

K.K.T.C
YAKIN DOĞU ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

K.K.T.C'DE TEDAVİ NAİF HEPATİT B'Lİ HASTALARDA
GENOTİP/SUBGENOTİP DAĞILIMI VE NÜKLEOZ(T)İD
ANALOG DİRENCİ

Ayşe ARIKAN

MİKROBİYOLOJİ PROGRAMI
DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Tamer ŞANLIDAĞ

LEFKOŞA
2015

Yakın Doğu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 11.12.2015

İmza

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Turgut İMİR

Jüri

Prof. Dr. Tamer ŞANLIDAĞ

Jüri

Prof. Dr. Nedim ÇAKIR

Jüri

Doç. Dr. Kaya SÜER

Jüri

Doç. Dr. Murat SAYAN

Onay:

Bu tez, Yakın Doğu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim –Öğretim ve Sınav yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İhsan ÇALIŞ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimimizin başlamasında büyük katkısı olan, doktora eğitim ve tez sürecimde bana destek olan, bilgi ve tecrübelerini paylaşan, olumsuzluğa kapıldığım zamanlarda bana benden çok inanan ve asistanı olmaktan sonsuz gurur duyduğum danışmanım Prof. Dr. Tamer Şanlıdağ'a,

Yakın Doğu Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Turgut İmir'e desteklerinden dolayı,

Her zaman bana destek olup moralimi yüksek tutan ve yardımlarını hiç esirgemeyen Doç. Dr. Kaya Süer'e,

Hiçbir karşılık beklemeksizin tezimin serolojik ve moleküler çalışmalarını beraber yürüttüğümüz ve tezin her aşamasında desteğini, sabrını benden esirgemeyen Prof. Dr. Sinem Akçalı ve Doç. Dr. Murat Sayan'a,

Tez çalışmalarım boyunca yanımda olan ve beraber çalışmaktan mutluluk duyduğum meslektaşlarım Emrah Güler ve Meryem Güvenir Olgı'ya,

Eğitim hayatım boyunca yanımda olan babam Mustafa Arıkan'a, annem Hacer Arıkan'a, abim Mehmet Arıkan'a, ablalarım Havva Candaş ve Müfide Acarkan'a, eşim Hüseyin Sarıoğlu'na ve hayatıma yeni anlamlar katan oğlum Ali Sarıoğlu'na ve doğacak kızım'a tüm kalbimle teşekkür ediyorum...

ARIKAN A. K.K.T.C’de Tedavi Naif Hepatit B’li Hastalarda HBV Genotip/Subgenotip Dağılımı ve Nükleoz(t)id Analog Direnci. Yakın Doğu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Programı, Doktora Tezi, Lefkoşa, 2015.

ÖZET

Hepatit B virüsü (HBV) ile enfekte hastalarda etkin bir surveyans için dolaşımdaki HBV suşlarının tanımlanması ve moleküler epidemiyolojik özelliklerinin bilinmesi önemlidir. Bu çalışmada Kuzey Kıbrıs’ta HBV genotip/subgenotip dağılımının belirlenmesi, NA ile ilişkili doğal gelişen primer ve kompensatuvar nitelikteki HBV polimeraz (*pol*) geni mutasyonları ile tipik HBsAg kaçış mutasyonlarının moleküler karakterlerini ortaya çıkarmayı amaçladık. Yakın Doğu Üniversitesi Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarına hepatit testlerini yaptırmak üzere başvuran kişilerde, HBsAg pozitif olarak saptanan serum örnekleri çalışmaya alındı ve hepatit belirteçleri HBsAg (Architect i200, Abbott) anti-HBc, HBeAg, anti-HBe (Liaison XL Murex, DiaSorin) kemiluminesan enzim immunoassay yöntemiyle araştırıldı. HBsAg pozitif olgularda HBV DNA kantitasyonu real-time PCR yöntemiyle (Artus, HBV QS RGQ Qiagen) üretici firmanın önerileri doğrultusunda çalışıldı. İzole edilen HBV suşlarında genotip/subgenotip tayini HBV *pol* geni (ters transkriptaz (rt) bölgesi, 80. - 250. amino asitleri arası) sekans analizi ile yapıldı. Bilinen tüm primer/kompansatuvar NA direnci mutasyonları HBV *pol* geni (ters transkriptaz; RT bölgesi, 80.-250. aa arası) dizilenerek analiz edildi. Bu amaçla serum örneğinden HBV DNA izole edildi (Qiagen, Artus HBV RGQ). HBV *pol* geni amplifikasyonu real-time PCR ile gerçekleştirildi. Elde edilen diziler Geno2pheno Drug Resistance programında (Center of Advanced European Studies and Research, Almanya) analiz edildi. Tarama testlerini yaptırmak üzere başvuran 13,892 kişinin 160’ı (%1,1) pozitif olarak saptandı. Altmış olguda zayıf HBV DNA yükü (<1000IU/ml) nedeniyle sekanslama yapılamadı. Olguların 32’sinde, HBV DNA kantitasyon sınırları dışında kaldığı için (<30 IU/ml) sekanslama işlemi dışında bırakıldı. Altmışsekiz olguda HBV suşlarının genotip/subgenotip tayini yapıldı ve 48’inde (%71) D/D1, 4’ünde (%6) D/D2, 1’inde (%1) D/D3, 5’inde (%7) A/A1, 2’sinde (%3) A/A2 ve 8’inde (%12) E saptandı.. *Pol* geni mutasyonları incelendiğinde 1/68’ inde (%1) (rtV173M) primer /parsiyel ilaç direnci saptandı. Yirmibeş olgu’da (%37) telbivudine (LdT), lamivudin (LAM) ve adefovir (ADV) ile ilişkili (rtL91I, rtQ149K, rtQ215H/P/S ve rtN238D) kompensatuvar direnç mutasyonları tanımlandı. S gen bölgesi mutasyonları; Altmış sekiz hastanın 16’sında (%24) bağışık yanıt kaçığı (sY100C, sI110L, sP120L/R, sT123N, sT127L, sP127T, sA128V, sT131N, sS132P, sY134F/H, sT140I/S, sS143T, sD144E, sS144T, sP210S), 7’sinde (%10) HBsAg aşı kaçığı (sT126I, sD144A/E, sG145A/R, sS193L, sP210T), 4’ünde (%6) hepatit B immunglobulin (HBiG) kaçığı (sT118A, sP120T,

sD144A/E, sG145A/E/R) ve 3'ünde (%4) HBsAg tanı kaçağı (sT118A, sT131I, sP120T, sC121Y, sD144A, sG145R) mutasyon paternleri belirlendi. Altı hastada (%9) ise kombine S geni mutasyon paternleri mevcuttu. Bulgularımız Kuzey Kıbrıs'da HBV'nin A, D ve E genotiplerinin, D1, D2, D3 ve A1, A2 subgenotiplerinin bulunduğunu, dolaşımda bulunan NA ile ilişkili primer/kompansatuvar mutasyonların tedavi başarısını etkileyecek paternlere ve prevalansa sahip olmadıklarını göstermektedir. Bununla birlikte bulgularımız Kuzey Kıbrıs'ta kronik hepatit B'li hastalarda, tipik HBsAg kaçış mutasyonlarının epidemiyolojik önemde olduğunu göstermektedir. Tedavi naif ya da oral antiviral tedavi izlenen kronik hepatit B'li hastalarda HBV pol geninin yanı sıra S geninin de analiz edilmesi halk sağlığının korunması bakımından yararlı ve gerekli olabilir.

Anahtar Kelimeler: Kuzey Kıbrıs, Hepatit B virüsü, moleküler epidemiyoloji, *pol/S* geni, mutasyon.

Destekleyen Kurum: Celal Bayar Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projesi (BAP) tarafından desteklenmiştir. Proje No: 2013-097

ARIKAN A. Genotype/Subgenotype Distribution and Nükleoz(t)id Analog Resistance of Treatment Naive Hepatitis B Patients in TRNC. Near East University Graduate School of Health Sciences, Microbiology Program, Doctoral Thesis, Nicosia, 2015.

ABSTRACT

It is important to identify genotypes and epidemiology of Hepatitis B virus (HBV) within blood circulation of HBV infected people for an effective surveillance. The current study was aimed to identify HBV genotypes/subgenotypes, primer/compensatory (*pol*) gene and HBsAg escape mutations in Northern Cyprus. Patients who came to Near East University, Infection Disease and Microbiology laboratory with HBsAg positive results were taken to the study. Hepatitis markers; HBsAg (Architect i200, Abbott) anti-HBc, HBeAg, anti-HBe (Liaison XL Murex, DiaSorin) were investigated by chemiluminesan enzyme immunoassay. HBV DNA quantitation of HBsAg positive cases was investigated by real - time PCR (Artus, HBV QS RGQ Qiagen). Genotype/Subgenotype analysis of HBV strains was done by sequencing of HBV *pol* gene (reverse transcriptase (rt) region, 80. - 250. between amino acids). All known primer/compensatory oral antiviral resistance mutations were analysed by sequencing HBV *pol* genes (reverse transcriptase; RT region, between 80.-250. aa). For this aim, HBV DNA was isolated from serum (Qiagen, Artus HBV RGQ). HBV *pol* gene amplification was carried out by real- time PCR. The obtained datas were analysed by using Geno2pheno Drug Resistance program (Center of Advanced European Studies and Research, Almanya). Out of 13,892 people, 160 (1.1%) had positive result for HBsAg. All positive samples were analyzed for HBV DNA. Because of low level of HBV DNA quantitation (<10000 IU/ml), 60 cases weren't sequenced. Thirthy two cases with higher HBV DNA level (<30 IU/ml) could not be sequenced successfully. Genotypes and subgenotypes were determined by sequencing HBV *pol* gene (reverse transcriptase (rt) region, between 80 - 250. aminoacides in 68 patients. Genotype/subgenotype analysis of 68 cases were; 48 (%71) D/D1, 4 (%6) D/D2, 1 (%1) D/D3, 5 (%7) A/A1, 2 (%3) A/A2 and 8 (%12) E. Only one cases (%1) had (rtV173M) primer /parsiel drug resistance. Twenty five cases (%37) had telbivudine (LdT), lamivudin (LAM) and adefovir (ADV) related (rtL91I, rtQ149K, rtQ215H/P/S ve rtN238D) compensatory resistance mutations. S gene mutations were; 16 (%24) immune response escape (sY100C, sI110L, sP120L/R, sT123N, sT127L, sP127T, sA128V, sT131N, sS132P, sY134F/H, sT140I/S, sS143T, sD144E, sS144T, sP210S), 7 (%10) HBsAg vaccine escape (sT126I, sD144A/E, sG145A/R, sS193L, sP210T), 4 (%6) hepatitis B immunoglobulin (HBiG) escape (sT118A, sP120T, sD144A/E, sG145A/E/R) and 3 (%4) HBsAg diagnosis escape (sT118A, sT131I, sP120T, sC121Y, sD144A, sG145R) mutations.

Six cases (%9) had also combined *S* gene mutation. Our results shows that, HBV genotypes A, D and E; subgenotypes D1, D2, D3, A1 and A2 are found in Northern Cyprus. It is also found that primer/compensatory mutations does not effect the treatment whereas, HBsAg escape mutations are epidemiologically important. So, it is important and beneficial for public health to analyze *S* gene together with *pol* gene in both treatment naive and oral treated patients.

Key Words: Northern Cyprus, Hepatitis B virus, molecular epidemiology, *pol/S* gen, mutation.

Supported by: Celal Bayar University, Scientific Research Project (BAP).
Grant No: 2013-097

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
TABLolar DİZİNİ	xv
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Tarihçe	4
2.2. Taksonomi	5
2.3. Virion Yapısın ve Genomik Organizasyon	5
2.4. HBV Genotip/Subgenotip ve Subtipleri	10
2.5. Epidemiyoloji	14
2.5.1. Bulaş Yolları	14
2.5.1.1. Parenteral (Perkütan) Yol	14
2.5.1.2. Perinatal (infekte anneden yenidoğana bulaş) (vertikal)	15

2.5.1.3. Cinsel Bulaş	15
2.5.1.4. Horizontal Bulaş	16
2.5.2. Risk Grupları	16
2.5.3. Korunma	18
2.5.3.1. Genel Korunma Önlemleri	19
2.5.3.2. Pasif İmmünizasyon	19
2.5.3.3. Aktif İmmünizasyon	20
2.5.4. Klinik ve Laboratuvar Tanı	22
2.5.4.1. HBsAg	23
2.5.4.2. HBeAg ve Anti HBe	24
2.5.4.3. Anti HBc Ig M	24
2.5.4.4. Anti HBc Ig G ve total anti HBe	24
2.5.4.5. Anti- HBs	24
2.5.4.6. HBV DNA	24
2.5.5. Dünyada HBV	27
2.6. Tedavi	28
2.6.1. Kronik Hepatit B Tedavisinde Kullanılan İlaçlar	29
2.6.1.1. İnterferon- Alfa (IFN-alfa)	29
2.6.1.2. Nükleozid Analogları	30
2.6.1.2.1. Lamivudin	31
2.6.1.2.2. Adefovir	31
2.6.1.2.3. Entekavir	32

2.6.1.2.4. Tenofovir Disoproxil Fumarat	32
3. HBV Mutantları ve Mutasyonların Klinik Önemi	33
3.1. Bazal kor promoter/prekor ve kor bölge mutasyonları	34
3.2. X bölgesi mutasyonları	35
3.3. Zarf bölge mutasyonları	35
3.4. Polimeraz bölge mutasyonları	36
3.5. Lamivudin direncine neden olan mutasyonlar	36
3.6. Adefovir dipivoksil direncine neden olan mutasyonlar	37
3.7. Entekavir direncine neden olan mutasyonlar	37
4. GEREÇ VE YÖNTEM	38
4.1. HBV Kantitasyonu	38
4.2. HBV genotipleme/subtipleme, nükleozid direnci analizi ve HBsAg mutasyon analizi	38
4.3. Filogenetik Ağaç	39
4.4. İstatistik	39
5. BULGULAR	40
6. TARTIŞMA	47
7. SONUÇ VE ÖNERİLER	52
8. KAYNAKLAR	53
9. TEZDEN YAPILAN YAYINLAR, SUNULAR, POSTERLER	61

SİMGELER VE KISALTMALAR

ADAPVEM	Antiviral Drug Associated Potential Vaccine Escape Mutant
ADV	Adefovir
ALT	Alanin Aminotransferaz
AST	Aspartat Transaminaz
Au	Avusturalya Antijeni
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EIA	Enzyme Immunoassay
ETV	Entekavir
HBIG	Hepatit B hiperimmünglobulin
HBV	Hepatit B Virüsü
HCV	Hepatit C virüsü
HIV	İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü
HSK	Hepatoselüler Karsinoma
IFN	İnterferon
IFN- α	İnterferon Alfa
KHB	Kronik Hepatit B
LAM	Lamivudin
LdT	Telbivudin
LHBsAg	Büyük HBsAg Antijeni
MHBsAg	Orta HBsAg Antijeni
NA	Nükleoz(t)id Analogu
NRTI	Nükleoz(t)id Ters Transkriptaz İnhibitörleri
ORF	Open reading frame (Açık okuma bölgesi)
<i>P.pastoris</i>	<i>Pasturella pastoris</i>

PCR	Polimerase Chain Reaction
<i>Pol</i>	Polimeraz
RIA	Radio Immunoassay
RT	Ters Transkriptaz
<i>S.cerevisia</i>	<i>Saccromyces cerevisiae</i>
SHBsAg	Küçük HBsAg Antijeni
TDF	Tenofovir

ŞEKİLLER

	Sayfa
Şekil. 2.3.1. HBV virionunun şematik yapısı	8
Şekil 2.3.2. HBV genomunun organizasyonu	9
Şekil 2.3.3. Dane partikülü, sferik ve filamentöz partiküllerin elektron mikroskobu görünümü.	9
Şekil 5.1. Kuzey Kıbrıs'ta dolaşımdaki HBV suşlarının dendogramı	42

TABLOLAR

	Sayfa
Tablo 2.4.1. Genotiplerin coğrafik dağılımı	13
Tablo 2.5.1.1. HBV'nin bulaşma yolları	16
Tablo 2.5.2.1. HBV enfeksiyonu bulaşma yolları ve bulaşma yollarına göre risk grupları	18
Tablo 2.5.3.1.1. Hepatit B aşısı önerilen kişi ve grupları	22
Tablo 2.5.4.1. HBV'nin Antijen ve Antikorlarının Adlandırılması	25
Tablo 2.5.4.2. Serolojik kan testlerinin muhtemel sonuçları ve yorumlar	26
Tablo 2.6.1.1. Dünya'da kronik HBV enfeksiyonlarının tedavisinde onay alan ve alma aşamasında olan ilaçlar	33
Tablo 5.1. HBV DNA sekanslama işlemine alınan olguların demografik ve laboratuvar bulguları	40
Tablo 5.2. Kuzey Kıbrıs'ta saptanan HBV genotip/subgenotiplerin ülkelere göre dağılımı	43
Tablo 5.3. HBV <i>pol</i> geni mutasyonları ve klinik özellikleri	44
Tablo 5.4. Tedavi naif hepatit B'li hastalarda tipik HBsAg mutasyonları	44
Tablo 5.5. Kombine S geni mutasyon paternler	46

1. GİRİŞ

Viral enfeksiyonlarda; özellikle Hepatit B virüs (HBV) enfeksiyonlarında etkin bir enfeksiyon kontrolü için dolaşımdaki HBV suşlarının tanımlanması ve moleküler epidemiyolojik özelliklerinin bilinmesi gerekmektedir.

HBV bütün dünyada olduğu gibi ülkemizde de en yaygın ve ciddi sağlık sorunlarının başında gelmektedir. Dünya nüfusunun üçte biri bu virüsle karşılaşmış olup, yaklaşık 400 milyon kişinin kronik olarak enfekte olduğu bilinmektedir (Yamazhan T., 2011). HBV enfeksiyonu klinik olarak akut veya fulminan hepatit, kronik veya kronik taşıyıcılık şeklinde seyredebildiği gibi, karaciğer sirozu ve hepatoselüler karsinomaya (HSK) da dönüşebilmekte ve buna bağlı olarak ölümler görülebilmektedir (Kulah C., Çırak YM., 2010).

Hepatit B virüsü (HBV), ters transkriptaz (RT) enziminin hata düzeltme (proofreading) aktivitesinden yoksun olması ve yüksek replikasyon kapasitesi nedeniyle ($>10^{12}$ virion/gün) viral replikasyon sırasında yüksek nükleotid değişim sıklığına (10^5 substitution/baz/siklus) sahiptir (Schaefer S., 2005; Locarnini SA., 2002). Bu nedenle HBV, genotip ve subgenotip seviyesinde genomik ve coğrafik farklılıklar göstermektedir. Filogenetik analiz tekniği kullanılarak elde edilen dizilere göre HBV, tüm genomda genotipler için $>7.5\%$, subgenotipler için $>4\%$ nükleotid dizi farklılığı göstermektedir. Bu dizi farklılıkları dikkate alınarak yapılan analizlerde günümüze kadar HBV'nin kesinleşmiş A – H'ye kadar 8 farklı genotipi ve 25 farklı subgenotipi tanımlanmıştır (Emektaş G ve diğerleri, 2012; Okamoto H ve diğerleri, 1988, Kurbanov H ve diğerleri, 2010).

HBV genotipleri, coğrafik bölgelere göre farklı dağılımlar göstermektedir. Kuzeybatı Avrupa, Kuzey Amerika ve Afrika'da genotip A baskın olarak görülürken (genotip A'nın; Sahra Altı Afrikada yaygın olan A1, Kuzey Avrupa'da yaygın olan A2 ve Batı Afrika'ya özgü A3 olmak üzere 3 subgenotipi bulunmaktadır), Doğu Asya ve Uzak doğu ülkelerinde genotip B ve C (Japonya'da B1, Doğu Asya'da B2 - B5, Kuzey Kutup bölgesinde B6; Çin, Kore,

Güneydoğu Asya ve birçok Güney Pasifik ada ülkelerinde C3 bulunmaktadır) daha baskındır. Genotip D (D1- D7 olarak subtiplendirilmektedir) tüm dünya genelinde yaygın olmakla birlikte Akdeniz bölgesi, Yakın Doğu ve Orta Doğu ülkeleri ile Güney Asya'da daha sık görülmektedir. Batı Afrika'da genotip E; Orta Amerika bölgesinde genotip F (F1-F4 olarak subtiplendirilmektedir) daha baskındır (Pourkarim MR. Ve diğerleri, 2014). Genotip G'nin orjini tam olarak bilinmemekle birlikte Türkiye, Amerika, Fransa, Kanada, Almanya, Vietnam, Taylan ve Japonya'dan, Genotip H ise Türkiye, Alaska, Orta ve Güney Amerikaaynı zamanda Polinezya'dan bildirilmiştir (Sayan M. Ve diğerleri, 2014; Ural O. Ve diğerleri, 2013; Lindh M. ve diğerleri, 2005; Stuyner L. Ve diğerleri, 2000; Silva AC. Ve diğerleri, 2010).

Yapılan çalışmalara göre Güneydoğu ve Doğu Anadolu bölgelerinde daha yüksek olmakla birlikte Türkiye, %2.5 - %9.1 arasındaki HBsAg pozitifliğine göre orta/yüksek endemisiteli ülkeler arasında yer almaktadır (Van DP., 2010). Ayrıca, genotip A, E, G ve H ile enfekte olgular bildirilse de Türkiye'de hepatit B'li kişilerde genotip D'nin baskın olduğu gösterilmiştir (Sayan M., ve diğerleri, 2012; Ural O. Ve diğerleri, 2013; Sayan M. Ve diğerleri, 2010; Sayan M. Ve diğerleri, 2010; Bozdayı G. Ve diğerleri, 2005). Ancak Kuzey Kıbrıs'ta HBV genotip/subgenotip dağılımı hakkında elimizde hiç bir veri bulunmamaktadır.

Günümüzde kronik HBV (KHB) enfeksiyonu tedavisinde interferon- α (IFN- α) ve ped-interferon gibi immünmodülatör ajanlar, nükleoz(t)id analogları (NA); lamivudin (LAM), telbivudin (LdT), deoksiguanozin analogu (entekavir (ETV) ve asit fosfonatlar (adefovir (ADV) ve tenofovir (TDF) gibi oral antiviraller ((nükleoz(t)id ters transkriptaz inhibitörleri (NRTI)) kullanılmaktadır (Sayan M., Hülagü S., 2009; Sayan M., Buğdacı S.M, 2013). Ancak tedavide kullanılan oral antivirallerle HBV polimeraz (*pol*)/yüzey S genlerinde kompleks paternler oluşmaktadır. HBV'nin yüksek replikasyon kapasitesi (10^{12} virion/gün) ve ters transkriptaz işleminde hata düzeltmeme özelliğinden dolayı meydana gelen bu mutasyonlar (10^{-5} substitusyon/baz/siklus), HBV genomundaki her bir

nükleotidin gün içerisinde değişip tedavi öncesinde NA direnci meydana getirebilmesi anlamına gelmektedir (Sayan M., Buğdacı S.M, 2013).

Ayrıca, HBV'nin genom organizasyonunda *pol* ve *S* genleri üst üste çakışır pozisyonundadır. Buna bağlı olarak gelişen ilaç direnci mutasyonları, hepatit B yüzey antijeni (HBsAg) yapısında aminoasit değişikliklerine neden olabilmektedir. Bu nedenle, HBV enfeksiyonlarında doğal gelişen ilaç direnci mutasyonları bulunabilmektedir (Sayan M., Buğdacı SM., 2013).

HBV'nin genomik organizasyonunda *pol/S* gen örtüşmesi nedeniyle KHB'nin tedavisinde kullanılan oral antivirallerin aşı kaçağı, tanı kaçağı, immunglobulin (HBIG) kaçağı, bağışık yanıtta kaçış HBsAg varyantları oluşabilmekte ve bu varyantların oluşturduğu mutasyonlara bağlı olarak farklı klinik sonuçlar meydana gelmektedir (Baument TF. ve diğerleri, 2007). Kullanılan antiviral ajanlara karşı direncin gelişmesi NA tedavisinde karşılaşılan en önemli sorunlardan olup, mutasyonlara bağlı olarak HBV DNA yükünde artış ve neticesinde tedavide başarısızlıklar görülmektedir.

Bu çalışmada Kuzey Kıbrıs'taki HBV genotip ve subgenotip dağılımının belirlenmesi ve HBV ile enfekte NA naif hastalarda doğal gelişen *pol* ve *S* geni varyantlarının araştırılması amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Viral hepatit ilk olarak MÖ 460-370 yıllarında Hipokrat tarafından tanımlanmıştır. Yıllar boyunca kullanılacak olan “kataral ikter” terimi 1865 yılında ilk olarak Virchow tarafından gündeme getirilmiştir. İlk salgın (sarılık epidemisi) Napoleon’un Mısır seferi sırasında gerçekleşmiştir. Daha sonra, 1883 yılında Almanya Bremen’de insan lenf sıvısı kullanılarak hazırlanan suçiçeği virüs aşısı yapılan gemi çalışanlarında kan kaynaklı hepatit salgını görülmüştür. Denizcilerin %15’inde birkaç hafta ile 8 ay içerisinde sarılık hastalığı görülmüştür. Salgınlar devam etmekteydi ve 20. YY’ın ilk yarısında kızamık ve kabakulak immün profilaksisi amacıyla plazma verilen kişiler ile insan serumu içeren sarı humma aşısı yapılan askeri personelde ve kontamine iğnelerin kullanıldığı cinsel yolla bulaşan hastalık kliniklerinde tedavi gören hastalarda sarılık salgınları görülmeye başlamış; II. Dünya Savaşı sırasında kan transfüzyonu yapılan askerlerde ciddi sorunlara neden olmuştur (Öznur Öztürk, 2010).

Virüslerin keşfinden önce, epidemiyolojik gözlemlere dayalı olarak 2 türlü hepatit bulaşı olduğu belirtilmiştir. Bunlar; çoğunlukla fekal-oral yolla bulaştığı düşünülen Tip A ve parenteral olarak bulaştığı düşünülen Tip B’dir. 1947 yılında Maccallum ve Bauer enfeksiyöz hepatit için hepatit A ve serum hepatiti için hepatit B terimini kullanmışlardı ve bu iki hastalığın epidemiyolojisinin farklı olduğu saptanmıştır. 1973 yılında Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), hepatitin iki farklı etkenini birbirinden ayırmak için hepatit A ve hepatit B terimlerini önermiştir (Öznur Öztürk, 2010).

HBV kan yoluyla bulaşan sarılık etkeni olarak ilk kez Blumberg ve arkadaşları tarafından 1965 yılında “Avusturalya (Au) Antijeni” ‘HBsAg’ olarak tanımlanarak, bir serum proteini olarak rapor edilmiştir (*Br Med Bull*, 1972). Daha ileriki yıllarda, 1970 yılında Dane DS ve arkadaşları elektron mikroskopisi tekniğini kullanarak inceledikleri hasta serumlarında yüzeylerinde aynı antijeni taşıyan virüs benzeri partikülleri saptamışlar ve bu partiküllerin HBV olduğunu ileri

sürmüşlerdir. Elektron mikroskopik olarak görüntüledikleri bu partiküllere “Dane Partikülleri” adını vermişlerdir. HBV enfeksiyöz partikülü olan 42 nm büyüklüğündeki Dane partikülleri dışında 22 nm’lik sferik ve 22 x 100–200 nm büyüklüğündeki filamentöz partiküller (eksik virüs partikülleri) de elektron mikroskopunda tarif edilmiş, ilerleyen yıllarda gerçekleştirilen çalışmalarda virüsün genomik yapısı ve proteinleri karakterize edilmiştir (Dane DS. ve diğerleri, 1970).

2.2. Taksonomi

Hepatit B virüsü; *Hepadnaviridae* ailesinin Orthohepadnavirüs cinsinde yer alan, hepatotropik, zarflı ve kısmen çift sarmallı bir DNA virüsüdür (Özdemir D, Balık İ, 2002). *Hepadnaviridae* ailesinde yer alan HBV, ailenin diğer üyeleri içerisinde insanlarda enfeksiyon yapan tek ve bilinen tüm hayvan DNA virüsleri içerisinde en küçük olan türdür (Arslan U, Tuncer İ ve diğerleri, 2008); (Ali Aşan, 2007). *Hepadnavirüsler* memelilerde ve kuşlarda olmak üzere iki farklı cinse ayrılırlar. *Orthohepadnavirüsler* memelilerde, *Avihepadnavirüsler* ise kuşlarda görülür. *Orthohepadnavirüs* üyeleri; insanları, dağ sıçanlarını (*Marmota monax*), yer sincaplarını (*Spermophilus lateralis*), Arktik sincapları (*Spermophilus parryi*), yünlü maymunları, orangutanları, şempanzeleri ve gibbon türü maymunları enfekte etmektedir. *Avihepadnavirüs* üyeleri ise ördek, gri balıkçıl (*Ardea cinerea*), küçük kar kazı (*Anser rossii*), kar kazı (*Anser caerulescens*) ve beyaz leyleklerde bulunmaktadır. Memeli ve kuş *hepadnavirüsleri* genomik yapıları birbirine benzemektedir (Öznur Öztürk, 2010).

2.3. Virion Yapısı ve Genomik Organizasyon

Virüs elektron mikroskopunda çift katmanlı olarak görülmektedir. Dıştaki katman HBsAg proteinlerinden oluşan viral zarftır. HBsAg; geniş (L), orta (M), ve küçük (S) olmak üzere üç protein çeşitinden oluşmaktadır. Bu proteinler aynı diziyi paylaşırlar ancak, L ve M proteinlerinde farklı uzunluklarda

amino ucu uzantıları bulunmaktadır. L-HBsAg; pre- S1 ve pre-S2 bölgelerini; M-HBsAg ise pre-S2'yi içermektedir. 37 nm çapında DNA'yı saran içteki katman ise Kor partikülü veya kapsit olarak adlandırmakta ve HBcAg proteinlerinden oluşmaktadır. Kandaki titresini 10 titre/ml den 10^9 titre/ml'ye kadar çıkabilmektedir. Kanda saptanan HBsAg'ler virionlar değil, HBsAg'den oluşan ve viral DNA içermeyen 20 nm çapında 16-25 nm uzunluğunda küresel partiküllerdir. Bu boş partiküller DNA içermedikleri için hastalık yapma yeteneğine sahip değildirler (Ali Aşan, 2007).

DNA'nın bu formları enfekte kan serumunda yüksek miktarda saptanabilir (200-500 ug/ml) ve HBsAg yüzey antijenine sahiptirler. İmmunojenik olan partiküller anti HBs antikorları ile reaksiyon verirler. DANE partiküllerinin sayısı serumda 10^4 - 10^9 /ml olurken, non infektif formlar serumda 10^{13} /ml'den daha yüksek miktarda bulunurlar. Serumdaki HBsAg'nin büyük kısmını 22 nm'lik küresel partiküller oluşturmaktadır (Davut Özdemir).

HBV genomu yaklaşık 3,2 kb uzunluğunda, kısmen çift ($\approx$ % 70), kısmen tek iplikli ($\approx$ % 30) çembersel DNA'dan oluşup ikozahedral bir kapsid içerisinde bulunmaktadır ve bu kapsid dışında 3 farklı yüzey antijenini taşıyan lipid yapılı zarf yer almaktadır HBV zarf proteinleri, protein ve glikoprotein yapısında yapı taşı içeren küçük, orta ve büyük yüzey antijenleri olarak adlandırılan proteinlerdir. Bunlar; küçük olan HBs antijeni (SHBs Ag), orta HBs antijeni (MHBs Ag) ve büyük HBs antijeni (LHBs Ag)'dir. Her üç bileşen enfeksiyöz dane partikülünün yapısında yer almaktadır. L ve M proteinleri daha az oranda virüs zarfının yapısında bulunurken, S bileşeni ise virüs zarfındaki ana proteindir. Bu proteinlerin karboksi terminalindeki 225 aminoasiti ortaktır ve üçü de S domaininde yer alan sistein grupları arasında oluşan disülfid bağlarıyla stabilize edilen glikozile tip 2 transmembran proteini özelliği göstermektedirler. HBV virionunun şematik yapısı Şekil. 2.3.1'de verilmektedir (Ali Aşan, 2007).

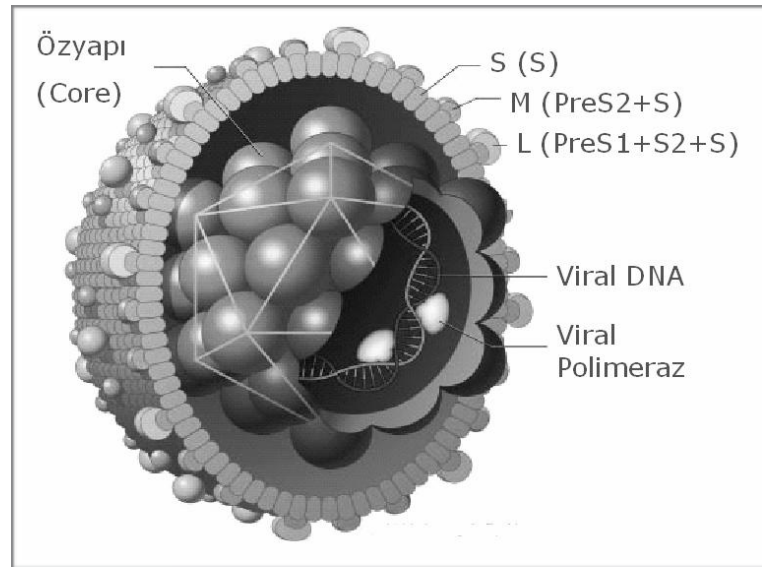
HBV bir DNA virüsü olmasına karşın, genom replikasyonu bir RNA aracısı ile olmaktadır ve DNA sentezi viral polimerazın ters (revers) transkriptaz

(RT) aktivitesiyle gerçekleşmektedir. Zarflı bir virüs olmasına rağmen düşük pH, eter, ısı, dondurma ve çözmeye oldukça dirençli olma özelliği HBV'ye kişiden kişiye geçişte olumlu katkı sağlamakla birlikte dezenfektanlara karşı direncini de artırmaktadır (Esra Çelik, 2011; Ali Aşan, 2007; Nurettin Tunç, 2009).

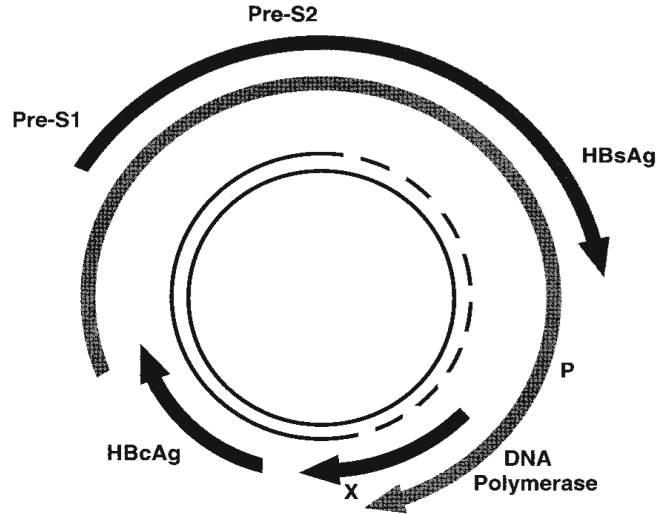
HBV genomu, oldukça sıkı bir yapıdadır ve her biri eksi DNA üzerinde kodlanmış ve üst üste çakışır pozisyonda olan 4 önemli gen bölgesi (Open Reading Frame - ORF) (açık okuma bölgesi) içermektedir. Bunlar pre-S/S, pre-C/C, P ve X bölgeleridir. Şekil 2.3.2'de HBV genomunun organizasyonu görülmektedir. Bu gen bölgeleri birbirleri ile iç içe yerleşiktirler ve farklı bölgelerden okunmaya başlayarak farklı proteinlerin kodlanmasında görev alırlar. S geninde preS1, preS2 ve S bölgeleri olmak üzere üç farklı başlangıç kodonu bulunmaktadır. C geninde ise, preC ve C bölgeleri olmak üzere iki farklı başlangıç kodonu bulunmaktadır. C bölgesindeki translasyon C başlangıç kodonundan başlarsa "core" (nükleokapsid) polipeptidi (HBcAg), pre-C başlangıç kodonundan başlarsa infektivite proteini (HBeAg) sentezlenmektedir. P geni viral genomun 3/4'ünü oluşturmaktadır ve RT aktivitesine sahip DNA polimeraz enzimini sentezlemektedir. X geni DNA polimeraz (RT) ve ribonükleaz aktivitesine sahip temel polipeptidi kodlar ve transaktivasyon proteini olan x proteinini sentezler. Ayrıca iki ORF çoklu proteinler kodlarlar: kor/prekor ORF iki protein üretmektedir (kor proteini ve e antijeni), S-ORF üç zarf proteini kodlar. Bunlar; S, M (S + preS2), ve L (S + preS2 + preS1) proteinleridir. Aynı ORF'de kodlanan bu proteinlerin bazıları, farklı mRNA'lar tarafından üretilirler. Pol proteini kor ve prekor proteinlerinin translasyonunda kullanılan pregenom RNA ile aynı translasyon iç başlangıcı tarafından üretilmektedir. X mRNA sadece X proteinini üretmektedir (Ergül AA., 2003; Şirin Elmi, 2007; Nurettin Tunç, 2009).

HBV genomu içindeki protein kodlayan bölgeler dışında iki direk tekrar bölgesi vardır. 10-12 nükleotid uzunluğunda olan bu yapılar DR1 ve DR2 olarak adlandırılır ve replikasyonda önemli rol oynarlar. Bu direk tekrar dizilerinin birbirine tutunması ile viral DNA'nın yapısal bütünlüğü sağlamaktadır. DNA

üzerindeki EcoRI restriksiyon kesim bölgesi genomun numaralandırılmasında ilk referans bölge kabul edilmektedir. Kor geninin 5'ucunda bulunan TATA benzeri diziler ise viral RNA polimerazın, promoter bölgesine bağlanması için sinyal görevi görmektedir. Genomun en uzun geni olan P geni; X ve C genleri ile kısmen, S geni ile tamamen çakışmıştır. Sonuç olarak uzun sarmal 1,5 defa okunmaktadır. Bu özellik nedeniyle HBV, bilinen hayvan virüsleri içinde en küçük genomik yapıya sahip olmakla birlikte, kendini kodlama kapasitesi en fazla olan virüstür (Ela Kesen, 2006).



Şekil. 2.3.1. HBV virionunun şematik yapısı (Ali Aşan, 2007)



Şekil 2.3.2. HBV genomunun organizasyonu (Mahoney FJ., 1999)



Şekil 2.3.3. Dane partikülü, sferik ve filamentöz partiküllerin elektron mikroskobu görünümü (Ali asan, 2007)

HBV yüksek derecede tür özgüllüğü gösterir ve sadece insanları ve ileri primatları enfekte eder. *Hepadnaviridae* ailesinin duck HBV, woodchuck (dağ sıçanı) hepatiti virüsü ve ground squirrel (tarla sincabı) hepatit visusu ve diğerleri de türe özgüldü (Chemin I., Zoulim F., 2009).

2.4. HBV Genotip/ Subgenotip ve Subtipleri

Hepatit B virüsü, RT enziminin hata düzeltme (proofreading) aktivitesinden yoksun olması ve yüksek replikasyon kapasitesi nedeniyle ($>10^{12}$ virion/gün) viral replikasyon sırasında yüksek nükleotid değişim sıklığına (10^5 substitution/baz/ siklus) sahiptir (Schaefer S. 2005; Locarnini SA., 2002). Bu nedenle HBV, genotip ve subgenotip seviyesinde genomik ve coğrafik farklılıklar göstermektedir. Filogenetik analiz tekniği kullanılarak elde edilen dizilere göre HBV, tüm genomda genotipler için $>7.5\%$, subgenotipler için $>4\%$ nükleotid dizi farklılığı göstermektedir. Bu dizi farklılıkları dikkate alınarak yapılan analizlerde günümüze kadar HBV'nin kesinleşmiş A – H'ye kadar 8 farklı genotipi ve 25 farklı subgenotipi tanımlanmıştır (Emektaş G. ve diğerleri, 2012; Okamoto H. ve diğerleri, 1988; Kurbanov H. ve diğerleri, 2010).

Subtip ve serotip terimleri, HBsAg antijenik determinantlarının ve HBV genotip subgruplarının her ikisini de tarif etmek için kullanılmaktadır. Karışıklığı önlemek ve uygunluk sağlamak için “serotip” veya “serolojik subtip” terimi HBsAg antijenik determinantlarını tanımlamak için kullanılmaktadır. Tüm HBV kökenlerinde ortak olan a determinantından başka iki determinant daha tanımlanmıştır. Biri 122. aa'de olup “d” yada “y” özgülüğünde, diğeri ise 160. aa'de ve “w” ya da “r” özgülüğündedir. Bu üç determinantın kombinasyonları ile 4 ana serotip olmaktadır. Bunlar; *adw*, *ayw*, *adr* ve *ayr*'dir. Bu 4 serotipin klinik önemi henüz belirgin değildir. Ancak ‘a’ determinantı ‘immune dominant’ her 4 subtip için de ortaktır ve hepatit B viral enfeksiyonunda (anti- HBsAg) antikor nötrleştirici için targettir. Yakın geçmişte, ‘a’ determinantında gerçekleşen mutasyonların serumda bulunan koruyucu antikorlara rağmen tekrarlayan HBV enfeksiyonlarından sorumlu oldukları gösterilmiştir (Özdemir D. ve diğerleri, 2002).

A determinantının ilave başka subdeterminantların tanımlanması ile serolojik serotiplerinin sayısı 9'a çıkmıştır. Bunlar *ayw1*, *ayw2*, *ayw3*, *ayw4*, *ayr*, *adw2*, *adwq*, *adr*, *adrq* serotipleridir. HBV'nin serotipleri monoklonal antikorlarla serolojik olarak ayırt edilebilir. Bu farklı serotiplerin coğrafi dağılımı farklıdır.

Kuzeybatı Avrupa, Kuzey Amerika ve Güneydoğu Asya’da en sık *adw* serotipi görülmektedir. Akdeniz bölgesi ve Batı Afrika’da ise *ayw* serotip sık görülür. *Adr* serotipi Polinezya ve Güneydoğu Asya’da, *ayr* serotipi ise Vietnam’da saptanmış daha nadir serotiplerdir. Serotiplerin saptanması enfeksiyon kaynağının belirlenmesi açısından önem taşır. Tüm HBV serotiplerinde ortak olan immüno-dominant adeterminantı nedeniyle, farklı serotiplerle yeniden enfeksiyon nadirdir. Genotipler, serotiplere göre, HBV coğrafik dağılımı ile daha fazla uyum göstermektedir ve bu yüzden moleküler epidemiyolojik çalışmalarda serotiplerden daha kullanışlıdır (Öznur Öztürk, 2010).

Subtip *adw*’ye özgü diziler genotip A, B, C ve F’de; subtip *ayw*’ ye özgü diziler genotip A, B, C, D ve E’de bulunmaktadır. Genotip C altında ‘r’ subtipik determinantlar bulunmaktadır. Aynı subtipten ait iki HBV genomu arasındaki nükleozid farklılık, iki farklı subtipten ait HBV genomundaki nükleozid farklılığından azdır. Aynı genom içindeki subtipler arasındaki fark %1-2.7 arasında değişmektedir. Farklı genotiplerdeki subtipler arasındaki en küçük S geni % 4.1’dir. Bu fark %10’ a kadar çıkabilmektedir. Tek istisna olan subtip *ayr* subtiptir. *adr*’den %2.2 oranında farklılık göstermektedir (Davut Özdemir, 2001).

HBV genotipleri, coğrafik bölgelere göre farklı dağılımlar göstermektedir. Kuzeybatı Avrupa, Kuzey Amerika ve Afrika’da genotip A baskın olarak görülürken (genotip A’nın; Sahra Altı Afrikada yaygın olan A1, Kuzey Avrupa’da yaygın olan A2 ve Batı Afrika’ya özgü A3 olmak üzere 3 sub-genotipi bulunmaktadır), Doğu Asya ve Uzak Doğu ülkelerinde genotip B ve C (Japonya’da B1, Doğu Asya’da B2 - B5, Kuzey Kutup bölgesinde B6; Çin, Kore, Güneydoğu Asya ve birçok Güney Pasifik ada ülkelerinde C3 bulunmaktadır) daha baskındır. Genotip D (D1- D7 olarak subtiplendirilmektedir) tüm dünya genelinde yaygın olmakla birlikte Akdeniz bölgesi, Yakın Doğu ve Orta Doğu ülkeleri ile Güney Asya’da daha sık görülmektedir. Batı Afrika’da genotip E; Orta Amerika bölgesinde genotip F (F1-F4 olarak subtiplendirilmektedir) daha baskındır (Pourkarim MR., 2014). Genotip G’nin orjini tam olarak bilinmemekle

birlikte Türkiye, Amerika, Fransa, Kanada, Almanya, Vietnam, Taylan ve Japonya'dan, Genotip H ise Türkiye, Alaska, Orta ve Güney Amerika, aynı zamanda Polinezya'dan bildirilmiştir (Sayan M. ve diğerleri, 2012; Ural O. ve diğerleri, 2013; Lindh M. ve diğerleri, 2005; Stuyner L. ve diğerleri, 2000; Silva AC. ve diğerleri, 2010). Yapılan çalışmalara göre Güneydoğu ve Doğu Anadolu bölgelerinde daha yüksek olmakla birlikte Türkiye, %2.5 - %9.1 arasındaki HBsAg pozitifliğine göre orta/yüksek endemisiteli ülkeler arasında yer almaktadır (Van Damme P., 2010). Ayrıca, genotip A, E, G ve H ile enfekte olgular bildirilse de Türkiye'de hepatit B'li kişilerde genotip D'nin baskın olduğu gösterilmiştir (Sayan M. ve diğerleri, 2010; Ural O. ve diğerleri, 2013; Sayan M. ve diğerleri, 2014; Sayan M. ve diğerleri, 2010; Sayan M. ve diğerleri, 2010; Kalaycı R. ve diğerleri, 2010). Genotiplerin coğrafik dağılımı Tablo 2.4.1'de verilmektedir.

Tablo 2.4.1. Genotiplerin coğrafik dağılımı. (Hande Selamoglu,2009)

Genotip	Subgenotip	Cografik Dağılım
A	A1	SahraAltı Afrika
	A2	Kuzey Avrupa
	A3	Batı Afrika
B	B1	Japonya
	B2-B5	Tayvan, Çin,Endenoya, Vietnam,Filipinler
	B6	Alaska, Kuzey Kanada, Greenland
C	C1-C3	Tayvan, Çin, Japonya, Kore, Güneydoğu Asya
		Avusturalya
	C4	Filipinler, Vietnam
	C5	
D	D1-D5	Afrika, Avrupa, Mediterrenan basin
E		Afrika
F		Orta ve Güney Amerika
G		Fransa, Almanya, Amerika
H		Orta Amerika
I		Vietnam
J		Japonya

Yapılan çalışmalarda, farklı genotiplerin klinik ve tedavi üzerinde önemli etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Genotip B ve C'nin kronik hepatit B ve HSK oluşturma riskinin diğer genotiplere oranla fazla olduğu gösterilmiştir (Mısıtık R. 2005). Genotip C'nin siroz ile sonuçlanan daha ciddi kronik karaciğer tahribatlarıyla ilişki olduğu gösterilirken, genotip B'nin gençlerdeki hepatokarsinoma ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir. Kronik aktif hepatitlerde genotip A

baskın olarak saptanırken, akut hepatitlerde genotip D daha yüksek prevalanslarda saptanmıştır (Külah C, Çırak Yalınay M, 2010).

Kuzey Kıbrıs'ta HBV genotip/subgenotip dağılımı hakkında elimizde hiç bir veri bulunmamaktadır. Bu çalışmanın amacı, Kuzey Kıbrıs'ta HBV ile enfekte bireylerde, filogenetik bir yaklaşımla HBV'nin moleküler epidemiyolojisini belirlemek ve doğal gelişen polimeraz (*pol*) ve yüzey S geni varyantlarını tayin etmektir.

2.5. Epidemiyoloji

2.5.1. Bulaş Yolları

HBV enfekte vücut sıvıları ile insandan insana bulaşmaktadır. Kan en önemli bulaş yoludur fakat semen ve tükürük gibi diğer vücut sıvıları da bulaşmada etkilidir (Hou J., Li Z., Gu F., 2005). Hepatit B'nin 4 ana bulaş yolu vardır. Bunlar; parenteral (perkütan), perinatal (enfekte anneden yenidoğana bulaş (vertikal)), cinsel (semen ve vajinal sekresyonlar) ve horizontaldır. HBV enfeksiyonlarının %30'a yakınının ise bulaş yolu bilinmemektedir (Curry PM, Chopra S., 2005). HBV'nin damlacık yolu ve fekal yolla bulaştığına dair henüz bilgi bulunmamaktadır. HBV kontamine gıda, su, böcek veya diğer vektörler aracılığı ile bulaşmamaktadır (Hou J., Li Z., 2005). HBV halk arasında sanıldığı gibi sarılmak, kucaklaşmak, öpmek, aynı çatal bıçağı kullanmak, öksürmek veya ak-sırmadan da bulaşmamaktadır (Thomas HC. ve diğerleri, 2005).

2.5.1.1. Parenteral (Perkütan) Yol

HBV enfeksiyonunda en önemli bulaş yollarından biridir. En önemli bulaş kaynağı kan ve vücut sıvılarıdır. Damar içi ilaç kullanımı, kontamine iğne yaralanmaları, kan nakli yaptıрма, hemodiyaliz, dövme yaptıрма, diş cerrahisi, akabunktur ve kulak deldirme gibi yollar bu tip bulaşın en önemli örnekleridir (Güçlü E., Geyik FM., 2012). Hemodiyaliz doktorları, diş hekimleri, hemşireler ve diğer sağlık personelleri, laboratuvar teknikerleri, damar içi ilaç kullananlar,

polisler, itfaiye elemanları, kan ve kan ile enfekte olmuş eşyalar ile yakın temasta bulunan kişiler bu tip bulaş açısından yüksek risk altındadırlar. Cinsel temas, damar içi ilaç kullanımı, akupunktur ve kan transfüzyonu ile olan enfeksiyonların kronikleşme riski düşük olup %5 olarak bildirilmiştir. Bu yollarla enfeksiyon, bağışıklık sisteminin yetersiz olduğu çocukluk ve gençlik döneminde daha sıklıkla gerçekleşmektedir (Hou J., Li Z., 2005)

2.5.1.2. Perinatal (enfekte anneden yenidoğana bulaş (vertikal))

Çoğunlukla yüksek endemisiteli bölgelerde görülmektedir. Bulaş doğum sırasında ve doğumdan sonrasında cilt sıyrıkları, mukozal penetrasyon, anne kanıyla temas-yutulması şeklinde olmaktadır. İntrauterin bulaş nadir olarak görülmektedir (%5-10) (Beasley RP, 1983). Perinatal bulaş iki açıdan önem taşımaktadır. Bunlar; önlenabilir olması (aşı ve/veya HBIG) ve kronikleşme oranının çok yüksek olmasıdır. Yapılan çalışmalarda HBeAg (+) anneden doğan çocuklarda ilk 6 ayda enfeksiyon riski %70-90, kronikleşme riski %90 olarak gösterilmiştir. Bu oran HBeAg (-) anneden doğan çocuklar için ise sırasıyla %10-40 ve %40-70 olarak verilmiştir (Badur S., 2004).

2.5.1.3. Cinsel Bulaş

Cinsel yolla bulaş dünya genelinde ve özellikle düşük endemisiteli bölgelerinde yaygın olarak görülmektedir. HBV cinsel yolla bulaşan hastalıklar arasında gösterilmektedir. Homoseksüellerin cinsel temasa bağlı olarak yüksek risk altında oldukları bilinmektedir (%70 homoseksüel erkek cinsel aktiviteden 5 yıl sonra enfekte olmaktadır) Buna rağmen heteroseksüel bulaş da giderek artmaktadır. Çoklu partner, cinsel yolla bulaşan hastalık hikayesi ve sifiliz pozitif olan kişiler HBV enfeksiyonu açısından risk altındadırlar. Cinsel partneri damar içi ilaç kullanıcısı, hayat kadınlarıyla birlikte olan kişilerde risk daha da artmaktadır (Hou J., Li Z., 2005).

2.5.1.4. Horizontal Bulaş

Orta yüksek endemisite gösteren bölgelerde çocuklar ve genç yetişkinler arasında en önemli bulaş şeklidir. Kardeşler, akrabalar, arkadaşlar arasında ve özellikle de aynı evde yaşayanlar arasında geçiş söz konusudur. Bulaşmanın mekanizması tam anlaşılmamış olmakla beraber, yakın temas, ortak bazı malzemelerin kullanılması, (tırış makinesi, jilet, havlu, diş fırçası, banyo malzemeleri vs) ile kan, tükürük ve seröz sıvıların defektli cilt veya mukozaya teması sonucu olduğu düşünülmektedir. Kalabalık yaşam şartları (yatılı okul, kışla, hapishane, yurt), kötü hijyen ve düşük sosyo-ekonomik durum HBV bulaşma oranını arttırmaktadır. Diğer önemli risk faktörleri kan ve kan ürünlerinin veya ilaçların intravenöz verilmesi, seksüel temas, enstitülerde bakım ve taşıyıcılarla temastır.

Tablo 2.5.1.1. HBV'nin bulaşma yolları. (Ayşe Şen, 2009).

<u>I. Parenteral</u>
- Kan ve kan ürünleriyle temas ve transfüzyon
- Kontamine iğne, enjektör, bistüri, sonda v.s.
- Hemodiyaliz
- Damardan uyuşturucu kullanımı
- Oral cerrahi
- Akupunktur, kulak delme, traş v.s.
<u>II. Perinatal/Vertikal</u>
<u>III. Cinsel Temas</u>
<u>IV. Horizontal</u>

2.5.2. Risk Grupları

HBV açısından risk altında olan kişi grupları; HBsAg pozitif kişilerle cinsel temasta bulunanlar, HBsAg pozitif kişilerin 1. derece akrabaları, HBsAg pozitif kişiyle aynı evde yaşayanlar, intravenöz ilaç kullanma alışkanlığı bulunan kişiler, birden çok cinsel eşi bulunan ve cinsel yolla geçen hastalık öyküsü bulu-

nanlar, homoseksüeller, hayat kadınları, hapishanelerde yaşayan kişiler, uyuşturucu bağımlıları, dövme yaptıranlar, kulak deldirenler, kronik alanin aminotransferaz (ALT) ve aspartat transaminaz (AST) yüksekliği bulunan kişiler, hepatit C virüs (HCV) ya da human immunodeficiency virüs (HIV) ile enfekte kişiler, diyaliz hastaları, tüm gebe kadınlar, sık kan ve kan ürünleri alanlar, kan ve kan ürünleri ile mesleki nedeniyle sık sık temas eden meslek sahipleri, bakım ve huzurevlerinde yaşayanlar, zeka ve gelişme geriliği olanlar ve bunlara bakım verenler, kan, plazma, sperm, organ ve doku vericileri, immün yetersizliği bulunanlar veya uzun süre immün supressif tedavi görenlerdir (Hou J, 2005; Akhan S. ve diğerleri, 2009).

Tablo 2.5.2.1. HBV enfeksiyonu bulaşma yolları ve bulaşma yollarına göre risk grupları (Ayşe Şen, 2009).

I. Perkütan (parenteral) bulaşma

- Çoğul transfüzyon yapılan hastalar ve hemodiyaliz hastaları
- Damar içi uyuşturucu bağımlıları
- Dövme yaptıranlar
- Sağlık personeli
- Cerrahlar
- Diş hekimleri
- Hemşireler
- Hastabakıcılar
- Laboratuvar teknisyenleri
- İlk yardım çalışanları

II. Cinsel temasla bulaşma

- Erkek eşcinseller
- HBV taşıyıcılarının cinsel partnerleri ve hayat kadınları
- Çok partnerli heteroseksüeller

III. Perinatal bulaşma

- HBV taşıyıcı annelerin bebekleri

IV. Horizontal bulaşma

- Kalabalık topluluklarda kötü hijyen ve düşük sosyoekonomik durumdakiler
- Mental özürlüler

2.5.3. Korunma

Diğer birçok enfeksiyon ajanı gibi, HBV enfeksiyonları da 3 bileşenden oluşmaktadır. Bunlar; enfeksiyon kaynağı, duyarlı konak ve bulaş yoludur. HBV’de en etkin kontrol, enfekte kişileri tedavi etmekten ziyade duyarlı kişileri HBV’den korumak şeklinde olmalıdır. Bu amaçla ilk olarak bulaşı engellemek ve daha sonrasında duyarlı konağı aşılama gerekmektedir (Kao H.J. 2002). HBV enfeksiyonu bulaşından korunma genel korunma önlemleri, pasif immünizasyon ve aktif immünizasyon ile gerçekleştirilmektedir.

2.5.3.1 Genel Korunma Önlemleri

HBV enfeksiyonundan korunmada öncelikle bulaş yolları iyi bilinmelidir ve önlemler bu doğrultuda alınmalıdır. Örneğin; parenteral yol ile bulaşan etken yoğun olarak kanda ancak daha az yoğunlukta diğer bütün vücut sıvılarında bulunmaktadır (idrar, ter, göz yaşı, meni, vajen salgısı, tükürük, idrar, plevral sıvı, periton sıvısı, vb.)

Tüm hastalar potansiyel HBV enfeksiyonlu kabul edilip önlemler alınmalıdır. Risk altında olan kişiler kendi emniyetleri için aşılanmalı ve koruyucu giysiler giymelidirler (lastik eldiven, göz koruyucu vb.). Tıbbi atıklar güvenli olarak yok edilmelidir. Kan ve kan ürünlerinin HBsAg yönünden taranmalı, sterilizasyon ve dezenfeksiyon kurallarına uyulmalıdır. Tüm kan, organ ve sperm vericiler HBsAg yönünden taranmalıdır. Kronikleşme açısından perinatal bulaş çok önemlidir ve anneler taranmalıdır, postnatal bağışıklama sağlanana kadar anne sütü verilmesi engellenmelidir. En önemli bulaş kaynaklarından birisi olan diş tedavisi klinikleri olup, buralara başvuran hastalar HBV açısından taranmalıdır. Klinisyenler de bu konuda daha dikkatli olmaya yönlendirilmeli ve diş hekimleri de dahil edilerek gereken eğitimle beraber tedbir almaları sağlanmalıdır. Ayrıca enjektör, jilet, akupunktur iğneleri gibi kanla temas edebilen gereçlerin kullanıldıktan sonra atılması, tıpta ve diş hekimliğinde kullanılan araç ve gereç usulüne uygun dezenfekte ve sterilize edilmesi, şüpheli cinsel ilişkilerde kondom kullanılması, sosyoekonomik, sosyokültürel yapı iyileştirilmelidir (Barçın T. 2010; Güçlü E., Geyik FM., 2012).

2.5.3.2. Pasif İmmünizasyon

Hepatit B hiperimmünglobulini (HBIG) yüksek titrede anti-HBs içermektedir ve yüksek konsantrasyonda anti-HBs içeren HBsAg pozitif bireylerin plazmasından elde edilmektedir. Pasif immunizasyonda bireyler aşılamadan hemen sonra yüksek titreli anti HBs (HBIG) içeren Ig'ler geliştirdikleri için akut ve kronik enfeksiyondan korunabilmektedirler. HBIG Cohn Oncly fraksiyonel prosedüre göre hazırlanıp yüksek anti-HBs (100.000 IU anti HBs/ml) titresine sahiptir.

HBIG hepatit B aşısı ile bazı durumlarda etkindir. Bunlar; HBsAg pozitif anneden doğan bebekler için profloksi, HBsAg pozitif kan ile perkütan veya mukus membran yoluyla bulaş ve HBsAg pozitif kişiyle cinsel temasta bulunmak. HBIG ayrıca hastaları karaciğer transplantasyonun sonrası tekrarlayan HBV enfeksiyonlarına karşı korumaktadır (Mahoney FJ., 1999).

Erişkinlere yapılacak tüm uygulamalarda 0.06 mL/kg standart dozunda, HBsAg pozitif anneden doğan bebeklere 100.000 IU, kas içi ve tercihen deltoid veya gluteal kasa uygulama yapılması önerilmektedir. Eğer HBV aşısı ile aynı anda uygulanması gerekiyorsa farklı bölgelerden yapılmalıdır. Standart dozlarda yapıldığında, HBV enfeksiyonuna karşı yaklaşık 3-6 ay koruyuculuk sağlamaktadır (Güçlü E., Geyik FM. 2012).

2.5.3.3. Aktif İmmünizasyon

Güvenilir, immülojik ve etkili hepatit B aşısı 1981'den beri Amerika'da kullanılmaktadır. Aşılar ya HBV taşıyıcılarının plazma örneklerinden elde edilen saflaştırılmış HBsAg şeklinde ya da rekombinant gen teknolojisiyle maya veya memeli hücrelerinden elde edilmeye başlanılmıştır (Mahoney FJ, 1999). Bu aşılar 22 nm büyüklüğünde olup üre, pepsin, formaldehit ve ısı ile inaktive edilmiş HBsAg parçacıklarından oluşmaktadırlar. Uzun süreden beridir güvenli şekilde ve etkinlikle kullanılıyor olsalar dahi bu aşıların bazı sakıncaları vardır. Bunlar; virüsü inaktive edebilmek için uygulanan yoğun üretim işlemleri, AIDS ve HBV gibi kan yolu ile bulaşan patojen geçişi açısından riskli, yüksek maliyet, uygun insan plazmasını bulmada güçlük ve zararsız olduğunu gösteren 6 aylık uzun bir perioda gereksinim duyma. Bu risk faktörlerinden dolayı rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak HBsAg ekspre edilmiş ve ikinci kuşak aşılar geliştirilmiştir. HBsAg peptid aşıları çeşitli hücre dizileri ile üretilmiştir. Bunlar; *Escherichia coli* (*E.coli*), *Saccromyces cerevisiae* (*S.cerevisia*), *Pasturella pastoris* (*P.pastoris*), Çin hamster yumurta hücreleri, fare hücreleri ve *Drosophila Sxhneider* 2 hücreleridir. 1990'larda üçüncü kuşak hepatit B aşıları geliştirilmiştir. Bu aşılar, küçük S ve orta Pre-S2 proteinlerini ya da her üç zarf proteinlerini (S, Pre-S2 ve büyük Pre-S1 proteinleri)'ni ekspre edebilen ve salgılayabilen,

HBV nükleik asiti verilmiş memeli hücrelerinde geliştirilmiştirler. Yeni Pre-S/S HBV aşılarının bağışıklığı yetersiz ya da geleneksel aşılarla cevap vermeyen kişilerde immunojenesiteyi artırıcı etkisi olduğu gösterilmiştir (Selamoglu H., 2009).

Aşılamada 0, 1 ve 6. aylarda uygulanan üç dozluk veya 0, 1, 2 ve 12. aylarda uygulanan dört dozluk programlar uygulanmaktadır. Çocuklara 10 µg, erişkinlere 20 µg dozlarında kas içine (deltoid) yapılması önerilmektedir. Enfeksiyona karşı serolojik korunma, anti-HBs düzeyi ≥ 10 mIU/mL olduğunda mümkündür. Üç doz aşılamadan sonra %95'in üzerinde koruyuculuk sağlanırken, bu oran çocuk ve adölesanlarda %90'in üzerine çıkmaktadır. İleri yaş, sigara kullanımı, obezite, HIV, böbrek yetmezliği, kronik karaciğer hastalığı, immünosupresif hastalıklar serokonversiyon oranını düşürmektedir (Mahoney FJ. 1999).

Aşılama sonrası rutin antikor kontrolü önerilmemektedir. Sağlık çalışanları, kronik hemodiyaliz hastaları ve immun baskın hastalar gibi bazı gruplarda antikor bakılması ve 10 mUI/ml'den daha az antikor titreleri tespit edilenlere koruyuculuk sağlanamadığı için ikinci 3 dozluk aşı yapılması önerilmektedir (Centers for Disease Control and Prevention, 2006)

Tablo 2.5.3.1.1. Hepatit B aşısı önerilen kişi ve grupları (Ayşe Şen,2009).

- Sağlık personeli
- Bazı hasta grupları ve bunlarla ilişkisi olanlar;
 - Hematoloji/Onkoloji ve hemodiyaliz ünitesi hastaları ve çalışanları
 - Sık ve/veya masif kan transfüzyonu ve pıhtılaşma faktörü alması gereken hastalar(hemofili, talasemi vb.)
 - Mental retarde kişiler ve izlendikleri ünitelerde çalışanlar ve persistan antijenemisi olan kişilerin izlendiği ünitelerde çalışanlar veya aynı evde oturanlar
- Yüksek hastalık insidansı olan toplumlar v Alaska Eskimoları,Haitili ve Hintli göçmenler,
 - HBsAg pozitif anneden doğan bebekler,
 - Askeri personel
 - Kan bankası çalışanları
 - Seksüel yaşantıları nedeniyle yüksek risk taşıyanlar
 - İntravenöz ilaç kullananlar
 - Mahkûmlar

2.5.4. Klinik ve Laboratuvar Tanı

HBV enfeksiyonu çok değişken bir klinik spektruma sahiptir. Klinik olarak akut veya fulminan hepatit, kronik veya kronik taşıyıcılık şeklinde seyredebilirken, karaciğer sirozu ve HSK'ye gidebilen hepatit tabloları da yapabilir (Külah C.,Çırak YM. 2010). Akut B hepatiti, HBV ile karşılaşmasını takiben, 6 hafta ile 6 ay arasında değişen bir inkübasyon döneminden sonra gelişmekte ve asemptomatik enfeksiyondan, fulminant hepatite kadar değişebilen klinik bir tablo olarak ortaya çıkmaktadır. Akut hepatit B'li bir hastada iyileşme 6 aydan kısa sürede gözlenmektedir. Altı ay sonunda HBsAg pozitifliği devam eden enfeksiyonların kronikleştiği kabul edilir. Kronik enfeksiyonlarda HBV DNA'nın anlamlı düzeyde ölçülebilir ($> 10^4$ kopya/ml) olması, sürekli ya da intermittan transaminaz yüksekliği, karaciğer biyopsisinde orta veya ileri düzeyde

nekroinflamatuvar aktivite ve fibrozisin gözleendiği kronik hepatit olması beklenmektedir (Yakup Ülger, 2012) Kronik HBV’li hastaların bazıları bütün yaşamları boyunca virüsü taşımalarına karşın hiçbir karaciğer fonksiyon bozukluğu yaşamazlarken, bazılarında kısa süre içerisinde karaciğer yetmezliğine kadar ilerleyebilen ciddi sonuçlar gözlenebilmektedir (Sonsuz A., 2007). HBV enfeksiyonu çocuklarda ve gençlerde yetişkinlere göre daha hafif ve asemptomatik olarak seyretmektedir. Hastalığın 4 yaşın altındaki çocuklarda %90, 30 yaşın üzerindeki yetişkinlerde ise 2/3 oranında asemptomatik olarak geçirildiği bildirilmektedir (Ela Kesen, 2006).

HBV’ye ait antijenlerin ve antikorların hasta serumunda saptanması enfeksiyonun özgül tanısı için yaygın kullanılan yöntemlerdir. HBV enfeksiyonuna farklı serolojik belirteçler (HBsAg, total anti- HBs, anti HBc Ig G, HBe Ag, anti HBe IgG), HBV DNA düzeyi, hastanın immunolojik ve nekroinflamatuvar durumunu gösteren serum ALT ve AST seviyeleri ile karaciğer biyopsisi ile tanı konulması mümkündür. (Güçlü E., Geyik FM. 2012)

Virüse ait HBsAg ve HBeAg ticari olarak bulunan birçok “enzym immunoassay” (EIA) ve “radio immunoassay” (RIA) kiti aracılığıyla saptanabilmektedir. Bu antijenlere karşı gelişen antikorlar (anti-HBc IgM, total anti-HBc, total anti HBs ve anti HBe IgG) yine ticari kitler kullanılarak tespit edilebilmektedir (Ersin Aşkar, 2006).

2.5.4.1. HBsAg

Akut HBV enfeksiyonunun inkübasyon dönemi 4-28 hafta olarak belirlenmiş fakat çoğu vakada bu aralık 60-180 gündür. Yeni enfekte olan kişilerde, HBsAg, HBV ile temastan 30-60 gün sonra serumda belirlenmektedir (Ela Kesen, 2006). HBsAg varlığı devam eden enfeksiyonu göstermektedir. Hepatitin ortaya çıkması serumda HBsAg’nin saptanmasından ortalama 4 hafta (1-7 hafta) sonradır. Hastalığa ait belirtiler ve sarılık ortaya çıktığında HBsAg hastaların %95’inde pozitif olarak saptanmaktadır. HBsAg akut ve kronik hastalıkların ayı-

rımını yapamaz, hastalık iyileşme ile sonlanırsa 4-6 ay içinde kaybolur. Akut enfeksiyonda 6 aydan daha uzun bir süre kalması, enfeksiyonun kronikleşebileceğini düşündürür. Aşılamadan sonra çocuklarda geçici HBsAg pozitifliği saptanabilir (Ersin Aşkar, 2006).

2.5.4.2. HBe Ag ve Anti HBe

HBeAg hastalığın başlangıcında bulunur ve viral replikasyonun aktif olduğu dönemde pozitif olarak saptanmaktadır. Anti-HBe kanda HBeAg kaybolduğunda saptanmaya başlamaktadır.

2.5.4.3. Anti HBc Ig M

Anti-HBc Ig M, akut ve yeni geçirilmiş enfeksiyonda pozitifdir ve bazen tek başına pozitifliği akut hepatit B enfeksiyonu tanısını koydurmaya yeterli olabilir. Anti-HBc Ig M hastalıktan 6-24 ay sonra kandan kaybolur (Sümbül M, 1997).

2.5.4.4. Anti HBc IgG ve total anti-HBc

Anti-HBc Ig G pozitifliği kişinin herhangi bir zamanda enfeksiyonu geçirdiğinin göstermektedir.

2.5.4.5. Anti-HBs

Anti-HBs pozitifliği kişinin aşıyla ya da doğal yolla enfeksiyonu geçirerek bağışıklık kazandığını göstermektedir (Genç Ö. 2014).

2.5.4.6. HBV DNA

HBV-DNA viral replikasyonun en önemli göstergesidir. HBsAg varlığında serumda HBV- DNA tespiti virüs miktarını ortaya koyar ve serum transaminaz düzeyleri ile orantılıdır (Ela Kesen, 2006). HBV DNA'nın belirlen-

mesinde en etkili yöntem polimerase chain reaction (PCR) yöntemidir. Bu yöntemle çok küçük miktarda HBV DNA saptanabilmektedir.

Tablo 2.5.4.1. HBV'nin Antijen ve Antikolarının Adlandırılması
(Sümbül M. 1997).

HBV	Yüzey virion (Dane partikülleri)
HBsAg	Yüzey antijeni
HBcAg	Core antijen (karaciğerde saptanır)
HBeAg	E antijeni (infektiviteyi gösterir)
Anti-HBs	HBsAg' e karşı antikor oluşumunu, immunitiyi gösterir
Anti HBc (total)	HBcAg' e karşı antikor oluşumunu gösterir. Geçirilmiş enfeksiyonu gösterir
Anti- HBe	HBeAg'e karşı antikor oluşumunu gösterir. Düşük infektiviteyi gösterir

Tablo 2.5.4.2. Serolojik kan testlerinin muhtemel sonuçları ve yorumlar
(Ayşe Şen, 2009).

Sonuç	HBsAg	Anti HBs	Anti HBc	HBeAg	Anti HBe
1	+	-	-	-	-
2	+	-	+	+	-
3	+	-	+	-	+
4	+	-	+	-	-
5	-	+	+	-	+/-
6	-	+	+	-	
7	-	-	-	-	-

1. Çok erken evre akut HBV enfeksiyonu veya kronik HBV taşıyıcılığı (anti-HBc ölçülemeyecek kadar düşük seviyelerde).
2. Akut HBV enfeksiyonu veya kronik HBV taşıyıcılığı (oldukça enfeksiyöz).
3. Akut HBV enfeksiyonu (geç evre) veya kronik HBV enfeksiyonu (düşük enfektivite)
4. Akut HBV enfeksiyonu veya kronik HBV enfeksiyonu (bazen HBe Ag/Anti-HBe’de yükselme görülmez).
5. Pencere dönemi veya geçirilmiş HBV enfeksiyonu (anti-HBs ölçülemeyecek kadar düşük seviyelerde).
6. Akut enfeksiyon sonrası koruyuculuk veya enfeksiyon geçmekte.
7. Akut enfeksiyon sonrası koruyuculuk (anti-HBc ölçülemeyecek kadar düşük seviyelerde) veya hepatit sonrası aşılanmış hasta.

2.5.5. Dünyada HBV

HBV enfeksiyonu'nun dünyadaki dağılımı coğrafik bölgelere göre düşük, orta ve yüksek endemisite bölgelerine ayrılmıştır. Bölgedeki HBsAg ve anti-HBs pozitifliği, kişilerin yaşı ve virüsün en sık hangi yolla bulaştığına bağlı olarak bu ayırım yapılmıştır. Dünya genelinde HBsAg pozitifliği %0,1-20 arasında verilmektedir (Nurettin Tunç, 2009).

Yüksek endemisite bölgelerinde (Sahra altı Afrika, Güneydoğu Asya, Çin, Alaska) ise HBsAg pozitiflik prevalansı % 5-20 oranındadır ve yetişkinlerin % 70'ten fazlası enfeksiyona karşı bağışıklıdır. Maternal, perinatal ve horizontal yollar ana bulaş yollarıdır (Nurettin Tunç, 2009).

Türkiye'nin de içinde bulunduğu Ortadoğu, Güney ve Doğu Avrupa, Güney ve Orta Amerika, Orta Asya ülkeleri ile Japonya orta endemisite bölgeleridir. Bu bölgelerde HBsAg taşıyıcılık oranı %2-10 arasında değişmektedir. Enfeksiyon çoğunlukla çocukluk, ergenlik ve genç erişkinlik dönemlerinde alınmakta olup başlıca bulaş yolu horizontaldir (Akçam Z.F., 2003). KHBV enfeksiyon'lu olan hastalarda Türkiye'de baskın genotip genotip D olarak gösterilmiştir (Kalaycı R., Altındış M. ve diğerleri, 2010; Özdemir D., Balık İ. 2002).

Düşük endemisite bölgelerinde (Amerika Birleşik Devletleri (ABD), Kanada, Batı Avrupa, Avustralya, Yeni Zelanda) HBsAg pozitif olanların prevalansı % 0,1-2'dir. Enfeksiyon genelde adolesan ve yetişkinlerde görülür ve cinsel temas (%35) ve perkütanöz temas en önemli bulaş yoludur. Vakaların 2/3'ü 15-29 yaşlar arasındadır. Erişkinler açısından enfeksiyonla karşılaşma oranı da %20'yi aşmamaktadır. Genel popülasyonda, HBV enfeksiyon insidansı düşük iken, homoseksüeller, çok partnerli heteroseksüeller ve intravenöz uyuşturucu bağımlıları gibi yüksek riskli gruplarda ve bazı etnik gruplarda (zenciler, Eskimolar, Yeni Zelanda maorileri, Avusturya yerlileri gibi) enfeksiyon endemiktir (Ayşe Şen, 2009).

2.6. Tedavi

Akut HBV enfeksiyonu için spesifik bir tedavi şekli bulunmamaktadır. Kusma ve ishale kaybedilen sıvı kaybını gidermek ve dengeli beslenmeyi dengede tutarak hastanın konforunu sağlamak hedeflenmektedir. Kronik HBV enfeksiyonları ise antiviral ilaçlarla tedavi edilebilmektedir. Kronik HBV enfeksiyonunda tam iyileşme, HBV'nin eradikasyonu ve HBsAg serokonversiyonu nadir görülen bir durumdur. KHB'nin güncel tedavi yaklaşımlarının amacı arzu edilmeyen komplikasyonların (siroz, son dönem karaciğer hastalığı, KSH) gelişimini engellemektir (Lozano R. ve diğerleri, 2012).

Kronik hepatit B hastalığının tedavisinde pegile interferonların yanı sıra lamivudin dışında adefovir, entekavir, tenofovir ve telbivudin gibi yeni oral nükleozid/nükleotid analoglarının kullanılmaya başlanmasıyla kompanse ve dekompanse siroz, HSK kanser gelişimi, akut alevlenmeler gibi korkulan birçok komplikasyona karşı önemli aşamalar kaydedilmektedir. Böylelikle pegile interferon kontrindike olan ya da tolere edemeyen hastalar için de tedavi alternatifleri ortaya çıkmıştır (Akhan S. ve diğerleri, 2014).

İnterferon (IFN) ile sağlanan HBeAg ve HBV DNA yanıtları nükleotit/nükleozid analogları ile sağlanandan daha kalıcı olmakla birlikte oran oldukça düşüktür. Antiviral tedavi ile viral klirens sağlamak güçtür. Bunda replikatif araçların kovalent bağlı çembersel DNA'nın (covalently closed circular-cccDNA) rolü büyüktür. Konak genomu için bir havuz oluşturlar ve re-enfeksiyon olmadan replikasyonu yeniden sağlarlar. Bu enfektif araçların eradikasyonu çok zordur. Antiviral tedavi ile sağlanan viral yükte azalma T hücre yanıtında belli ölçüde düzelemeye yol açsa da viral eradikasyon sağlamaya yetmez.

2.6.1. Kronik Hepatit B Tedavisinde Kullanılan İlaçlar

KBH tedavisinde kullanılan iki grup ilaç vardır. Bunlar; interferonlar (IFN alfa 2a, IFN alfa 2b, PEG-IFN alfa 2a, PEG-IFN alfa 2b) ve NA'dır. Nükleoz(t)id analogları da 3 alt gruba ayrılırlar. L-nükleozidler (lamivudine (LAM), telbivudine (LdT), ve emtricitabine), deoxyguanine analogları (entecavir (ETV)) ve asiklik nükleozis fosfonat (adefovir (ADV) ve tenofovir (TDF)). LAM, LdT, ETV, ADV, ve TDF Avrupa, Amerika ile birçok Asya ve Latin Amerika ülkelerinde HBV tedavisinde kullanılmak onaylanmıştır (Sayan M. ve diğerleri, 2010). Yüksek etkinlik, iyi tolere edilebilirlik ve düşük direnç oranları nedeniyle Peg-IFN-alfa-2a/2b, entekavir ve tenofovirdir tedavide ilk tercih edilecek ilaçlardır (Tunga Barçın, 2010).

2.6.1.1. İnterferon –Alfa (IFN-alfa)

Antiviral, antiproliferatif ve immünmodülatör etkilidir. Konağın hücrel immün yanıtını güçlendirir, viral DNA sentezini inhibe eder ve antiviral enzimleri aktive eder. HBV ile enfekte hepatositlere karşı hücrel immün yanıtı Klas I histokompatibilite antijenlerinin ekspresyonunu artırarak ve yardımcı T lenfositler ile doğal öldürücü lenfositleri uyarak gerçekleştirir. İnterferon tedavisinde tedavi süresi belirlidir ve dirençli mutantların gelişmesi güçtür. Tedavide kalıcı yanıtın daha uzun süreli olması interferon tedavisinin avantajları arasındadır. Ancak IFN'ların önemli yan etkileri bulunmaktadır ki bu da tedavinin bırakılmasında etkilidir. Dekompanse karaciğer hastalığı olanlarda kullanılmaz. Tedavi süresinin belirli olmasını isteyen, genç ve gebe kalmayı planlayan, viral yükü düşük, transaminazları yüksek hastalarda ise iyi bir tedavi seçeneğidir. Standart interferon yerini yarılanma ömrü daha uzun olan pegile interferona (PEG-IFN) bırakmıştır. PEG-IFN'ler; interferon molekülüne polietilen glikol eklenerek molekülün yarı ömrü uzatıldı ve daha uzun süreli etkin hale getirildiler (Yakup Ülger, 2012). İnterferonlara göre hem daha etkili hem de uygulama kolaylığı nedeniyle PEG-IFN'ler günümüzde tercih edilmektedirler. PEG-IFN'ler HBeAg pozitif hastalarda 6 ay, negatif hastalarda ise 12 ay olarak kullanılmaktadırlar. Direkt antiviral etkinlik ve immün sistem üzerinde etkili olması nedeniyle,

antiviral tedavilere göre daha yüksek oranda HBeAg kaybı ve serokonversiyonu ile HBsAg kaybı olmaktadır. Direnç gelişimi ise olmamaktadır. PEG-IFN'lerin dezavantajları ise; antiviral tedavilere göre HBV-DNA'yı daha düşük oranda baskılaması, subkutan enjeksiyon sıkıntısının ve interferon kullanıma bağlı görülen yan etkilerin oluşması şeklinde sıralanabilir (Tansu Yamazhan, 2011). PEG-IFN'ların alfa 2a ve 2b olmak üzere iki tipi vardır.

Standart IFN ve PEG-IFN tedavilerinin yan etkileri benzerdir. İnfluenza benzeri hastalık bulguları, ateş, titreme, baş ağrısı, halsizlik, kas ağrıları, enjeksiyon yerinde reaksiyon, anksiyete, depresyon, intihar teşebbüsü, saç dökülmesi, kilo kaybı, iştahsızlık en sık rastlanan yan etkilerdir. Ayrıca otoantikorların gelişimine de neden olabilir. IFN'ler miyelosüpresiftir, belirgin nötropeni ($<1000/\text{mm}^3$ ve trombositopeni ($<50.000/\text{mm}^3$ nadirdir. Özellikle sirotik zeminde hepatik alevlenme ve dekompanseasyona neden olabilir.

2.6.1.2. Nükleozid Analogları

NA'ları selüler DNA polimerazlara bağlanmak için doğal substratlar ile yarışan bileşiklerdirler. NA'larının yeni yapılmakta olan DNA'ya bağlanmaları sonucunda DNA zincir sentezi durur ve viral replikasyonu önlenir. Nükleozid analoglarının çoğu sitoplazmada bulunan enzimler tarafından nükleozid 5'-trifosfatlara fosforillenir; ardından viral polimerazlar ile etkileşir. Kronik hepatit B tedavisinde ilk denenen DNA polimeraz inhibitörleri adenin arabinosid ve aköz monofosfat türevidir. Her ikisinin de sınırlı etkileri ve nöromusküler toksisiteleri nedeniyle tedavide fazla kullanılmamışlardır. FDA tarafından kronik hepatit B tedavisinde onaylanan 3 NA'u bulunmaktadır. Bunlar; 1998'de onaylanan lamivudin, 2002'de onaylanan adefovir dipivoksil ve Mart 2005'te onaylanan entekavir'dir. Bu ajanlar güvenilir ve oral olarak kullanılabilirler. Tedavi kesildikten sonra hastaların az bir kısmında kalıcı cevap oluşmaktadır. Bu nedenle hastaların büyük bir bölümünde uzun süre kullanılmaktadırlar. Uzun süreli kullanım ise ilaca dirençli HBV mutantlarında artışa ve ilacın etkinliğinde düşüşlere neden olmaktadır (Muharrem Doğan, 2007) Lamivudine, adefovir,

entekavir, telvubidine, tenofovir HBV replikasyonunu baskılamada kullanılan antiviral ilaçlardır (Tunga Barçın, 2010).

2.6.1.2.1. Lamivudine;

1998 yılında kronik hepatit B tedavisinde ruhsat alarak kullanıma giren Lamivudine ilk L-nükleozit analogudur. Bir siklik nükleozit analogu olan lamivudin, intraselüler hepatosit kinazlar tarafından fosforile edilerek aktive metaboliti trifosfata dönüşür. Bu form, HBV polimerazın doğal substratı olan nükleotit trifosfatla yarışmaya girerek polimeraz enzimini bloke eder ve viral replikasyonu engeller. Böylece viral replikasyon durmaktadır. Lamivudinin HBeAg'i pozitif ve negatif kronik HBV infeksiyonlarında, kompanze ya da dekompanze sirozlu hastalarda ve çocuklardaki kronik HBV infeksiyonlarının tedavisinde etkili olduğu gösterilmiştir. Bu ilaca karşı zaman içerisinde direnç gelişmektedir. Lamivudin kullanan hastalarda zaman içinde gelişen direnç, kronik hepatit B tedavisinin en temel konularından birisini oluşturmaktadır. Polimeraz geninin RT proteini üzerindeki C ve B bölgelerindeki mutasyonlar lamivudin direncinden sorumlu temel mutasyonlardır. Lamivudine direnci ile ilgili risk faktörleri arasında; tedavi süresinin uzunluğu, tedavi öncesi yüksek HBV DNA yer almaktadır. Genotipik direnç, bir yıldır lamivudin alan hastalarda % 14-32 arasında görülmektedir ve tedavinin 5. yılında % 50-60'lara yükselmektedir (Yamazhan T., 2011).

2.6.1.2.2. Adefovir;

Revers transkriptaz ve DNA polimerazı inhibe ederek HBV DNA zincirinin sonlanmasına neden olur. Adefovir direnç mutasyonları DNA polimerazın D bölgesinde bulunan rtN236T ile B bölgesinde bulunan rtA181V/T gen bölgelerinden kaynaklanmaktadır. Suboptimal viral supresyon ile lamivudine direnci Adefovir direnci açısından risk faktörleridir (Yakup Ülger, 2012).

2.6.1.2.3. Entekavir;

2-deoksiguanozinin bir karbosiklik analogudur ve konak hücre selüler kinazları tarafından fosforillenerek aktif form olan entekavir trifosfat formuna dönüşür. HBV replikasyonunu 3 ayrı basamakta inhibe etmektedir. Bunlar; HBV DNA polimeraz primerlerinin oluşumunun inhibisyonu, pregenomik RNA'dan HBV DNA'nın negatif zincirinin reverz transkripsiyonu ve HBV DNA pozitif zincirinin sentezinin inhibisyonudur. Entekavir direncinin gelişmesi için lamivudine direnç mutasyonlarının yanında (rtN204V, rtL180M) HBV polimerazda ek mutasyonların (rtI169T, rtT84S/A/I/LG/C/M, rtS202G/C/I, rtM205I/V) da olması gerekmektedir (Yakup Ülger, 2012).

2.6.1.2.4. Tenofovir Disoproxil Fumarat;

Bir asiklik nükleotit analogudur. Tenofovir ile ilgili klinik deneyimler HIV/HBV koenfekte hastalar ile lamivudin dirençli HBV hastalarındadır. HBV/HIV koenfekte iki hastada DNA polimerazın B domaininde rtA194T mutasyonu ile oluşan tenofovir direnci saptanmıştır. Ancak bu mutasyonun tenofovirin etkinliğini azaltıcı yönde bir etkisinin olup olmadığı net olarak belirlenmemiştir. Lamivudin dirençli mutantların (rtM204I/V, rtL180M ve rtL173M) tenofovire duyarlı oldukları bilinmektedir. Adefovir direncinden sorumlu mutasyonlardan ise rtA181V/T direncinden tenofovir etkilenmezken, rtN236T direnci varlığında ise tenofovire duyarlılık azalması bildirilmektedir. Klinik olarak tenofovir direncinden bahsedilmemektedir (Yakup Ülger, 2012).

Tablo 2.6.1.1. Dünya’da kronik HBV infeksiyonlarının tedavisinde onay alan ve alma aşamasında olan ilaçlar (Yamazhan T. 2011).

Onay almış ilaçlar	Onay alma aşamasındaki ilaçlar
İnterferon-alfa	Emtristabin
Pegile interferon-alfa	Klevudin
Lamivudin	Valtorskabin
Adefovir	Pradefovır
Entekavir	
Tenofovir	
Telbivudin	
Timozin-alfa*	

* Doğu-Güney Asya ülkeleri.

3. HBV Mutantları ve Mutasyonların Klinik Önemi

HBV suşlarında görülen genetik varyasyonlar hastalığın epidemiyoloji ve seyrinin yanı sıra aşı ile korunma olgusunu da önemli oranda etkilemektedir. Özellikle RNA virüsleri ve retrovirüslerde, viral genotip varlığı ve aynı konakta çeşitli varyantların bir arada bulunabileceği gösterilmiştir. Bu heterojenite, RNA replikasyonu ve revers transkripsiyon esnasında, olması gerekenden farklı bir nükleotidin devreye girmesinden kaynaklanır. Replikasyon aşamasında, pregenomik RNA ara kademesini kullanması nedeniyle, diğer DNA virüslerine oranla, HBV’de daha fazla mutasyona rastlanması doğaldır. Çeşitli nedenlere bağlı olarak ortaya çıkan nükleotid farklılıkları, HBV suşları arasında %12 oranında görülmektedir. Hepatit B virüsü (HBV), yüksek replikasyon kapasitesi ($>10^{12}$ virion/gün) ve ters transkripsiyon işleminde hata düzeltmemesi özellikle-

rinden dolayı yüksek mutasyon sıklığına sahiptir (10^{-5} substitusyon/baz/siklus). Bu, HBV genomundaki her bir nükleotidin gün içinde değişebileceği ve tedavi öncesinde NA direnci ile ilişkili mutasyonların meydana gelebileceği anlamına gelebilir. Kronik hepatit B'nin NA ile uzun süreli tedavisinde karşılaşılan en önemli sorun, kullanılan antiviral ajana dirençten sorumlu mutasyonların gelişmesidir. Primer ya da kompensatuvar (replikasyon kapasitesini onarıcı/viral yükü artırıcı) nitelikte olabilen mutasyonlar HBV DNA yükünde artışa ve tedavide başarısızlığa yol açabilmektedir. Öte yandan, HBV'nin genom organizasyonunda polimeraz (*pol*) ve yüzey (S) genleri üst üste çakışır pozisyonundadır ve bu nedenle NA ilaç direnci mutasyonları, hepatit B yüzey antijeni (HBsAg) yapısında aminoasit değişikliklerine neden olabilmektedir. Son yıllarda HBV *pol/S* geni çakışmasına bağlı olarak "ilaca bağlı gelişen potansiyel aşı kaçacağı mutasyonu" (ADAPVEM; Antiviral Drug-Associated Potential Vaccine-Escape Mutant) kavramı kullanılmaya başlanmıştır (Sayan M., Buğdacı MS., 2013).

HBV suşlarında görülen belli başlı mutasyonlar şunlardır:

3.1. Bazal kor promoter/prekor ve kor bölge mutasyonları

Düşük miktarda ya da hiç olmayan HBeAg ekspresyonu ile ilişkilendirilen 2 önemli mutasyon tanımlanmıştır. Bunlardan ilki, prekor bölgesinde 1896. nükleotidde triptofan kodlayan 28. kodon olan TGG kodonunda sondaki guaninin adenine değişimi ile TGA stop kodonunun oluşmasıdır. Bu stop kodonu HBeAg ekspresyonunu durdurmaktadır. Buna rağmen HBV kor antijen üretimi ve HBV replikasyonu devam etmektedir. 1896. nükleotidle aynı bölgede 1858. pozisyonunda bulunan nükleotidin baz çifti oluşturdıkları, bu yapının da virüsün replikasyonunda görev aldığı bilinmektedir. HBV'nun B, D, E, G ve bazı C genotiplerinde 1858. nükleotid timidin şeklindedir ve mutasyon sonucu oluşan stop kodonu A-T baz çifti oluşturarak fonksiyonel sekonder yapıyı stabilize etmektedir. A, F ve bazı C genotiplerinde ise bu pozisyonunda timidin yerine sitozin bulunmakta bu nedenle prekor stop kodonu mutasyonu bu genotiplerde nadiren izlenmektedir (Muharrem Doğan, 2007).

Prekor mutant HBV en çok Akdeniz Avrupası ve Asya'da bulunmaktadır. Prevelansı tam belirgin olmamasına rağmen Asya ve Akdeniz Avrupası'nda % 40-80 arasında olduğu tahmin edilmekte ve genotip A bölgelerinden daha az rapor edilmektedir (Muharrem Doğan, 2007).

İkinci mutasyon tipi de bazal kor promoter bölgesini etkilemekte ve prekor ve kor RNA'larının transkripsiyonunda azalma şeklinde ortaya çıkmaktadır. A1762T ve G1764A şeklinde oluşan bu mutasyonlar ikisi birlikte olduğunda HBe antijeni sentezinde azalmaya ve viral yükte artışa neden olmaktadır. İlk mutasyona göre bu mutasyon tipi genotip A ile enfekte kişilerde daha yaygın olarak görülmektedir. Bazal kor promoter bölgesinde oluşan mutasyonlar karaciğere özgül transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasının azalmasına ve buna bağlı olarak daha az prekor ve kor transkriptinin ve kor proteininin oluşmasına neden olurlar. Ancak pregenomik RNA transkripsiyonunu ya da polimeraz/kor proteinlerinin translasyonunu etkilemezler. Kor geninde izlenen mutasyonlar ve prekor stop kodonu mutasyonlarının varlığı, HBe antijeni sentezi ve karaciğer hastalığının aktivitesi ile ilişkilidir (Muhareem Doğan, 2007).

3.2. X bölgesi mutasyonları

X proteininin sentezi ve özellikleri, bazal kor promoter bölge mutasyonlarından etkilenmektedir. Bu bölge mutasyonları x geninde de değişikliklere neden olmakta ve buna bağlı HBx antijeni transaktivasyon aktivitesi kazanamamaktadır (Nurettin Tunç, 2009).

3.3. Zarf bölge mutasyonları

Pre-S bölgesi HBV'nin en yüksek heterojenite gösteren bölgesidir. Pre-S2 proteinlerini sentezleyemeyen virüsler özellikle asemptomatik taşıyıcılarda görülmektedir. Pre-S2, pol (polimeraz) proteini bağlayıcı bölgesiyle çakışmakta bu nedenle pre-S2 bölge mutasyonlarında polimeraz enzim aktivitesinde önemli değişikliklere sebep olmaktadır (Nurettin Tunç, 2009).

Günümüzde uygulanan pek çok HBV aşısı HBs antijeni taşımakta ve yüzey antijeni yapısında yerleşen majör hidrofobik bölgeye karşı immün yanıt oluşumuna neden olarak koruyucu bağışıklık oluşturmaktadır. Bu bölge mutasyonları aşı başarısızlığına neden olmaktadır (Nurettin Tunç, 2009).

3.4. Polimeraz bölge mutasyonları

Nükleotid/nukleozit analoglarının KHB tedavisinde kullanılması ile pol geninde mutasyon taşıyan virüslerin ortaya çıkması ve çoğalması bu ilaçların etkinliğinde azalmaya yol açmıştır. Etkinlikte oluşan bu azalma *pol* geni mutasyonunun önemini ortaya çıkarmıştır. Lamivudin, Adefovir dipivoxil, entekavir gibi anti viral ilaç dirençleri bu şekilde gelişmektedir (Nurettin Tunc, 2009).

3.5. Lamivudin direncine neden olan mutasyonlar

HBV polimerazının primer katalitik bölgesi “revers transkriptaz” enzimidir. Bu enzim A, B, C ve D domainleri içerir. C domaininin rt203-rt206. kodonlarını oluşturan tirozin(Y), metiyonin(M), aspartat(D), aspartat(D) motifinde oluşan mutasyonlar lamivudin direnci ile ilişkili mutasyonlar olarak bilinmektedir. 204. pozisyonundaki metionin aminoasitinin başka bir aminoasit ile değişimine sebep olan mutasyonlar ilacın da etkisiz olmasına yol açmaktadırlar (Muharrem Doğan, 2007).

Lamivudin direncine yol açan 2 mutasyon bildirilmiştir. Bu mutasyonlara revers transkriptazın B domaininin 180. kodonundaki L180M mutasyonları da eklenmiş ve 3 grup mutasyon tanımlanmıştır (Muharrem Doğan, 2007).

Bu mutasyonlar;

- a) 1. grup mutasyonlar : M204V ve L180M mutasyonlarının birlikteliği
- b) 2. grup mutasyonlar : M204I mutasyonu
- c) 3. grup mutasyonlar : M204I ve L180M mutasyonlarının birlikteliği

Bu gruplardan 1. grup mutasyonların daha sık olduğu, 2. grup mutasyonların ise daha erken görülmekte olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Lamivudine direnç gelişimine sebep olan mutasyonları araştırmak amacıyla in vitro ortamda yapılan bir çalışmada YMDD'nin 7 değişik motifte mutasyonu olduğu ve bunların özellikleri karakterize edilmiştir. Bu motifler YIDD, YVDD, YADD, YLDD, YKDD, YRDD ve YTDD olarak gösterilmiştir. Bu oluşan mutant tiplerden YADD, YKDD ve YTDD motiflerinin HBsAg sekresyonu yapamadıkları yani oluşan mutasyonun infeksiyöz olmayan bir virüse yol açtığı gösterilmiştir. Yine bu mutant tiplerden YKDD, YRDD ve YTDD motiflerine lamivudinin uygulanabilir olmadığı gösterilmiş, YADD ve YLDD'ye lamivudinin replikasyonu inhibe edici etki ettiği görülmüş, YIDD ve YVDD motiflerinin ise lamivudine dirençli olduğu tespit edilmiştir (Muharrem Doğan, 2007).

3.6. Adefovir dipivoksil direncine neden olan mutasyonlar

Lamivudin direncine sebep olan mutasyonlara oranla daha az görülen adefovir dipivoksil direncine neden olan mutasyonlar revers transkriptazın D domaininin 236. kodonundaki N236T ve 181. kodonundaki A181T mutasyonlarına bağlanmıştır. Bu mutasyonların lamivudin duyarlılığında da azalmaya sebep olduğu gösterilmiştir. Direnç mekanizması tam belli değildir. Ancak 236 ve 181. pozisyonlardaki aminoasitlerin yerine geçen treonin (T) aminoasitinin daha küçük ve daha hidrofilik olması bir fark oluşabileceğini düşündürmektedir (Muharrem Doğan, 2007).

3.7. Entekavir direncine neden olan mutasyonlar

Entekavir, lamivudine dirençli suşları hızla baskılayabilir. Ancak; polimerazın RT bölgesinde meydana gelen bazı mutasyonlar, bu ilaca da dirence neden olabilmektedir. Entekavir direnci ile ilişkilendirilen mutasyonlar B domainindeki T184G, C domainindeki S202I ve D domainindeki M250V mutasyonlarıdır (Muharrem Doğan, 2007).

4. GEREÇ VE YÖNTEM

Kasım 2011- Eylül 2014 tarihleri arasında Lefkoşa, Yakın Doğu Üniversitesi Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı ile kan merkezine çalışma izni, oturma izni, öğrenci izni çıkartmak, rutin hepatit testleri ve/veya donör tarama testlerini yaptırmak üzere başvuran kişilerde, HBsAg pozitif olarak saptanan serum örnekleri çalışmaya alındı. HBsAg pozitifliği tespit edilen numuneler diğer Hepatit B belirteçleri açısından değerlendirildi. Hepatit B belirteçleri; HBsAg (Architect i200, Abbott), anti-HBc, HBeAg, anti-HBe (Liaison XL Murex, DiaSorin) kemiluminesan enzim immunoassay yöntemiyle, AST-ALT değerleri Olympus AU680, Beckman Coulter IFCC sistemi ile araştırıldı. Architect i200, Abbott HBsAg test sonuçları Sample /Cutt Off (S/CO) üzerinden değerlendirilmektedir. Çalışılan numuneler S/CO değeri <1.0 ise nonreaktif; S/CO değeri ≥ 1.0 ise reaktif olarak rapor edilmektedir. HBsAg testi pozitif saptanan numuneler HBV genotip ve subgenotip analizleri çalışılmak üzere -80°C 'de saklandı.

4.1. HBV Kantitasyonu

Serum HBV düzeyi real - time PCR yöntemiyle üretici firmanın (Artus HBV QS RGQ Qiagen, Germany) önerileri doğrultusunda çalışıldı.

4.2. HBV genotipleme/subtipleme, nükleozid direnci analizi ve HBsAg mutasyon analizi

HBsAg pozitifliği saptanan örneklerin HBV genotip/subgenotipleri, HBV *pol* geni (ters transkriptaz; rt bölgesi, 80. - 250. amino asitleri arası) sekanslanarak analiz edildi (Sayan M. ve diğerleri, 2010). Bu amaçla serum örneğinden HBV DNA izole edildi (Anatolia Geneworks, Bosphore® Viral DNA Extraction Spin Kit ve Magnesia® 16 Magnetic Bead Extraction System, Istanbul - Turkey). HBV *pol* geni amplifikasyonu (742 bp) için forward (F:5'-tcgtggtggacttctctcaatt-3') ve revers (R:5'-cgttgacagactttccaatcaat-3') primerler kullanıldı. PCR koşulları için 95°C -10 dk. ön denaturasyon, ardından 35 siklus

95°C-45 sn. 60°C-45 sn. ve 72°C-45 sn. ısı/zaman döngüsü kullanıldı (Sayan M. ve diğerleri, 2010). Tüm PCR ürünleri High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) ile saflaştırıldı. Sekans protokolünde Phire Hot Start DNA polimeraz (Finnzymes Oy, Vantaa, Finland) enzimi kullanıldı. Sekanslama, The BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech Inc. Piscataway, NJ, USA), 36 cm kapiller ve POP-7 TM polimer (Applied Biosystems Inc.) kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda (<http://www.appliedbiosystems.com>) ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA) platformunda gerçekleştirildi.

Elde edilen sekanslar Geno2pheno Drug Resistance programında (Center of Advanced European Studies and Research, Bonn, Germany) analiz edildi. Geno2pheno programı, fasta formatındaki bilinmeyen nükleik asit sekanslarını databazında bulunan referans sekanslarla karşılaştırmaktadır. Karşılaştırma sonrasında HBV pol geni rt domaininde; 80., 84., 85., 91., 169., 173., 180., 181., 184., 191., 194., 202., 204., 214., 215., 233., 236.-238. ve 250. amino asit pozisyonları primer ilaç direnci ve kompensatuvar mutasyonlar yönünden analiz edilecektir (Shaw T. ve diğerleri, 2006). Ayrıca HBV rt domaini ile çakışan S gen bölgesinde; 121., 135., 137., 139.-149., 151.-153., 155.-157., 161., 164., 172., 173., 175., 176., 182., 193.-196. amino asit pozisyonları mutasyonlar yönünden analiz edildi (Avellon A., Echevarria JM. 2006). Verilerin analizi SPSS 15.0 programı kullanılarak gerçekleştirildi.

4.3. Filogenetik analiz

HBV genotip/subgenotipleri, Neighbour-joining yöntemi ile filogenetik olarak analiz edildi. Filogenetik ağaç CLC Sequence Viewer (CLC bio A/S, Qiagen, Danimarka) programı kullanılarak oluşturuldu ve bootstrap değeri 1000 olarak alındı. Filogenetik ağaç oluşturulurken kullanılan referans diziler Gen-Bank'tan (www.ncbi.nlm.nih.gov) sağlandı.

4.4. İstatistik

Veriler SPSS paket program aracılığı ile analiz edildi.

5. BULGULAR

Tarama testleri sonucunda 160/13892 (%1,1) kişi HBsAg pozitif olarak saptandı. HBsAg pozitifliği saptanan tüm serum örnekleri HBV DNA kantitasyonu ve sekanslama işlemine alındı. Altmış olgu (60/160,%37.5), negatif ya da zayıf HBV DNA yükü (<30 IU/ml) nedeniyle sekanslama dışı bırakıldı.

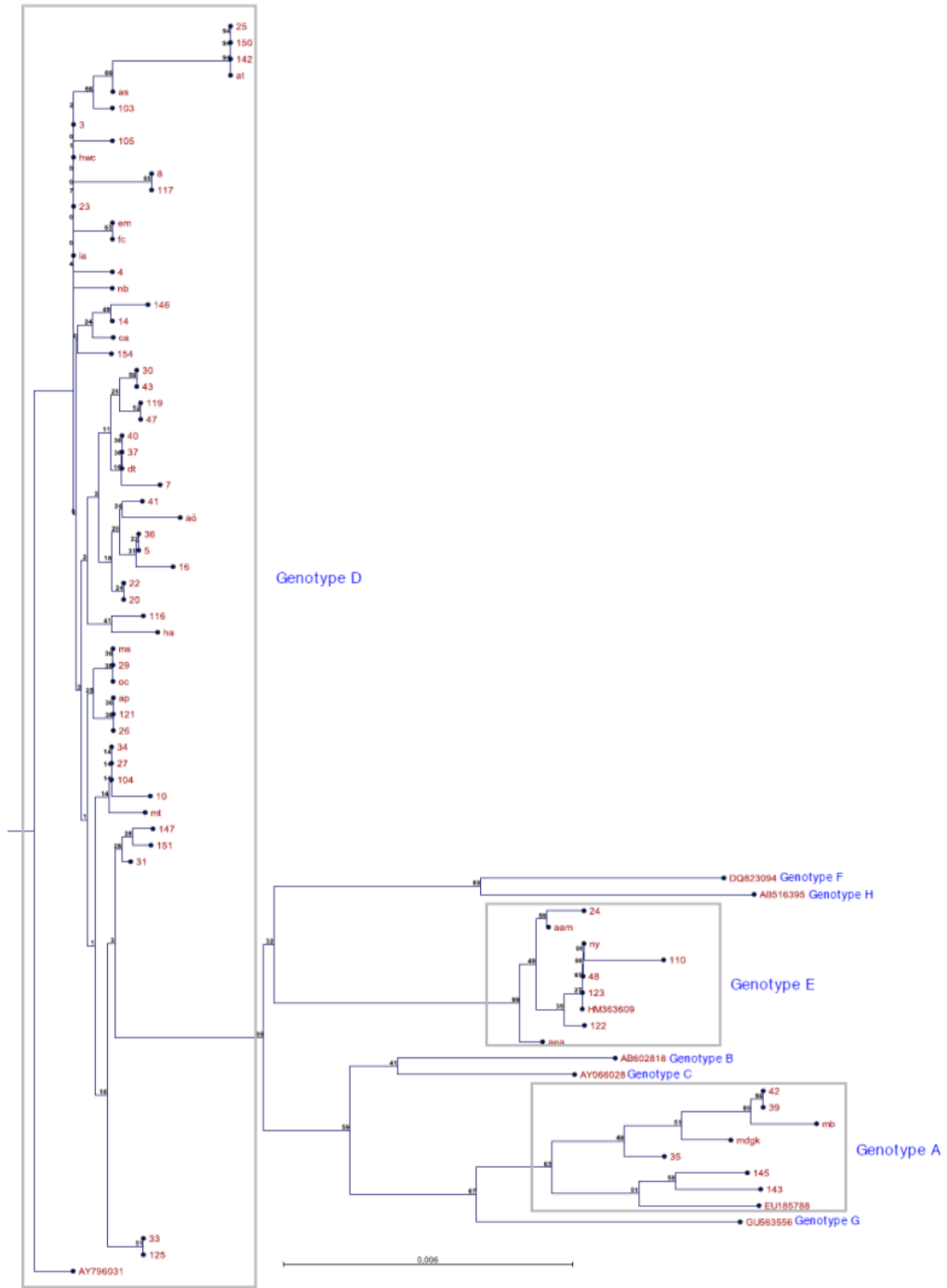
HBV DNA sekanslama işlemine alınan olguların (100/160,%62,5) 13'ü kadın, 87'si erkekti. Yaş ortalamaları $35,51 \pm 12,88$, AST ortalamaları $27,88 \pm 19,51$ ve ALT ortalamaları $22,54 \pm 19,44$ şeklinde saptandı. Anti-HBcIgG 96/100 (%96) olguda pozitif olarak saptanırken, HBe Ag 5/100 (%5) olguda, anti-HBe 95/100 (%95) olguda pozitif olarak saptandı. Olguların HBV DNA ortalamaları ise $5,36 \times 10^6 \pm 3,58 \times 10^7$ olarak belirlendi. Çalışma grubunu oluşturan olguların laboratuvar ve klinik demografisi Tablo 5.1'de verilmektedir.

Tablo 5.1. HBV DNA sekanslama işlemine alınan olguların demografik ve laboratuvar bulguları (n=100)

Özellik	Sayı (n)	%
Erkek	n:87	87.0
Kadın	n:13	13.0
Yaş (Ort ±ss)	35.51 ± 12.88	
Anti HBc IgG pozitif	n:96	96.0
HBeAg pozitif	n:5	5.0
Anti HBe pozitif	n:95	95.0
HBV DNA (Ort ±ss)	$5.36 \times 10^6 \pm 3.58 \times 10^7$	
ALT(Ort ±ss)	22.54 ± 19.44	
AST(Ort ±ss)	27.88 ± 19.51	

HBV DNA sekanslama işlemine alınan olguların 32/160'ında (%20), HBV DNA yükü 1000 IU/ml eşiğinin altında olması nedeniyle sekanslama işlemi başarılı bulunmadı. Olguların 68/160'ında (%42.5) ise HBV suşları sekanslanabildi ve genotip/subgenotipleri filogenetik olarak belirlendi.

HBV DNA sekansları analiz edilebilen olguların HBV genotip/subgenotip dağılımına bakıldığında, 48/68 (%71) olguda D/D1, 4/68 (%6) olguda D/D2, 1/68 (%2) olguda D/D3, 5/68 (%7) olguda A/A1, 2/68 (%3) olguda A/A2 ve 8/68 (%12) olguda genotip E saptandı. Sekans analizi yapılan hastaların genotip/subgenotip dağılımları Şekil 5.1'de, filogenetik ağaçta verilmektedir.



Şekil 5.1. Kuzey Kıbrıs'ta dolaşımdaki HBV suşlarının dendogramı. Filogenetik analiz için HBV *pol* geni ters transkriptaz domaini (kodon; 43- 344) sekanslandı. Filogenetik ağaç, Neighbour - Joining metodu ile Jukes-Cantor nükleotid uzaklık ölçüm modeline göre CLC Sequence Viewer (CLC bio A/S, Qiagen, Danimarka) programında yapıldı. Bootstrap değeri 1000 olarak alındı.

HBV DNA sekansları analiz edilebilen olguların ülkeleri incelendiğinde 19/68 (%19) olgunun Türkiye, 16/68 (%16) olgunun Kuzey Kıbrıs ve 65/68 (%65) olgunun diğer ülke (Pakistan, Bulgaristan, Türkmenistan, Çin, Nijerya, Suriye, Meksika, Azerbaycan, Gürcistan) vatandaşı oldukları tespit edildi. D/D1 olgularının 29/48 (%60)'i Türkiye, 12/48 (%25)'i Kuzey Kıbrıs, 3/48 (%7)'i Pakistan, 2/48 (%4)'i Türkmenistan, 1/48 (%2)'i Bulgaristan ve diğer 1/48 (%2)'i Çin orijinli idi. A/A1 olgularından 2/5 (%40)'i Çin, diğer 2/5 (%40)'i Nijerya ve 1/5 (%20)'i Meksika'dan gelen olgularda saptanırken, genotip E olgularının hepsi Nijerya kaynaklı idi. Tüm olgular içerisinde saptanan D/D2 HBV suşları Türkiye, Nijerya ve Suriye; tek suş olan D/D3 Benguela kaynaklı ve A/A2 olguları Azerbaycan ve Gürcistan kaynaklı idi. Kuzey Kıbrıs'ta HBV ile enfekte bireylerde saptadığımız HBV genotip/subgenotiplerin ülkelere göre dağılımı Tablo 5.2'de verilmektedir.

Tablo 5.2. Kuzey Kıbrıs'ta saptanan HBV genotip/subgenotiplerin ülkelere göre dağılımı, (n=68).

Genotip	Subgenotip, n,(%)	Ülke
D	D1 (n:48,%71)	Türkiye, Pakistan, Kuzey Kıbrıs Bulgaristan, Türkmenistan, Çin
	D2 (n:4,%6)	Türkiye, Nijerya, Suriye
	D3 (n:1,%1)	Benguela
A	A1 (n:5,%7)	Çin, Nijerya, Meksika
	A2 (n:2,%3)	Azerbaycan, Gürcistan
E	E (n:8,%12)	Nijerya

Sekans analizi yapılan hastaların mutasyon analizleri incelendiğinde 68 olgunun sadece 1 tanesinde (1/68, %1) (rtV173M) primer /parsiyel ilaç direnci saptandı. RT kangalı incelendiğinde hastaların 25/68'inde (%37) telbivudine (LdT), lamivudin (LAM) ve adefovir (ADV) ile ilişkili (rtL91I, rtQ149K, rtQ215H/P/S ve rtN238D) kompensatuvar direnç mutasyonları tanımlandı. HBV *pol* geni mutasyonları ve klinik özellikleri Tablo 5.3'de verilmektedir.

Tablo 5.3. HBV *Pol* geni mutasyonları ve klinik özellikleri

HBV Genomu	Mutasyon Tipi	Mutasyon Özelliği	Klinik Özellik
<i>Pol</i> geni (RT Kangalı)	rtV173M	Primer/Parsiyel ilaç direnci mutasyonu	Lamivudine; parsiyel dirençli Adefovir; duyarlı Entekavir; duyarlı Tenofovir; duyarlı Telbivudin; duyarlı
	rtL91I, rtQ149K, rtQ215H/PS rtN238D	Kompansatuvar mutasyon	LdT kompanzasyonu LAM ve ADV kompanzasyonu LAM ve ADV kompanzasyonu LAM ve ADV kompanzasyonu

S gen bölgesi mutasyonları incelendiğinde 16/68 (%24) olguda bağışık yanıt kaçağı (sY100C, sI110L, sP120L/R, sT123N, sT127L, sP127T, sA128V, sT131N, sS132P, sY134F/H, sT140I/S, sS143T, sD144E, sS144T, sP210S), 7/68 (%10) olguda aşı kaçağı (sT126I, sD144A/E, sG145A/R, sS193L,sP210T), 4/68 olguda (%6) immunglobulin (HBİg) kaçağı (sT118A, sP120T, sD144A/E, sG145A/E/R) ve 3/68 olguda (%4) hastada HBsAg tanı kaçağı (sT118A, sT131I, sP120T, sC121Y, sD144A, sG145R) mutasyon paternleri izlendi (Tablo 5.4).

Olguların bir kısmında birden fazla mutasyon paterni bulunmakta idi. Altı olguda (6/68, %9) ise kombine S geni mutasyonları mevcuttu (Tablo 5.5).

Tablo 5.4. Tedavi naif hepatit B'li hastalarda tipik HBsAg mutasyonları

HBsAg mutasyon kategorisi	Mutasyon paterni	Hasta sayısı (%)
Bağışık yanıt kaçağı	sY100C, sI110L, sP120L/R, sT123N, sT127L, sP127T, sA128V, sT131N, sS132P, sY134F/H, sT140I/S, sS143T, sD144E, sS144T, sP210S	16 (%24)
HBV aşı kaçağı	sT126I, sD144A/E, sG145A/R, sS193L,sP210T	7 (%10)
HBİg* kaçağı	sT118A, sP120T, sD144A/E, sG145A/E/R	4 (%6)
HBsAg tanı kaçağı	sT118A, sT131I, sP120T, sC121Y, sD144A, sG145R	3 (%4)
	Toplam**	20 (%29)

HBİg: Hepatit B immunoglobulin

**Hastalarda birden fazla mutasyon paterni bulunabilmektedir.

Tablo 5.5. Kombine S geni mutasyon paternler

Hasta No	Mutasyon kombinasyonları	HBsAg kaçış mutasyonu türü
4	sI110L + sS193L	Bağışık Yanıt ve Aşı Kaçağı
7	sP120L + sT123N + sT126I + sA128V + sY134H + sD144E + sG145A	Aşı Kaçağı ve HBİg
25	sT118A + sP127T	Bağışık Yanıt ve HBİg
29	sT131I + sS132P	Bağışık Yanıt ve Tanı Kaçağı
59	sI110L + sP120T + sD144A + sG145R	Bağışık Yanıt, Aşı Kaçağı, Tanı Kaçağı, HBİg
66	sP120R + sC121Y	Bağışık Yanıt ve Tanı Kaçağı

6. TARTIŞMA

Hepatit B virüsü (HBV) bütün dünyada olduğu gibi ülkemizde de en yaygın ve ciddi sağlık sorunlarının başında gelmektedir. Dünya nüfusunun üçte biri bu virüsle karşılaşmış olup, yaklaşık 400 milyon kişinin kronik olarak enfekte olduğu bilinmektedir (Yamazhan T., 2011). HBV enfeksiyonu klinik olarak akut veya fulminan hepatit, kronik veya kronik taşıyıcılık şeklinde seyredebildiği gibi, karaciğer sirozu ve HSK dönüşebilmektedir (Kulah C., Çırak YM. 2010).

Genotip, bir genomun genetik özelliklerinin, nükleotid değişimlerini, nükleotid insersiyonu veya delesyonlarını temel alarak tip ya da subtip olarak tanımlanır ve her bir birey dizininin diğerinden ayrılmasını sağlayan özellikler içermektedir. Dizilerin moleküler virolojik karakteristiklerini oluşturan bu diziler klinik olarak faydalı bilgiler sağlayabilir (Öznur Öztürk, 2010). HBV'nin günümüze kadar tanımlanmış farklı coğrafik dağılım gösteren 8 ana genotipi vardır. Bu genotipler A'dan H harfine kadar adlandırılmıştır. HBV genotiplerinin dağılımı coğrafik farklılıklar göstermektedir (Chun-Jl., Jia-HK. 2006). Kuzey Avrupa, ABD ve Orta Afrika'da genotip A; Asya'da genotip B ve C; Güney Avrupa, Ortadoğu ve Hindistan'da genotip D; Afrika'da genotip E; Orta ve Güney Amerika'da özellikle Pasifik okyanusundaki adalarda (Polinezya) genotip F ve ABD ve Fransa'da genotip G sık görülmektedir. Genotip H ise, ilk olarak ABD ve Nikaragua'da tanımlanmış daha sonra Orta Amerika, Meksika ve Japonya'dan bildirilmiştir. HBV yüzey antijeni (HBsAg) prevalansına göre orta düzeyde endemik (%2-7) bölge karakteri gösteren Türkiye'nin genotip dağılımı incelendiğinde, HBV genotip D'nin predominant olduğu görülmektedir. Öte yandan, Kocaeli'nde genotip A, Adana'da genotip G ve Konya'da genotip H ile enfekte kronik hepatit B olguları bildirilmiştir (Sayan M ve diğerleri, 2014).

Farklı genotiplerin varlığında hastalığın klinik seyrinde ve tedavi yanıtında farklılıklar izlenmektedir. Yapılan çalışmalarda Genotip B ve C'nin kronik hepatit B ve HSK oluşturma riskinin diğer genotiplere oranla fazla olduğu bilin-

mektedir. Genotip C'nin siroz ile sonuçlanan daha ciddi kronik karaciğer tahribatlarıyla ilişki olduğu gösterilirken, genotip B'nin gençlerdeki HSK ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir. Kronik aktif hepatitlerde genotip A baskın olarak saptanırken, akut hepatitlerde genotip D daha yüksek prevalanslarda saptanmıştır (Külah C. ve diğerleri, 2005). Bu nedenle HBV enfeksiyonu varlığında genotipin bilinmesi hastalığın seyrinin öngörülmesi ve uygun tedavi seçeneğinin belirlenmesi açısından önemlidir (Ural O. ve diğerleri, 2013)

Kuzey Kıbrıs'ta HBV genotip/subgenotip dağılımı ile ilaç direnç mutasyonları hakkında elimizde hiçbir veri bulunmamaktadır. Bu tez çalışmamızda Kuzey Kıbrıs'ta HBV ile infekte bireylerde, filogenetik bir yaklaşımla HBV'nin serolojik, virolojik ve moleküler epidemiyolojisini belirlemeği hedefledik. Çalışmaya KKTC vatandaşları dışında Türkiye'den ve üçüncü ülkelerden gelen kişi ve hastalar da dahil edildi. Bu sayede Kuzey Kıbrıs'ta dolaşan tüm HBV suşlarının tanımlanması mümkün oldu.

Kuzey Kıbrıs'ın HBV epidemiyolojisi tam olarak bilinmemektedir. Elde ettiğimiz veriler doğrultusunda Kuzey Kıbrıs'ın HBsAg pozitifliği (%1.1) açısından düşük endemisiteli bölgeler arasında yer aldığını saptadık. Çalışmamızdaki moleküler bulgular Kuzey Kıbrıs'ta HBV genotip A, D ve E'nin dolaşımda bulunduğunu göstermektedir. HBV subgenotip çeşitliliğine bakıldığında D genotipi için D1'in dominant olduğu ancak D2 ve D3 subgenotiplerinin de bulunduğu, A genotipinin ise A1 ve A2 olarak çeşitlendiği anlaşılmaktadır. Bir ada ülkesi olmasına rağmen Kuzey Kıbrıs'ın heterojen karakterdeki HBV genotip/subgenotip dağılımı birçok ülkeden çalışma, eğitim ve turistik amaçla gelen kitlelerin dinamiğine bağlı olabilir.

Türkiye'de yapılan çalışmalara bakıldığında; Kocaeli'nde genotip A, Adana'da genotip G, Konya'da genotip H ve Manisa'da genotip E ile enfekte kronik hepatit B olguları tanımlanmış ancak HBV genotip D daima predominant olarak saptanmıştır (Ural O. ve diğerleri, 2013; Sayan M. ve diğerleri, 2014; Özdemir D. ve diğerleri, 2002). Bulgularımıza göre genotip D, Kuzey Kıbrıs'ta,

predominant olmasa da yüksek bir oranda (%78) saptanmakta ve filogenetik olarak daha homolojik bir dağılım göstermektedir. HBV genotip D, dünya genelinde özellikle akdeniz havzasında, genotip A kuzeybatı Avrupa, Kuzey Amerika ve Afrika’ da; genotip E ise Afrika’ da baskın olarak bulunduğu bilinmektedir (Kramvis A. ve diğerleri, 2005). Elde ettiğimiz verilerde Kuzey Kıbrıs bölgesinde genotip D’ nin baskın oluşu akdeniz havzası özelliği ile uyumlu görünmektedir. Filogenetik analiz metoduna dayalı çalışmalara göre HBV genotip D, D1-D7 altgruplardan oluşmaktadır. D1 altgrubu Orta Doğuda, D3 Alaska ve Güney Afrikada, D4 Papua Gine ve Avustralya’da, D5 ise Japonya ve Hindistan’ da tanımlanmıştır (Kramvis A. ve diğerleri, 2005). Türkiye’de yapılan çalışmalara göre subgenotip D1 (% 81-%100) baskın olarak saptanmakta, subgenotip D2 (%2-%22), D3 (%2-%9) ve D4 (%0.5-2) bunu takip etmektedir (Sayan M. ve diğerleri, 2011; Sayan M. ve diğerleri, 2012; Sayan M. ve diğerleri, 2011). HBV tüm genom analiz yaklaşımı da Türkiye’de subgenotip D1 ve D2’nin sırasıyla daha sık rastlandığını doğrulamaktadır (Bozdayı G. ve diğerleri, 2005). Bulgularımıza göre Kuzey Kıbrıs’taki HBV subgenotip dağılımı Türkiye ile benzerlikler göstermektedir. Öte yandan bulgularımıza göre Kuzey Kıbrıs’taki genotip A (%10) ve E (%12) dikkat çekici prevalanslara sahiptir. Çalışmamızda, genotip A olguları, filogenetik ağaçta farklı evrimsel uzaklıkla karakterizedir. Bunun nedeni genotip A olgularının farklı coğrafyalarda farklı ülke orijinli olmaları olabilir. Ancak genotip E olguları daha dar bir evrimsel uzaklık görünümü sergilemektedir. Bu durum, genotip E olgularının tümünün Nijerya kökenli olmasıyla açıklanabilir. Öte yandan, E genotipinin belirgin bir şekilde sadece Afrika’dan gelen kişilerde saptanarak daha önceki epidemiyolojik çalışmalarla uyumlu olduğu anlaşılmaktadır (Wang B. ve diğerleri, 2014; Binghui W. ve diğerler, 2014).

Günümüzde HBV’nin global kontrolünde zorluklara neden olabilecek gelişmeler yaşanabilmektedir. Türkiye’deki Suriye’li (2011 itibariyle 1.7 milyon kişi) ve Afrika’lı mültecilerin sayısındaki olağanüstü artış, Afganistan, İran, Irak ve Somali kökenli bireylerin iltica taleplerindeki artış (Ocak 2015 itibariyle 100 000 kişi), insan kaçakçılığının bölgemizi duraklama noktasına çevirmesi ve

turizm hareketleri HBV'nin bölgemizde daha fazla çeşitlenmesine yol açabilir (<http://www.unhcr.org/pages/49e48e0fa7f.html>; https://ec.europa.eu/antitrafficking/sites/antitrafficking/files/trafficking_in_human_beings_-_eurostat_2014_edition.pdf). Öte yandan bütün bu insan hareketleri, dinamik HBV populasyonlarına ve buna bağlı olarak rekombinant HBV kökenlerinde artışa neden olabilir (Pourkarim MR. ve diğerleri, 2014). Kitle hareketlerindeki çeşitlilik ve artış, HBV sirkülasyonunu yakından izlemeyi gerektirmektedir.

HBV genotipleme ve subgenotiplemede nükleotid dizilerinin filogenetik analizi altın standart bir yaklaşımdır (Bartholomeusz A. ve diğerleri, 2004). Filogenetik yaklaşım ile geniş serileri analiz etmek mümkündür. Bu amaçla Neighbour-joining ve UPGMA metodları sıklıkla tercih edilirken Neighbour-joining metodu suşlar arasında evrimsel ilişkileri Jukes Cantor ve Kimura nükleotid uzaklık ölçüm modelleri sayesinde UPGMA metodundan daha iyi yansıtır. Hedeflenen nükleotid dizilerinin referans dizilerle benzerliklerini esas alan filogenetik analiz yaklaşımı, HBV suşları arasındaki evrimsel yakınlıkları anlamayı mümkün kılarken aynı zamanda elde edilen nükleotid dizilerinin uluslararası dizi veri havuzu olan GenBank'a yüklenmesi ile global süveyansa katkı yapılmasını mümkün kılmaktadır (Bartholomeusz A. ve diğerleri, 2004).

HBV enfeksiyonu aşılama ile engellenebilir olmasına rağmen kronik HBV enfeksiyonu oldukça yaygındır. Kronik HBV enfeksiyonunu tedavi etmek için kullanılan antivirallere karşı gelişen direnç mutasyonları ise tedavinin en temel sorunudur. HBV tedavisinde kullanılan ilaçlara karşı gelişen bu mutasyonlar tedavide kullanılan ilaçların sayısı azaltmaktadır. Bu açıdan tedavi naif hastalarda kullanılacak ilk antiviral ilacın seçimi önem arz etmektedir. Günümüzde Kronik HBV enfeksiyonunun temel tedavi yöntemi, en düşük genotipik dirence sahip, en etkin antiviral kullanarak tedaviye monoterapi ile başlamak ve antiviral cevabı zaman içerisinde takip etmektir. Tedavinin başarısız olduğu durumlarda direnç profilinin belirlenmesi ve gerektiğinde ilaç değişikliği yapılması tedavi başarısı açısından çok önemlidir. Antiviral direnç profilinin bilinmesiyle beraber başka bir antiviral ilaca geçilerek monoterapiye devam edi-

lebilir (kombinasyon tedavisi) ya da kullanılan antivirale ek olarak başka bir antiviral tedaviye eklenebilir (Bozdayi M., Karataylı E, 2009). Yaptığımız çalışmada saptadığımız primer/parsiyel direnç mutasyonu klinik açıdan çok fazla önem taşımamaktadır. Ancak L-nükleozidler ile ilişkili rtV173L mutasyonu kompensatuvar karakterdedir ve halk sağlığını olumsuz etkileme potansiyelindeki sD144E mutasyonunun (HBV aşı kaçağı + HBİg kaçağı) oluşumuna neden olmaktadır. (Sayan M., Buğdacı MS. 2013).

Hem tedavi naif hem de NA tedavisi altında olan hastalarda HBV genomunun RT kangalı, primer ilaç direnci mutasyonları yönünden analiz edilirken bu bölge ile çakışan S geni mutasyonlarının da birlikte analiz edilmesi mümkündür. KHB'nin NA tedavilerinde gelişen ilaç direnci mutasyonları HBsAg'nin yapı ve fonksiyonlarını etkileyebilmektedir. HBsAg proteininde "a" determinantı olarak bilinen majör nötralizasyon kangalı ve çevresinde meydana gelen mutasyonlar, hepatit B aşılmasına yanıtın azalmasına neden olmaktadır. Direkt dizileme metoduyla HBV enfeksiyonlarında saptanabilen kompensatuvar mutasyonlarından HBV aşı kaçağı mutasyonları HBsAg tanı testlerinde yalancı negatifliklere ve HBİg ile korumada yetersizliğe yol açabilmektedir HBV aşı kaçağı mutasyonlarına sahip olan suşlar, aşılanmış bireylere bulaş riski taşıdığından, lokal ya da global hepatit B bağışıklama programlarında risk oluştururlar (Teo CG. ve diğerleri, 2010; Sayan M., Buğdacı MS. 2013). HBV *pol* geninde NA hedef bölgesinde meydana gelen kompensatuvar mutasyonlar, KHB'li hastaların tedavi programlarında yanlışlıklara neden olabilir. Türkiye'de yapılan bir çalışmada hem NA tedavisi naif hem de LAM ve/veya ADV tedavilerindeki KHB hastalarında rtQ215H/Q/P/S kompensatuvar mutasyonlarının sık saptandığını bildirmişlerdir (Sayan M., Şentürk Ö. 2010). Kuzey Kıbrıs'taki tedavi almamış hastalarda yaptığımız bu çalışmada da saptadığımız kompensatuvar direnç mutasyonları LdT, LAM ve ADV ile ilişkili (rtL91I, rtQ149K, rtQ215H/P/S ve rtN238D) mutasyonlardı.

7. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bir ada ülkesi olmasına rağmen Kuzey Kıbrıs'ta HBV genotip/subgenotip dağılımının heterojen bir karaktere sahip olduğu anlaşılmaktadır. Bu durum, Kuzey Kıbrıs'a birçok ülkeden çalışma, eğitim ve turistik amaçla gelen kalabalık ve heterojen halk kitlelerine ve adanın kozmopolit yapısına bağlanabilir.

Kronik hepatit B'nin NA ile uzun süreli tedavisinde karşılaşılan en önemli sorun, kullanılan antiviral ajana dirençten sorumlu mutasyonların gelişmesidir. Primer ya da kompensatuvar nitelikte olabilen mutasyonlar HBV DNA yükünde artışa ve tedavide başarısızlığa yol açabilmektedir. Kuzey Kıbrıs'ta yaptığımız bu çalışma ile dolaşımda bulunan NA ile ilişkili primer/kompensatuvar mutasyonların tedavi başarısını etkileyecek paternlere ve prevalansa sahip olmadıkları anlaşılmaktadır. Ancak, S geni mutasyonları ile ilgili elde ettiğimiz bulgularımız, Kuzey Kıbrıs'ta kronik hepatit B'li hastalarda, tipik HBsAg kaçış mutasyonlarının epidemiyolojik önemde olduğunu göstermektedir. Bu bakımdan, tedavi naif ya da oral antiviral tedavi izlenen kronik hepatit B'li hastalarda HBV pol geninin yanı sıra S geninin de analiz edilmesi halk sağlığının korunması bakımından yararlı ve gerekli olabilir.

Araştırmamız Kuzey Kıbrıs'ta daha önce bu kapsamda yapılmış başka bir çalışma olmamasından dolayı bir ilk olma özelliğini taşımaktadır. Bu nedenle, çalışmamızın, Kuzey Kıbrıs'ta, HBV'nin dolaşımı ve bulaş dinamiklerini kavramada yararlı olabileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

A comprehensive Immunization Strategy to Eliminate Transmission of Hepatitis B Virüs Infection in The United States. Recommendations of The Advisory Commitee on Immunization Practices (ACIP) Part II: Immunization of Adults (2006). MMWR;55(16):1-25.

Akçam Z.F. (2003). Hepatit B Virüsü Enfeksiyonu. Sted, 12(6):211-14.

Akhan S., Aynur A., Çağatay A., Gönen İ., Günal Ö., Kaynar T. (2014). Kronik Hepatit B Virüsü İnfeksiyonunun Yönetimi: Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Derneği Viral Hepatit Çalışma Grubu Uzlaşı Raporu. Klimik Dergisi,27 (Özel Sayı 1): 2-18

Akhan S., Gürel E., Sayan M. (2009). Kronik Hepatit B Hastalarının Beş Yıllık Tedavi Sonuçlarının Değerlendirilmesi. Klimik Dergisi, 22(3): 82-7.

Arslan U., Tuncer İ., Fındık D., Ural O. (2008). HBeAg Negatif, AntiHBe Pozitif Kronik Hepatit B Olgularında Prekor/Kor Bölge Mutasyonlarının ve Genotip Dağılımlarının Değerlendirilmesi. İnfeksiyon Dergisi,22(3):123-129.

Aşan A. (2007). Denizli İlinin Hepatit B Seroprevalansının Değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi, Pamukkale Üniversitesi, Denizli.

Aşkar E. (2006). Sağlık Çalışanlarında Hepatit B ve Hepatit C Seroprevalansı. Uzmanlık Tezi, Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul.

Avellon A., Echevarria JM. (2006). Frequency of Hepatitis B Virus ‘a’ Determinant Variants in Unselected Spanish Chronic Carriers. Journal of Medical Virology,78(1): 24-36.

Badur S. (2004). Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji (ISBN: 9752770207) Nobel Kitabevi.

Barçın T. (2010). Hepatit B ve Aşı Konusunda Üniversite Öğrencilerinin Bilgi, Tutum ve Davranışlarının Araştırılması.Uzmanlık Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana.

Bartholomeusz A., Schaefer S. (2004). Hepatitis B Virus Genotypes: Comparison of Genotyping Methods. Review Medical Virology,14(1): 3-16.

Baument TF. ve diğerleri. (2007).Wond Journal of Gastroenterology.13(1):82-90.

Beasley RP. (1983). Prevention of Perinatally Transmitted Hepatitis B Virus Infections with Immune Globulin and Hepatitis B Vaccine. Journal of Infectious Disease,147:185-190.

Bozdayı G., Türkyılmaz AR., İdilman R., Karataylı E., Rota S., Yurdaydın C. ve diğerleri. (2005). Complete Genome Sequence and Phyogenetic Analysis of Hepatitis B Virüs Isolated from Turkish Patients with Chronic HBV Infection. Journal of Medical Virology, 76: 476 – 81.

Bozdayı M., Karataylı E. (2009). Hepatit B Virüs Enfeksiyonlarında Anti-viral İlaç Direnci- Mikrobiyolojik Yaklaşım.

www.vhsd.org/files/file/2009_sunumlar/53.pdf.

Br Med Bull E. (1972). Early Studies of Viral Hepatitis B.28 (2): 105-108.

Chemin I., Zoulim F. (2009). Hepatitis B Virüs Induced Hepatocellular Carcinoma. Cancer Letters, 286(1):52–9.

Chun-JL., Jia-HK .(2006). Clinical Implications of Hepatitis B Virus Genotype.Hepatology Review, 3:33-40.

Curry PM., Chopra S. (2005). Hepatitis: Acute Viral Hepatitis. In Mandell.

Çelik E. (2011). Direnç Mutasyonları Gösteren HBV Mutantlarının Belirlenmesi ve Bu Mutantların Çeşitli Antivirallere Karşı Direnç Profillerinin *in vitro*

Fenotipleme Yöntemi ile Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara.

Dane DS et al. (1970). Lancet, 1(7649):695-8.

Dienstag JL. (2001). Harrison's Principles of Internal Medicine.

Doğan M. (2007). Kronik Hepatit B'de Lamivudin Direnci ve Lamivudin Direnci Gelişimi Üzerine Etkili Faktörler. Uzmanlık Tezi, İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul.

Elmi Ş. (2007). HIV/AIDS, HBV, HCV, Sifiliz ve Genital Herpes'in Toplumda ve Riskli Davranış Gösteren Seks İşçilerinde Karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi, Haseki Eğitim ve Aratırma Hastanesi, İstanbul.

Emektaş G., Tezcan S., Aslan G., Serin MS., Sezgin O., Üçbilek E., et al. (2012). Mersin İlinde Kronik Hepatit B Hastalarında Hepatit B Virüs Genotiplerinin Belirlenmesi. Mikrobiyoloji Bülteni, 46(3):432-45.

Ergül AA. (2003). Hepatit Virüslerinin Moleküler Biyolojisi. Güncel Gastroenteroloji, 91-96.

Ganem D., Schneider R. (2001). Hepadnaviridae: The Viruses and Their replication. In: Knipe DM, Howley PM, eds. Fields Virology. Philadelphia: Lippincott-Raven, :2923-70.

Genç Ö. (2014). Dumlupınar Üniversitesi Evliya Çelebi Eğitim ve Araştırma Hastanesinde Hepatit B Serolojik Testlerinin Uygunsuz Kullanımı, Kütahya. Mikrobiyol Bülteni, 48(4): 618-27.

Güçlü E., Geyik FM. (2012). Hepatit B Enfeksiyonu ve Korunma. Konuralp Tıp Dergisi, 4(2):54-8

Hou J., Li Z., Gu F. (2005). Epidemiology and Prevention of Hepatitis B Virus Infection. International Journal of Medical Sciences, 2(1):50-57.

Jen Liu C., Kao JG. (2006). Clinical Implications of Hepatitis B Virus Genotype. *Hepatology Review*, 3:33-40.

Kalaycı R., Altındış M., Gülamber C., Demirtürk N. ve diğerleri (2010). Kronik Hepatit B ve Hepatit C'li Hastalarda Genotip Dağılımı ve Hepatit B Olgularında Direnç Paterninin Araştırılması. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 44: 237-43.

Kao H.J., Chen S.D. (2002). Global Control of Hepatitis B Virüs Infection. *Lancet Infectious Disease*, 2:395-403.

Kesen E. (2006). Hepatit B Virüs İnfeksiyonlu Hastalarda ACE, TNF α - 238, TGF β 1 + 25, VDR 8 Gen Polimorfizimleri. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara.

Kramvis A., Kew M., Francois G. (2005). Hepatitis B Virus Genotypes. *Vaccine*, 23: 2409–23.

Kurbanov H., Tanaka Y., Mizkokami M. (2010). Geographical and Genetic Diversity of Human Hepatitis B Virus. *Hepatology Research*, 40:14-30.

Külah C., Çırak YM. (2010). Ankara Bölgesindeki Hepatit B Virüs Genotiplerinin DNA Analizi Yöntemi ile Belirlenmesi. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 44:245-53.

Lindh M. (2005). HBV Genotype G-an Odd Genotype of Unknown Origin. *Journal of Clinical Virology*, 34: 315 -16.

Locarnini SA. (2002). Clinical Relevance of Viral Dynamics and Genotypes in Hepatitis B Virüs. *Journal of Gastroenterology Hepatology*, (17): S322–28.

Locarnini SA. (2002). Clinical Relevance of Viral Dynamics and Genotypes in Hepatitis B Virus. *Journal of Gastroenterol Hepatology*, 17(Suppl 3): S322–328.

Lozano R., Naghavi M., Foreman K., Lim S., Shibuya K., Aboyans V., Abraham J. ve diğerleri. (2012). Global and Regional Mortality from 235 Causes of Death for 20 Age Groups in 1990 and 2010: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*, 380:2095-2128.

Mahoney FJ. (1999). Update on Diagnosis, Management, and Prevention of Hepatitis B Virus Infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(2):351-66.

Mıstık R. (2005). Kronik B Hepatitinde Laboratuvar Tanı. XII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi, 32-33.

Okamoto H., Tsuda F., Sakugawa H, Sastrosoewignjo R, Imai I., Mmiyakawa Y., ve diğerleri. (1988). Typing hepatitis B Virus by Homology in Nucleotide Sequence: Comparison of Surface Antigen Subtypes. *Journal of Genetic Virology*, 69(Pt 10): 2575-83.

Özdemir D., Balık İ. (2002). Ülkemizdeki Hepatit B Virüsü (HBV) Genotip Dağılımı. *Viral Hepatit Dergisi*, (1) 451-54.

Öztürk Ö. (2010). Van Yöresinde Hepatit B Virüs Genotip Dağılımı ve Prekor/Bazal Kor Promotor Mutasyon Analizi. Tıpta Uzmanlık Tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi.

Pourkarim MR., Amini-BOS., Kurbanov F., Van RM., Tacke F. (2014) Molecular Identification of Hepatitis B Virus Genotypes/Subgenotypes: Revised Classification Hurdles and Updated Resolutions. *World Journal of Gastroenterology*; 20(23): 7152-68.

Sayan M., Akhan S.C, Şentürk Ö. (2011). Frequency and Mutation Patterns of Resistance in Patients with Chronic Hepatitis B Infection Treated with Nucleos(t)ide Analogs in Add-On and Switch Strategies. *Hepatology Monthly*, 11(10):835-42.

Sayan M., Hulagu S., Karatayli CS. (2010). Multidrug-Resistant Hepatitis B Virus Strain in a Chronic Turkish Patient. *Hepatitis Monthly*,10(2): 141-46.

Sayan M., Akhan S.C. (2011). Antiviral Drug, Associated Potential Vaccin-Escape Hepatitis B Virus Mutants in Turkish Patients with Chronic Hepatitis B. *International Journal of Infectious Disease*,(15): e722-26.

Sayan M., Akhan SÇ., Bozdayı M. (2010). Genotype A2/Adw2 Strain of Hepatitis B Virus in Turkey: A Case Report. *Hepatitis Monthly*,10(4):302-5.

Sayan M., Buğdacı MS. (2013). Nükleoz(t)id Analogları Tedavisi Altında HBV Aşı Kaçağı Mutasyonları Gelişen Bir Kronik Hepatit B Olgusu. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 47(3):544-49.

Sayan M., Dogan C.(2012). Hepatitis B Virus Genotype G Infection in a Turkish Patient Undergoing Hemodialysis Therapy. *Hepatology Montly*, (2): 118-21.

Sayan M., Doğan C. (2012). Genotype/Subgenotype Distribution of Hepatitis B Virus Among Hemodialysis Patients with Chronical Hepatitis B. *Annalls Hepatology*, 11(6): 849-54.

Sayan M., Hülagü S., Akhan ÇS, Şentürk Ö.,Meriç M., Çekmen M. (2009). Lamivudin Tedavisi Uygulanmış ve Entekavir Naif Kronik Hepaiti B'li Hastalarda Entekavir İlaç Direnci. *Mikrobiyoloji Bütteni*, 43:425-32.

Sayan M., Şanlıdağ T., Akçalı .S, Arıkan A.(2014). Türkiye’de İlk Kez Saptanan Hepatit B Virüs Genotip E Enfeksiyonu. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 48(4): 683-88.

Sayan M., Şanlıdağ T., Akçalı S., Arıkan A. (2014). Hepatitis B Virus Genotype E Infection in Turkey: The Detection of the First Case. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 48(4): 683-88.

Sayan M., Şentürk O., Akhan SC., Hulagu S., Çekmen MB. (2010). Monitoring of Hepatitis B Virus Surface Antigen Escape Mutations and Concomitantly Nucleos(t)id Analogue Resistance Mutations in Turkish Patients with Chronic Hepatitis B Infection. *International Journal of Infectious Disease*, (14):136-141.

Schaefer S. (2005). Hepatitis B Virus: Significance of Genotypes. *Journal of Viral Hepatology*, (12):111-24.

Selamoglu H. (2009). High Level Expression of Hepatitis B Surface Antigen in *Pichia Pastoris*, Its Purification and Immunological Characterization. Yüksek Lisans Tezi. Ortadoğu Teknik Üniversitesi, Ankara.

Shaw T, Bartholomeusz A., Locarnini S. (2006). HBV Drug Resistance: Mechanisms, Detection and Interpretation. *Journal of Hepatology*, 44(3): 593 - 606.

Silva AC., Spina AMM., Lemos MF., Oba IT., Guatini CF., Gouvea MSG. et al. (2010). Hepatitis B Genotype G and High Frequency of Lamivudine-Resistance Mutations Among Human Immunodeficiency Virus/Hepatitis B Virus Co-infected Patients in Brasil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105(6): 770-8.

Sonsuz A. (2007). Kronik Hepatit B ve C. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri. Sempozyum Dizisi No:58,79-90.

Stuyner L., De Gendt S., Van Geyt C., Zoulim F., Fried M., Schinazi RF. ve diğerleri. (2000). A New Genotype of Hepatitis B Virus: Complete Genome and Phylogenetic Relatedness. *Journal of Genetic Virology*, 81: 61 – 74.

Sümbül M. (1997). Hepatit B ve Hepatit C. Ondokuz Mayıs Üniversitesi. Tıp Dergisi, 14(4):309-318.

Şen A. (2009). Hepatit B Seroprevalansı ve HBsAg (+) Gebelerde İntrauterin Geçişin Risk Faktörlerinin Araştırılması. Aile Hekimliği Uzmanlık Tezi, Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul.

Teo CG., Locarnini SA.(2010). Potential Threat of Drug-Resistant and Vaccine-Escape HBV Mutants to Public Health. *Antiviral Therapy*, 15(3):445-9.

Trafficking in human beings report of European Commission.https://ec.europa.eu/antitrafficking/sites/antitrafficking/files/trafficking_in_human_beings_-_eurostat_-_2014_edition.pdf.

Tunç N. (2009). Adefovir Tedavisi ile Virolojik ve Biyokimyasal Yanıt Alınan Kronik Hepatit B’li Olgularda Relaps Gelişimi ve Relapsa Etki Faktörler. *Tıpta Uzmanlık Tezi*, İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul.

UNHCR official web page; <http://www.unhcr.org/pages/49e48e0fa7f.html>.

Ural O., Sayan M., Akhan S., Sümer Ş., Şimşek F. (2013). Türkiye’de ilk Kez Saptanan Hepatit B Virüs Genotip H Enfeksiyonu Olgusu. *Mikrobiyoloji Bülteni*,47(3): 550-55.

Ülger Y. (2012). Kronik Hepatit B’li Hastalar ile Hepatit B’ye Karşı Spontan Bağışıklık Kazanan Kişiler Arasında Programlanmış Hücre Ölüm Geni Polimorfizimlerinin Sıklıklarının ve Etkilerinin Gösterilmesi. *Yandal Uzmanlık Tezi*, Çukurova Üniversitesi, Adana.

Viral Hepatitis. In: Van Damme P., Vorsters A., Van Heck K., Hendrickx G. (eds.). (2010). *Viral Hepatitis Prevention Board. VHPB vol. 18*. Antwerp, Belgium. Printed by WILDA,1-26.

Wang B., Feng Y., Li Z., Duan H., Zhao T., Zhanetall A. (2014).Distribution and Diversity of Hepatitis B Virüs Genotypes in Yunnan, China.*Journal of Medical Virology*, 86:1675–82.

Yamazhan T. (2011). Kronik Hepatit B Tedavisinde Güncel Durum. *Ankem Dergisi*,25(ek2):234-37.

TEZDEN YAPILAN YAYINLAR, SUNULAR, POSTERLER

1. Kuzey Kıbrıs'ta Hepatit B Virüsünün Genotip/Subgenotip Dağılımı
KLİMUD 2013, POSTER SUNUM
2. Hepatit B virüsü ile Enfekte Hastalarda Doğal Gelişen Polimeraz ve Yüzey Geni Varyantları
KLİMUD 2013, POSTER SUNUM
3. Kuzey Kıbrıs'taki HBsAg Pozitif Olguların Virolojik, Serolojik ve Moleküler Açidan İrdelenmesi.
KMTD 2013, SÖZEL SUNUM.
DR. NİLGÜN ACAR TEŞVİK ÖDÜLLERİ SÖZEL SUNUMLAR
İKİNCİLİK ÖDÜLÜ
4. Molecular Epidemiology of HBV Strains Isolated From Treatment Naive Hepatitis B Patients in Northern Cyprus
ECCMID 2013, POSTER SUNUM
5. Kuzey Kıbrıs'ta Hepatit B Virüsünün Moleküler Epidemiyolojisi.
KLİMUD 2015, POSTER SUNUM
6. KKTC'de Hepatit B Virüsü ile Enfekte Hastalarda Tipik HBsAg Kaçış Mutasyonları.
KLİMUD 2015, POSTER SUNUM
7. Kuzey Kıbrıs'ta Hepatit B Virüsünün Moleküler Epidemiyolojisi.
MİKROBİYOLOJİ BÜLTENİ 2015, ÖZGÜN ÇALIŞMA.