997;71:1310-1316.

30. Locarnini S. Molecular virology of Hepatitis B Virus. *Semin Liver Dis* 2004;24:3-10.
31. Norder H, Courouce AM, Magnius LO. Molecular basis of hepatitis B virus serotype variations within the four major subtypes. *J Gen Virol* 1992;73:3141–3145.
32. Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol* 1988;69:2575–2583.
33. Norder H, Hammas B, Lofdahl S, Courouce AM, Magnius LO. Comparison of the amino acid sequences of nine different serotypes of hepatitis B surface antigen and genomic classification of the corresponding hepatitis B virus strains. *J Gen Virol* 1992;73:1201–1208.
34. Norder H, Courouce AM, Magnius LO. Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. *Virology* 1994;198:489–503.
35. Stuyver L, De Gendt S, Van Geyt C. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol* 2000;81:67–74.
36. Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH, Magnius LO. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol* 2002;83:2059–2073.
37. Kıyan M: Hepatit B virusu. In: Kılıçturgay K, Badur S, eds. *Viral Hepatit* 2001. 1.baskı, İstanbul: Deniz Ofset, 2001:88-120.
38. Schaefer S. Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. *World J Gastroenterol* 2007;13:14-21.

39. Bozdayi G, Türkyılmaz AR, Idilman R. Complete genom sequence and phylogenetic analysis of hepatitis B virus isolated from Turkish patients with chronic HBV infection. *J Med Virol* 2005;76:476-481.
40. Sheldon J, Rodes B, Zoulim F, Bartholomeusz A, Soriano V. Mutations affecting the replication capacity of hepatitis B virus. *J Viral Hepat* 2006;13:427-434.
41. Fares MA, E.C. Holmes EC. A revised evolutionary history of hepatitis B virus (HBV). *J Mol Evol* 2002;54:807–814.
42. Hannoun C, Horal P, Lindh M. Long-term mutation rates in the hepatitis B virus genome. *J Gen Virol* 2000;81:75–83.
43. Yang Z, Lauder IJ, Lin HJ. Molecular evolution of the hepatitis B virus genome. *J Mol Evol* 1995;41:587–596.
44. Carman WF, Zanetti AR, Karayiannis P. Vaccine induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet* 1990;336:325–329.
45. Carman WF, Trautwein C, van Deursen FJ. Hepatitis B virus envelope variation after transplantation with and without hepatitis B immune globulin prophylaxis. *Hepatology*, 1996;24:489–493.
46. Zanetti AR, Tanzi E, Manzillo G. Hepatitis B variants in Europe. *Lancet*, 1988;1132-1133.
47. Lok AS, Akarca U, Greene S. Mutations in the pre-core region of hepatitis B virus serve to enhance the stability of the secondary structure of the pre-genome encapsidation signal. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994;91:4077–4081.
48. Hunt CM, McGill JM, Allen MI. Clinical relevance of hepatitis B viral mutations. *Hepatology* 2000;31:1037–1044.

49. Lai CL, Dienstag J, Schiff E, Leung NW, Atkins M, Hunt C. Prevalence and clinical correlates of YMDD variants during lamivudine therapy for patients with chronic hepatitis B. *Clin Infect Dis* 2003;36:687–696.
50. Tenney DJ, Levine SM, Rose RE. Clinical emergence of entecavir-resistant hepatitis B virus requires additional substitutions in virus already resistant to Lamivudine. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:3498–3507.
51. Uchida T, Saitoh T, Shinzawa H. Mutations of the X region of hepatitis B virus and their clinical implications. *Pathol Int* 1997;47:183-193.
52. Guidotti LG, Rochford R, Chung J. Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection. *Science* 1999;284:825–829.
53. Penna A, Del Prete G, Cavalli A. Predominant T-helper 1 cytokine profile of hepatitis B virus nucleocapsid-specific T cells in acute self-limited hepatitis B. *Hepatology* 1997;25:1022–1027.
54. Webster GJ, Reignat S, Maini MK. Incubation phase of acute hepatitis B in man: dynamic of cellular immune mechanisms. *Hepatology* 2000;32:1117–1124.
55. Ferrari C, Penna A, Giuberti T. Intrahepatic, nucleocapsid antigen-specific T cells in chronic active hepatitis B. *J Immunol* 1987;139:2050–2058.
56. Lohr HF, Gerken G, Schlicht HJ, Meryer zum Buschenfelde KH, Fleischer B. Low frequency of cytotoxic liver-infiltrating T lymphocytes specific for endogenous processed surface and core proteins in chronic hepatitis B. *J Infect Dis* 1993;168: 1133–1139.
57. Jung M, Pape G. Immunology of hepatitis B infection. *Lancet Infect Dis* 2002;2:43–50.
58. Gitlin N. Hepatitis B: diagnosis, prevention and treatment. *Clin Chem* 1997;43:1500-1506.

59. Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection-natural history and clinical consequences. *N Engl J Med* 2004;350:1118-1129.
60. Liang TJ, Hasegawa K, Rimon N, Wands JR, Ben-Porath E. A hepatitis B virus mutant associated with an epidemic of fulminant hepatitis. *N Engl J Med* 1991;324:1705-1709.
61. Aye TT, Uchida T, Becker SO. Variations of hepatitis B virus precore/core gene sequence in acute and fulminant hepatitis B. *Dig Dis Sci* 1994;39:1281-1287.
62. Sterneck M, Kalinina T, Gunther S. Functional analysis of HBV genomes from patients with fulminant hepatitis. *Hepatology* 1998;28:1390-1397.
63. Chwla Y. Hepatitis B virus: inactive carriers. *Virol J* 2005;28:82.
64. Leblebicioğlu H. Hepatit B virüsü mikrobiyolojisi, patogenez, epidemiyoloji, klinik, tedavi ve korunma. In: Usluer G, eds. *A'dan Z'ye Akut Viral Hepatitler*. Ankara:Güneş Kitabevi Yayınları, 2002:16-23.
65. Wolk DM, Jones MF, Rosenblatt JE. Laboratory diagnosis of viral hepatitis. *Infect Dis Clin North Am* 2001;15:1109-1126.
66. Hadzakis A, Magiorkinis E, Haida C. HBV virological assesment, *J Hepatol* 2006;44:71-76.
67. Niesters HG. Clinical virology in real time. *J Clin Virol* 2002;25:3-12.
68. Lok AS, Heathcote EJ, Hoofnagle Jh. Management of hepatitis B: 2000. Summary of a workshop. *Gastroenterology* 2001;120:1828-1853.
69. Conjeevaram HS, Lok AS. Management of chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2003;38:90-103.



70. Delaney WE, Yang H, Miller MD. Combinations of adefovir with nucleoside analogs produce additive antiviral effects against hepatitis B virus in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother* 2004;48:3702-3710.
71. Balık İ. Kronik Hepatit B'nin seyri ve interferon tedavisi. In: Tekeli E, Balık İ, eds. *Viral Hepatit 2003*. 1.baskı, İstanbul: Deniz Ofset, 2003:135-155.
72. Craxi A, Di Bona D, Camma C. Interferon-alpha for HBeAg-positive chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2003;39:99-105.
73. Cooksley WG, Piratvisuth T, Lee SD, Mahachai V, Chao YC, Tanwandee T, Chutaputti A, Chang WY, Zahm FE, Pluck N. Peginterferon alpha-2a (40 kDa): an advance in the treatment of hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 2003;10:298-305.
74. Janssen HL, van Zonneveld M, Senturk H, Zeuzem S, Akarca US, Cakaloglu Y, Simon C, So TM, Gerken G, de Man RA, Niesters HG, Zondervan P, Hansen B, Schalm SW; HBV 99-01 Study Group; Rotterdam Foundation for Liver Research. Pegylated interferon alfa-2b alone or in combination with lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B: a randomised trial. *Lancet* 2005;365:123-129.
75. Lok AS, Lai CL, Leung N, Yao GB, Cui ZY, Schiff ER, Dienstag JL, Heathcote EJ, Little NR, Griffiths DA, Gardner SD, Castiglia M. Long-term safety of lamivudine treatment in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2003;125:1714-1722.
76. Marcellin P, Lau GK, Bonino F, Farci P, Hadziyannis S, Jin R, Lu ZM, Piratvisuth T, Germanidis G, Yurdaydin C, Diago M, Gurel S, Lai MY, Button P, Pluck N; Peginterferon Alfa-2a HBeAg-Negative Chronic Hepatitis B Study Group. Peginterferon alfa-2a alone, lamivudine alone, and the two in combination in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2004;351:1206-1217.

77. Angus P, Vaughan R, Xiong S, Yang H, Delaney W, Gibbs C, Brosgart C, Colledge D, Edwards R, Ayres A, Bartholomeusz A, Locarnini S. Resistance to adefovir dipivoxil therapy associated with the selection of a novel mutation in the HBV polymerase. *Gastroenterology* 2003;125:292-297.
78. Lavanchy D. Worldwide epidemiology of HBV infection, disease burden and vaccine prevention. *J Clin Virol* 2005;34:1-3.
79. Paraná R, Almeida D. HBV epidemiology in Latin America. *J Clin Virol* 2005;34:130-133.
80. Campos RH, Mbayed VA, Pineiro Y, Leone FG. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Latin America. *J Clin Virol* 2005;34:8-13.
81. Abe K, Hayakawa E, Sminov AV. Molecular epidemiology of hepatitis B, C, D and E viruses among children in Moscow, Russia. *J Clin Virol* 2004;30:57-61.
82. Yuen MF, Sablon E, Tanaka Y. Epidemiological study of hepatitis B virus genotypes, core promoter and precore mutations of chronic hepatitis B infection in Hong Kong. *J Hepatol* 2004;41:119-125.
83. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV. Transfusion associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med* 1975; 292:767-770.
84. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989;244:359-362.
85. Alter HJ, Purcell RH, Shih JW, Melpolder JC, Houghton M, Choo QL, et al. Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* 1989;321:1494-1500.

86. Alter HJ, Houghton M. Hepatitis C virus and eliminating post-transfusion hepatitis. *Nat Med* 2000;6:1080-1086.
87. Ramadori G, Meier V. Hepatitis C virus infection: 10 years after the discovery of the virus. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001;13:465-471.
88. Thiel HJ, Collett MS, Gould EA, Heinz FX, Houghton M, Meyers G. Flaviviridae. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA, eds. *Virus Taxonomy, VIIIth Report of the ICTV*. 2005:979-996.
89. Türkoğlu S. Hepatit C virusu ve seroloji. In: Tekeli E, Balık İ, eds. *Viral Hepatit 2007*. 1.baskı, İstanbul: Deniz Ofset, 2007:228-245.
90. Chevaliez S, Pawlotsky JM. Hepatitis C virus: virology, diagnosis and management of antiviral therapy. *World J Gastroenterol* 2007;13:2461-2466.
91. Tsukiyama-Kohara K, Iizuka N, Kohara M&Nomoto A. Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *Journal of Virology* 1992;66:1476-1483.
92. Moriya K, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Tsutsumi T, Ishibashi K, Matsuura Y, Kimura S, Miyamura T&Koike K. The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nature Medicine* 1998;4:1065-1067.
93. Hope RG, Murphy DJ and McLauchlan J. The domains required to direct core proteins of hepatitis C virus and GB virus-B to lipid droplets share common features with plant oleosin proteins. *J Biol Chem* 2002;277:4261-4270.
94. Bowen DG, Walker CM. The origin of quasispecies: cause or consequence of chronic hepatitis C viral infection. *J Hepatol* 2005;42:408-417.
95. Branch AD, Stump DD, Gutierrez JA, Eng F and Walewski JL. The hepatitis C virus alternate reading frame (ARF) and its family of novel products: the alternate reading frame protein/F-protein, the double-frameshift protein, and others. *Semin Liver Dis* 2005;25:105-117.

96. Griffin SD, Beales LP, Clarke DS, Worsfold O, Evans SD. The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett* 2003;535:34-38.
97. Pavlovic D, Neville DC, Argaud O, Blumberg B, Dwek RA. The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:6104-6108.
98. Harada T, Tautz N and Thiel HJ. E2-p7 region of the bovine viral diarrhea virus polyprotein: processing and functional studies. *J Virol* 2000;74:9498-9506.
99. Suzich J A, Tamura J K, Palmer-Hill F. Hepatitis C virus NS3 protein polynucleotide-stimulated nucleoside triphosphatase and comparison with the related pestivirus and flavivirus enzymes. *J Virol* 1993;67:6152-6158.
100. Kim JL, Morgenstern KA, Lin C, Fox T, Dwyer MD. Crystal structure of the hepatitis C virus NS3 protease domain complexed with a synthetic NS4A cofactor peptide. *Cell* 1996;87:343-355.
101. Hugle T, Fehrmann F, Bieck E, Kohara M, Krausslich HG. The hepatitis C virus nonstructural protein 4B is an integral endoplasmic reticulum membrane protein. *Virology* 2001;284:70-81.
102. Egger D, Wolk B, Gosert R, Bianchi L, Blum HE. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol* 2002;76:5974-5984.
103. Evans MJ, Rice CM and Goff SP. Phosphorylation of hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates its protein interactions and viral RNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:13038-13043.
104. Appel N, Pietschmann T and Bartenschlager R. Mutational analysis of hepatitis C virus nonstructural protein 5A: potential role of differential phosphorylation in RNA replication and identification of a genetically flexible domain. *J Virol* 2005;79:3187-3194.

105. Neddermann P, Quintavalle M, Di Pietro C, Clementi A, Cerretani M. Reduction of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation by selective inhibition of cellular kinases activates viral RNA replication in cell culture. *J Virol* 2004;78:13306-13314.
106. Moradpour D, Brass V, Bieck E, Friebe P, Gosert R. Membrane association of the RNA-dependent RNA polymerase is essential for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 2004;78:13278-13284.
107. Blight KJ, Kolykhalov AA and Rice CM. Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science* 2000;290:1972-1974.
108. Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 1998;282:938-941.
109. Agnello V, Abel G, Elfahal M, Knight GB and Zhang QX. Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:12766-12771.
110. Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, Roccasecca RM, Acali S. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *Embo J* 2002;21:5017-5025.
111. Ahlquist P, Noueir AO, Lee WM, Kushner DB and Dye BT. Host factors in positive-strand RNA virus genome replication. *J Virol* 2003;77:8181-8186.
112. Kato N. Molecular virology of hepatitis C virus. *Acta Med Okayama* 2001;55:133-159.
113. Kato N. Genome of human hepatitis C virus (HCV): gene organization, sequence diversity, and variation. *Microb Comp Genomics* 2000;5:129-151.

114. Soler M, Pellerin M, Malnou C, Dhumeaux D, Kean K, Pawlotsky J. Quasispecies heterogeneity and constraints on the evolution of the 5' noncoding region of hepatitis C virus (HCV): relationship with HCV resistance to interferon-alpha therapy. *Virology* 2002;298:160-173.
115. Nakano I, Fukuda Y, Katano Y. Interferon responsiveness in patients infected with hepatitis C virus 1b differs depending on viral subtype. *Gut* 2001;49:263-267.
116. Huy TT, Abe K. Molecular epidemiology of hepatitis B and C virus infections in Asia. *Pediatr Int* 2004;46:223-230.
117. Pujol FH, Devesa M. Genotypic variability of hepatitis viruses associated with chronic infection and the development of hepatocellular carcinoma. *J Clin Gastroenterol* 2005;39:611-618.
118. Alexopoulou A, Dourakis SP. Genetic heterogeneity of hepatitis viruses and its clinical significance. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005;4:47-55.
119. Forns X, Purcell RH, Bukh J. Quasispecies in viral persistence and pathogenesis of hepatitis C virus. *Trends Microbiol* 1999;7:402-410.
120. Viso AT. Pathogenesis of hepatitis C: HCV consensus 2007. *Braz J Infect Dis* 2007;11 Suppl 1:14-19.
121. Rehermann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol* 2005;5:215-229.
122. Mizokoshi E, Rehermann B. Immune responses and immunity in hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol* 2001;36:799-808.
123. Bassett SE, Thomas DL, Brasky KM, Lanford RE. Viral persistence, antibody to E1 and E2, and hypervariable region 1 sequence stability in hepatitis C virus-inoculated chimpanzees. *J Virol* 1999;73:1118-1126.

124. Bowen DG, Walker CM. Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. *Nature* 2005;436:946-952.
125. Şentürk H. Klinik bulgular ve tanı. Tekeli E, Balık İ, eds. *Viral Hepatit 2003*. 1.baskı, İstanbul: Deniz Ofset, 2003:222-225.
126. Yenen OŞ. Hepatit C virusu. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M, eds. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. 2. baskı, Ankara:Nobel Tıp Kitabevleri, 2002:1377-1400.
127. Marcus EL, Tur-Kaspa R. Chronic hepatitis C virus infection in older adults. *Clin Infect Dis* 2005;41:1606-1612.
128. Dienstag JL, Isselbacher KJ. Chronic hepatitis. In: Hauser K, Longo B, Jameson F, eds. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 16th ed. New York:McGraw-Hill, 2005:1844-1855.
129. Ohishi W, Kitamoto M, Aikata H. Impact of aging on the development of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus infection in Japan. *Scand J Gastroenterol* 2003;38:894-900.
130. Chevaliez S, Pawlotsky JM. Hepatitis C virus serologic and virologic tests and clinical diagnosis of HCV-related liver disease. *Int J Med Sci* 2006;3:35-40.
131. Pawlotsky JM. Molecular diagnosis of viral hepatitis. *Gastroenterology* 2002;122:1554-1568.
132. Zheng X, Pang M, Chan A, Roberto A, Warner D, Yen-Lieberman B. Direct comparison of hepatitis C virus genotypes tested by INNO-LiPA HCV II and TRUGENE HCV genotyping methods. *J Clin Virol* 2003;28:214-216.
133. Manns, M. P., J. G. McHutchison, S. C. Gordon, V. K. Rustgi, M. Shiffman, R. Reindollar, Z. D. Goodman, K. Koury. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: randomized trial. *Lancet*, 2001;358:958–965.

134. Feld JJ, Hoofnagle H. Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature* 2005;436:967-972.
135. Akkız H. Epidemiyoloji ve korunma. In: Tekeli E, Balık İ, eds. *Viral Hepatit* 2003. 1.baskı, İstanbul: Deniz Ofset, 2003:199-221.
136. Wasley A, Alter M. Epidemiology of hepatitis C: geographic differences and temporal trends. *Semin Liver Dis* 2000;20:1-16.
137. Chou R, Clark E, Holfand M. Screening for hepatitis C virus infection: a review of the evidence for the US Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med* 2004;140:465-479.
138. Demirturk N, Demirdal T, Toprak D, Altindis M, Aktepe OC. Hepatitis B and C virus in West-Central Turkey: seroprevalence in healthy individuals admitted to a university hospital for routine health checks. *Turk J Gastroenterol* 2006;17:267-272.
139. Dehesa-Violante M, Nuñez-Nateras R. Epidemiology of hepatitis virus B and C. *Arch Med Res.* 2007;38:606-611.
140. Devesa M, Rodriguez C, Leon G, Liprandi F, Pujol FH. Clade analysis and surface antigen polymorphism of hepatitis B virus American genotypes. *J Med Virol* 2004;72:377-384.
141. Lavanchy D. Hepatitis B virus epidemiology: disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *J Viral Hepatitis* 2004;11:97-107.
142. Kao JH, Wu NH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Hepatitis B genotypes and the response to interferon therapy. *J Hepatol* 2000;33:998-1002.
143. Liu CJ, Kao JH. Clinical implication of Hepatitis B virus genotype. In: Esteban R, eds. *Hepatology*. Spain, 2006;3;2:33-40.



144. Bozdayi AM, Bozkaya H, Turkyilmaz AR, Saryodlu M, Cetinkaya H, Karayalcin S, Yurdaydin C, Uzunalimoglu O. Nucleotide divergences in the core promoter and precore region of genotype D hepatitis B virus in patients with persistently elevated or normal ALT levels. *J Clin Virol* 2001;21:91-101.
145. Mısırlıoğlu M, Kayın E, Akman E, Tuncer S. Hepatitis B virus genotypes and viral load analysis in pre and post vaccination sera from carrier children. 2. Molecular and Diagnostic Microbiology Congress. 2002;152:3-8.
146. Sunbul M, Leblebicioglu H. Distribution of hepatitis B virus genotypes in patients with chronic hepatitis B in Turkey. *World J Gastroenterol* 2005 Apr 7;11:1976-1980.
147. Onganer P, Oguzoglu N, Ozer A. Mutation and genotype analysis of hepatitis B virus on acute and chronic infected selected patients in Turkey. *Journal of Cell and Molecular Biology* 2006;5:33-42.
148. Asahina Y, Enomoto N, Nagayama K. Hepatitis B virus mutations associated with lamivudine therapy in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology Research* 1999;15:145-156.
149. Stuyver L, Van Geyt C, Gent SD. Line probe assay for monitoring drug resistance in hepatitis B virus infected patients during antiviral therapy. *J Clin Microbiol* 2000;38:702-707.
150. Bozkaya H. Hepatit B virus mutasyonlarının klinik ve tedavi açısından önemleri. In: Ökten A, Çakaloğlu Y, eds. Hepatit B Ulusal Uzlaşma Toplantı Metinleri 2003. 1. baskı, İstanbul, 2003;29-42.
151. Şentürk H. HBe Ag pozitif kronik hepatit B'nin lamivudin ile tedavisi. In: Ökten A, Çakaloğlu Y, eds. Hepatit B Ulusal Uzlaşma Toplantı Metinleri 2003. 1.baskı, İstanbul, 2003;177-181.
152. Dan Y, Wai C, Lee Y. Outcome of lamivudine-resistant hepatitis B virus is generally benign except in cirrhotics. *World J Gastroenterol* 2005;11:4344-4350.

153. Kao JH, Liu CJ, Chen DS. Hepatitis B viral genotypes and lamivudine resistance. *J Hepatol* 2002;36:303-304.
154. Yuen MF, Wong DK, Sablon E. Hepatitis B virus genotypes B and C do not affect the antiviral response to lamivudine. *Antiviral Therapy* 2003;8:531-534.
155. Chan HL, Wong ML, Hui AY. Hepatitis B virus genotype has no impact on hepatitis B e antigen seroconversion after lamivudine treatment. *World J Gastroenterol* 2003;9:2695-2697.
156. Chien RN, Yeh CT, Tsai SL, Chu CM, Liaw YF. Determination for sustained HBeAg response to lamivudine therapy. *Hepatology* 2003;38:1267-1273.
157. Buti M, Cotrina M, Valdes A, Jardi R, Rodriguez-Frias F, Esteban R. Is hepatitis B virus subtype testing useful in predicting virologic response and resistance to lamivudine?. *J Hepatol* 2002;36:445-446.
158. Zöllner B, Petersen J, Puchhammer-Stöckl E, Kletzmayer J, Sterneck M, Fischer L, Schröter M. Viral features of lamivudine resistant hepatitis B genotypes A and D. *Hepatology* 2004;39:42-50.
159. Westland C, Delenay W 4th, Yang H. Hepatitis B virus genotypes and virologic response in 694 patients in phase III studies of ADV. *Gastroenterology* 2003;125:107-116.
160. Niesters HG, De Man RA, Pas SD, Fries E, Osterhaus AD. Identification of a new variant in the YMDD motif of the hepatitis B virus polymerase gene selected during lamivudine therapy. *J Med Microbiol* 2002;51:695-699.
161. Aygen B, Yıldız O, Demirtürk N, Demirdal T, İnan D, Yıldırım T, Kantürk A, Tütüncü E. Kronik hepatit B li hastalarda lamivudin direnci: Türkiye sonuçları. In: Örmeci N, Tabak ÖF, Tosun S, eds. IX. Ulusal Viral Hepatit Kongresi Konuşma Özetleri ve Bildiriler 2008. Antalya, 2008;167-169.

162. Melegari M, Scaglioni PP, Wands JR. Hepatitis B virus mutants associated with 3TC and famcyclovir administration are replication defective. *Hepatology* 1998;27:628-633.
163. Buster EH, Janssen HL. Antiviral treatment for chronic hepatitis B virus infection--immune modulation or viral suppression? *Neth J Med* 2006;64:175-185.
164. Locarnini S, Qi W, Arterburn S. Incidence and predictors emergence of adefovir resistant HBV during four years of ADV therapy for patients with chronic hepatitis B (CHB). *J Hepatol* 2005;42:17.
165. Corbet S, Bukh J, Heinsen A, Fomsgaard A. Hepatitis C virus subtyping by a core-envelope 1-based reverse transcriptase PCR assay with sequencing and its use in determining subtype distribution among Danish patients. *J Clin Microbiol* 2003;41:1091-1100.
166. Yalçın K, Degertekin H, Akkız H. HCV genotypes in HCV related chronic hepatitis in Southeast Anatolia. *Turkish Journal of Gastroenterology* 1999;10:249-252.
167. Yildiz E, Oztan A, Sar F, Pinarbasi E, Cetin-Atalay R, Akkız H, Ozturk M. Molecular characterization of a full genome Turkish hepatitis C virus 1b isolate (HCV-TR1): a predominant viral form in Turkey. *Virus Genes* 2002;25:169-177.
168. Altundiş M, Aktepe OM, Çetinkaya Z, Çiftçi İH. Hepatit C virus genotiplerinin Inno-Lipa ve sekans analizi ile belirlenmesi. *Mikrobiyoloji Bülteni* 2007;41:121-126.
169. Altindis M, Yilmaz S, Dikengil T, Acemoglu H, Hosoglu S. Seroprevalence and genotyping of hepatitis B, hepatitis C and HIV among healthy population and Turkish soldiers in Northern Cyprus. *World J Gastroenterol* 2006;12:6792-6796.

170. Altuglu I, Soyler I, Ozacar T, Erensoy S. Distribution of hepatitis C virus genotypes in patients with chronic hepatitis C infection in Western Turkey. *Int J Infect Dis* 2007;439-445.
171. Selcuk H, Kanbay M, Korkmaz M, Gur G, Akcay A, Arslan H, Ozdemir N, Yilmaz U, Boyacioglu S. Distribution of HCV Genotypes in Patients with End-Stage Renal Disease According to Type of Dialysis Treatment. *Dig Dis Sci* 2006; 51:1420–1425.
172. Bozdayi G, Rota S, Verdi H, Derici U, Sindel S, Bali M, Basay T. The presence of hepatitis C virus (HCV) infection in hemodialysis patients and determination of HCV genotype distribution. *Mikrobiyol Bul* 2002;36:291-300.
173. Gokahmetoglu S, Bozdayı M, Ozbakır O, Aygen B, Ozbal Y, Soyuer I, Yıldız O. Erciyes Üniversitesi'nde saptanan Hepatit C Virüs genotipleri. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi* 2007;37:35-38.
174. Abacioglu YH, Davidson F, Tuncer S, Yap PL, Ustacelebi S, Yulug N, Simmonds P. The distribution of hepatitis C virus genotypes in Turkish patients. *J Viral Hepat* 1995;2:297-301.
175. Savaş E, Savaş MC, Karşılıgil T. Kronik Hepatit C'li Hastalarda Genotip Tayini ve Tedaviye Etkisi. IX. Ulusal Viral Hepatit Kongresi bildiri özetleri kitabı. 2008;133.
176. Çil T, Özekinci T, Göral V, Altıntaş A. Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde Hepatit C Virüsü Genotipleri. *Turkiye Klinikleri J Med Sci* 2007;27:496-500.
177. <http://sbe.inonu.edu.tr/kazimsahintez.htm> (10.04.2008).
178. Akkız H, Çolakoğlu S, Köksal F. Çukurova bölgesinde hepatit C virus genotipleri. *Turk J Gastroenterol* 1995;97:19.
179. Uzunlimalıoğlu Ö, Mayumi M, Çetinkaya H. Türkiye'de hepatit C virus genotipleri. I. Ulusal hepatoloji kongresi bildiri özetleri kitabı. 1995;7:7.

180. Sönmez E, Taşyaran MA, Kızılkaya N, Korkut H, Tombul Z, Akçam ZC. The distribution of Hepatitis C virus (HCV) genotypes in 59 HCV infected patients: A multicenter study. *Flora* 1996;2:92.
181. Tuncer S, Özkuyumcu C, Arıkan S, Davidson F, Follett EA, Abacıoğlu YH, Ustaçelebi Ş. The relation of serological reactivities with HCV-PCR result and genotypes. *Viral Hepatit Derg* 1996;;10.
182. Kılıç H, Taşkopan H, Şahin İ, Köksal F, Utaş C. Hepatitis C virus genotypes in chronic hemodialysis patients. *Nephron* 2000;8:379.
183. Yoshioka K, Kakumu S, Wakita T. Differences in hepatitis C virus genotypes in different countries. *J Hepatol* 1993;17:277-283.
184. Mc Omisch F, Yap PL, Dow BC. Geographical distribution of hepatitis C virus genotypes in blood donors: An international collaborative survey. *J Clin Microbiol* 1994;884-892.
185. Dusheiko E, Schmiloudiz-Weiss H, Brown D. Hepatitis C virus genotypes: An investigation of type specific differences in geographic origin and disease. *Hepatology* 1994; 19:13-17.

## X-EKLER

**Ek-1:** Çalışmada kullanılan hepatit hastası veri toplama formu

**AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ  
ANS UYGULAMA VE ARAŞ. HASTANESİ  
MİKROBİYOLOJİ AB  
HEPATİT HASTASI VERİ TOPLAMA FORMU**

Hasta Adı/Soyadı:

Yaş:

( ) Ayaktan

Ön Tanı:

Tanının ilk konulduğu tarih:

Cinsiyet:

( ) Yatan:

Klinik:

### RİSKLER

*Kan transfüzyonu:*.....Var.....Yok

Kan transfüzyon sayısı: En son kan transfüzyon zamanı:

*Geçirilmiş ameliyat:*.....Var.....Yok

Geçirilen ameliyat zamanı: Geçirilen ameliyat türü:

*Diyaliz Hastası:*.....Evet.....Hayır

Kaç yıldır diyaliz hastası: Diyaliz alma sıklığı:

Alınan diyaliz türü: ( ) Periton diyaliz ( ) Hemodiyaliz

*Ailede hepatitli hasta:* ( ) Var ( ) Yok

Ailedeki hepatitli bireyler: ( )anne, ( )baba, ( )kardeş, ( )çocuk

### TESTLER

HBsAg: Anti HBs: Anti Hbc Ig M: Anti Hbc Ig G:

Anti HDV Ig M: Anti HDV Ig G:

HBV DNA:

HBV genotipleme, mutasyonel analiz ve ilaç direnci:.....

Anti HCV Ig M:.....

HCV RNA:.....

HCV genotipleme:.....