

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**İZOLE ANTİ-HBC POZİTİF HASTALARDA İMMUNO-
REAL TİME PCR İLE HBSAG SAPTANMASI VE “A”
DETERMİNANTİ MUTASYONLARININ İNCELENMESİ**

MERT AHMET KUSKUCU

**DANIŞMAN
PROF. DR. KEMAL ALTAŞ**

**MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI
MİKROBİYOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2008

TEZ ONAYI

Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

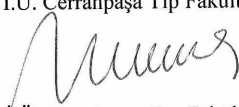
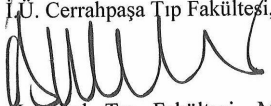
27 / 05 / 2008

 Prof. Dr. Emine Kökoğlu
 Enstitü Müdürü

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
 Program Adı : MİKROBİYOLOJİ
 Programın seviyesi : Yüksek Lisans ☐ Doktora ☒
 Anabilim Dalı : İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
 Tez Sahibi : Mert Ahmet KUŞKUCU
 Tez Başlığı : İzole Anti HBc Pozitif Hastalarda İmmunorel Time PCR ile HBsAg Saptanması ve "a" Determinant Mutasyonlarının İncelenmesi
 Sınav Yeri : İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
 Sınav Tarihi : 14 / 05 / 2008

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı

1. Prof. Dr. Müzeyyen Mamal TORUN İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

2. Prof. Dr. Kemal ALTAŞ (Danışman) İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

3. Prof. Dr. Gülden YILMAZ İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

4. Prof. Dr. Güner SÖYLETİR Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

5. Prof. Dr. Funda BABACAN Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı


BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Mert Ahmet KUŞKUCU



İTHAF

Ayşegül'üme

TEŞEKKÜR

Dersine girdiğim ilk günden beri bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, hayatımda hep bana bir ışık kaynağı olmuş ve olacak kendisini örnek olarak alacağım Danışman Hocam Sayın Prof. Dr. Kemal ALTAŞ'a en içten teşekkür saygı ve sonsuz minnet duygularımı sunarım.

Tezimde ve Mikrobiyoloji Biliminde bana yol gösteren, yeni ufuklar açan Hocam Sayın Prof. Dr. Gülden YILMAZ'a en içten teşekkür saygı ve sonsuz minnet duygularımı sunarım.

Tezimde bana yol gösterip beni yönlendiren Hocam Sayın Prof. Dr. Funda BABACAN'a en içten teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Eğitimimde ve yetişmemde emeği geçen Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Müzeyyen MAMAL TORUN'a teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Anabilim Dalımızda bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Sayın Prof. Dr. Yaşar BAĞDATLI, Prof. Dr. Mustafa SAMASTI, Prof. Dr. Salih TÜRKOĞLU, Prof. Dr. Bekir KOCAZEYBEK, Prof. Dr. Ayşen GARGILI, Prof. Dr. Arif KAYGISIZ, Doç. Dr. Gökhan AYGÜN, Doç. Dr. Nevriye GÖNÜLLÜ, Doç. Dr. Ömer KÜÇÜKBASMACI, Doç. Dr. Hırısı BAHAR'a teşekkürü bir borç bilirim.

Eğitimim ve tez çalışmalarım sırasında bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım bana her zaman bir ağabey kadar yakın olmuş ve yol göstermiş olan Uzm. Dr. Kenan MİDİLLİ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, moleküler mikrobiyoloji laboratuvarında bulduğum huzurlu, işbirliğine açık ve verimli çalışma ortamındaki katkılarından dolayı Dr. Sevgi ERGİN'e, Lab. Şerif'e BOZYEL ve Lab. Canan KANBAK'a teşekkür ederim.

Yaşamım boyunca sevgi ve desteklerini esirgemeyen Aileme gösterdikleri sabır ve anlayıştan dolayı sonsuz minnet duygularımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tüm Doktora sürecimde yanımda bana destek olan ve bu süreç içerisinde hayatımı birleştirdiğim biricik eşim, hayat arkadaşım Dr. Ayşegül ÇINAR'a tüm desteği ve sıcaklığı için sonsuz minnet duygularıyla beraber teşekkürlerimi sunarım

Mert Ahmet Kuşkucu

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.
BEYAN	İİ
İTHAF	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	Vi
TABLolar LİSTESİ	Viii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xi
ÖZET	Xiv
ABSTRACT.....	Xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Tarihçe	4
2.2. Sınıflandırma	6
2.3. Viryon Yapısı	7
2.4. Genom Yapısı ve Organizasyonu	9
2.5. Viral Proteinler	11
2.5.1. Yüzey Proteinleri	11
2.5.2. C Proteinleri.....	12
2.5.3. Polimeraz Proteini.....	13
2.5.4. X Proteini.....	13
2.6. HBV'nin Replikasyon Stratejisi	13
2.7. HBV'nin Epidemiyolojisi	17
2.8. HBV'nin Patogenezi	20
2.9. HBV İnfeksiyonlarının Klinik Seyri.....	22
2.10. HBV İnfeksiyonlarının Tanımı.....	26
2.11. HBV İnfeksiyonlarının Tedavisi	28
2.12. HBV İnfeksiyonlarından Korunma.....	29
2.13. HBV'nin Mutantları.....	30
2.13.1. Prekor/Kor ve X Gen Bölgesi Mutasyonları	31

2.13.2. Yüzey Proteini Mutasyonları.....	33
2.13.3. Polimeraz Geni Mutasyonları.....	36
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	37
3.1. Gereçler.....	37
3.1.1. Kullanılan Cihazlar ve Aletler.....	37
3.1.2. Kullanılan Kimyasal ve Sarf Malzemeleri.....	37
3.1.3. Kullanılan Yazılımlar.....	39
3.2. Örneklerin Toplanması.....	39
3.3. Örneklerden Nükleik Asit Saflaştırılması.....	40
3.4. Örneklerde HBV DNA Varlığının PCR Yöntemi ile Belirlenmesi ve Viral Yüklerin Real Time PCR ile Tayini.....	41
3.5. Örneklerin “Immuno-Real Time PCR” Testleri.....	44
3.6. Örneklerin DNA Dizi Analizi ve “a” Determinantı Mutasyonlarının Belirlenmesi.....	49
4. BULGULAR.....	52
4.1. Örnek Gruplarının HBV DNA ve Viral Yük Sonuçları.....	52
4.2. Örneklerin “Immuno-Real Time PCR” Sonuçları.....	55
4.3. Örneklerin DNA Dizi Analizi ve “a” Determinantı Mutasyonları.....	59
5. TARTIŞMA.....	62
KAYNAKLAR.....	72
HAM VERİLER.....	81
ÖZGEÇMİŞ.....	88

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1. İnsanda hepatit etkeni olan temel etiyolojik viral ajanlar ve bulaşma yolları.

Tablo 2. *Hepadnaviridae* ailesi üyelerinin genel özellikleri

Tablo 3. Hepatit B'nin kliniği ile ilişkili sık kullanılan bazı terimler ve HBV enfeksiyonun farklı şekilleri için tanı ölçütleri

Tablo 4. HBV'nin S bölgesi antijenik belirteçlerinin protein dizilerine göre serotip ayırmaları.

Tablo 5. Semi nested PCR ve DNA dizi analizi için kullanılan primerler

Tablo 6. Semi nested PCR - Birinci Aşama Bileşenleri

Tablo 7. Semi nested PCR - Birinci Aşama PCR Programı

Tablo 8. Semi nested PCR - İkinci Aşama Bileşenleri

Tablo 9. Semi nested PCR - İkinci Aşama PCR Programı

Tablo 10. “Immuno-Real Time PCR” için kullanılan primerler ve prob

Tablo 11. “Immuno-Real Time PCR” testi, Real Time PCR Bileşenleri

Tablo 12. Real Time PCR Programı

Tablo 13. PCR ürünlerinin saflaştırılması için kullanılan bileşenler

Tablo 14. PCR ürünlerinin saflaştırılması için kullanılan PCR Programı

Tablo 15. Döngüsel Dizileme Reaksiyonları Bileşenleri

Tablo 16. Döngüsel Dizileme Reaksiyonları PCR Programı

Tablo 17. “Hepatit B Pozitif” örnek grubunun Semi nested PCR ile HBV DNA sonuçları.

Tablo 18. “Hepatit B Negatif” örnek grubunun Semi nested PCR ile HBV DNA sonuçları.

Tablo 19. İzole anti-HBc pozitif örnek grubunun Semi nested PCR ile HBV DNA ve viral yük sonuçları.

Tablo 20. “Immuno-Real Time PCR” Test Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Tablo 21. İzole anti-HBc pozitif örnek grubu “Immuno-Real Time PCR” test sonuçları.

Tablo 22. Vakalara Ait Polimeraz geni (10-234. Aminoasitler Arası) ve S Geni (1-226. Aminoasitler Arası) DNA Dizi Analizi toplu sonuçları.

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. HBV ile ilişkili yapılar (A. Viryon, Dane Partikülü. B. Filemantöz Partikül. C. Küresel Partikül. D. Bu yapıların elektronmikrografı) (27 ve 55. kaynaklardan derlenmiştir).

Şekil 2. HBV'nin genom yapısı (78)

Şekil 3. HBV'nin replikasyonu (27. Kaynaktan değiştirilerek alınmıştır)

Şekil 4. HBV'nin dünya üzerinde dağılımı (Kırmızı yüksek, sarı orta ve yeşil düşük endemi bölgeleri, CDC verileri)

Şekil 5. HBV'nin patogenezi ve bağışık yanıt (36)

Şekil 6. HBV Serolojisi (<http://www.mcb.uct.ac.za/cann/335/HBV.html> Sitesinden ve 55. kaynaktan düzenlenmiştir)

Şekil 7. “a” determinantı ve MHR bölgesi (35. Kaynaktan değiştirilerek alınmıştır)

Şekil 8. “Immuno-Real Time PCR” Aşamaları

Şekil 9. Semi nested PCR jel elektroforez görüntü sonuç örneği (Sol taraf Pozitif, Sağ taraf Negatif sonuçlar)

Şekil 10. Negatif ve pozitif kontrol gruplarına ait “Immuno-Real Time PCR” testi kontrol ve optimizasyon test sonuçlarının amplifikasyon eğrileri.

Şekil 11. HBsAg Dilüsyon Dağılımı (400.000 pg - 1 pg) Amplifikasyon eğrileri

Şekil 12. HBsAg miktarlarının negatif logaritmaları ve “Immuno-Real Time PCR” sonucu elde edilen Ct değerleri ile çizilen standart eğri

Şekil 13. BioEdit 7.0.9.0 program paketi içindeki “DNADist-NEIGHBOR phlogenetic tree” yazılımı kullanılarak komşu eklemleme yöntemi “Neighbour Joining” ile çizilen filogenetik ağaç.

Şekil 14. Hastaların ve Genotip D Prototiplerinin “a” Determinat Protein ve DNA Dizileri.

Şekil 15. 9. Örnekte “Stop” Kodon

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

Anti-HBc	:	Hepatit B Kor Antikoru
Anti-HBe	:	Hepatit B e Antikoru
Anti-HBs	:	Hepatit B Yüzey Antikoru
BCP	:	"Minimal" veya "Basic Core Promoter"
cccDNA	:	Covalently closed circular DNA
CDC	:	"Centers for Disease Control and Prevention"
CMV	:	Cytomegalovirüs
CURS	:	"Core Upstream Regulatory Sequence"
D.S.Ö.	:	Dünya Sağlık Örgütü
DHBV	:	Duck Hepatitis B virüs
DNA	:	Deoksiribonükleik Asit
DR	:	"Direct repeat sequences"
EBV	:	Epstein-Barr Virüsü
ELISA	:	Enzim Bağlı İmmün Assay
EN I	:	"Enhancer I"
EN II	:	"Enhancer II"
GSHV	:	"Ground Squirrel Hepatitis virüs"
HAV	:	Hepatit A Virusu
HBcAg	:	Hepatit B Kor Antijeni
HBeAg	:	Hepatit B e Antijeni
HBIG	:	Hepatit B hiperimmün globulini
HBsAg	:	Hepatit B Yüzey Antijeni
HBV	:	Hepatit B Virusu
HCV	:	Hepatit C Virusu

HDV	:	Hepatit D Virusu
HEV	:	Hepatit E Virusu
HGV	:	Hepatit G Virusu
HHBV	:	Herons Hepatitis B virüs
HNF	:	Hepatonükleer Faktör
Il	:	Interlökin
kDa	:	Kilodalton
LHBs	:	Büyük zarf proteini
M.Ö.	:	Milattan Önce
MHBs	:	Orta yüzey proteini
MHR	:	Major Hidrofilik Bölge
ml	:	Mililitre
mRNA	:	Ulak Ribonükleik Asit
nm	:	Nanometre
NPD	:	Negatif Prediktif Değer
NRE	:	Negatif Regulatory Element
ORF	:	Açık Okuma Çerçevesi “Open Reading Frame”
PCR	:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu “Polymerase Chain Reaction”
pg	:	Pikogram
PPD	:	Pozitif Prediktif Değer
RT	:	“Reverse Transcriptaz”
SHBs	:	Temel zarf proteini
TTV	:	TT Virüsü
WHV	:	Woodchuck Hepatitis virüs
µl	:	Mikrolitre

Ala	:	Alanin (A)
Arg	:	Arginin (R)
Asn	:	Asparajin (N)
Asp	:	Aspartik Asit (D)
Cys	:	Sistein (C)
Gln	:	Glutamin (Q)
Glu	:	Glutamik Asit (E)
Gly	:	Glisin (G)
His	:	Histidin (H)
Ile	:	İzolösin (I)
Leu	:	Lösin (L)
Lys	:	Lizin (K)
Met	:	Metyonin (M)
Phe	:	Fenilalanin (F)
Pro	:	Prolin (P)
Ser	:	Serin (S)
Thr	:	Trionin (T)
Trp	:	Triptofan (W)
Tyr	:	Tirozin (Y)
Val	:	Valin (V)
Stop	:	Bitiş kodonu (*)
A	:	Adenin
G	:	Guanin
C	:	Sitozin
T	:	Timin

ÖZET

Kuşkucu, M.A. (2008). İzole Anti-HBc Pozitif Hastalarda İmmuno-Real Time PCR ile HBsAg Saptanması ve “a” Determinantı Mutasyonlarının İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Doktora Tezi. İstanbul.

Hepatit B Virüsü (HBV), *Hepadnaviridae* ailesi üyesi zarflı bir DNA virüsüdür. Dünyada 2 milyar kişinin HBV ile infekte olduğu tahmin edilmektedir. Taşıyıcıların %20-25’inde siroz ve hepatosellüler karsinom dahil olmak üzere kronik karaciğer hastalıkları gelişebilmektedir. HBV’de de diğer virüsler gibi mutasyonlar oluşabilmektedir. Bu mutasyonlar immuno dominant “a” antijenik determinantını da içine alan bölgelerde oluşabilmektedir. Bu mutantlar, aşılanmış kişilerde, HBIG tedavisi almış kişilerde ve kronik hepatit B hastalarında gösterilmiştir. Bazı hastalarda bu mutasyonlar, anti-HBs antikorlarıyla bir arada bulunabilirler.

Bu çalışmada izole anti-HBc pozitif hastalarda HBsAg’yi “Immuno-Real Time PCR” yöntemi ile saptamayı ve “a” antijenik determinantının mutasyonlarını belirlemeyi amaçladık. Bu amaçla, HBsAg’yi daha duyarlı saptayabilecek yeni bir “Immuno-Real Time PCR” protokolünü optimize ettik. Üç ana örnek grubu incelendi; serolojik olarak hepatit B pozitif grup (30 örnek), hepatit B negatif grup (30 örnek) ve izole anti-HBc pozitif grup (24 örnek). Optimize ettiğimiz, “Immuno-Real Time PCR” protokolünün analitik duyarlılığını klasik ELISA (200-400 pg/ml) yönteminden 20-40 kat daha (10 pg/ml) yüksek bulduk. Testin yapılan optimizasyon ve kontrol çalışmalarından sonra, tanısal kullanım açısından testin pozitif prediktif değerini %100, negatif prediktif değerini %100, duyarlılığını %100 ve özgüllüğünü %100 olarak bulduk. “Immuno-Real Time PCR” yöntemi için anti-HBs kaplı manyetik boncuklar kullandık. HBV DNA değerlerini Real Time PCR yöntemi ile belirledik. “a” antijenik determinantı mutasyonları için izole anti-HBc pozitif örneklerden HBV DNA pozitif olanların, DNA dizi analizi ile incelendi. İzole anti-HBc pozitif örneklerde HBV DNA pozitif olanların (%33) biri dışında (bu örnekte prematür S proteinine neden olan stop kodon oluşum mutasyonu vardı) tümü “Immuno-Real Time PCR” yöntemi ile HBsAg pozitif bulundu. Erken “stop” kodonu mutasyonu saptanan örnek dışındaki örneklerde . “a” antijenik determinantında antijenik değişikliklerle ilişkili olabilecek mutasyon saptanmadı. Sonuç olarak optimize ettiğimiz “Immuno-Real Time PCR” yöntemini ELISA testlerinden daha duyarlı bir yöntem olarak bulunurken “a” antijenik determinantında dünyada ilk olarak C137 erken ”stop” kodon mutasyonu saptadık.

Anahtar Sözcükler: HBV, anti-HBc, Mutasyon, Immuno-Real Time PCR, “a” Determinant

ABSTRACT

Kuşkucu, M.A. (2008). Detection of HBsAg in Isolated Anti-HBc Positive Patients with Immuno-Real Time PCR and Investigation of “a” Determinant Mutations. Istanbul University, Institute of Health Science. Istanbul University, Cerrahpasa School of Medicine, Microbiology and Clinical Microbiology. Doctora Thesis. Istanbul.

HBV is a double-stranded, enveloped DNA virus of the *Hepadnaviridae* family. It is estimated that around 2 billion people are infected with the hepatitis B virus (HBV). Approximately 20% to 25% of carriers develop chronic liver disease, including cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Due to the low fidelity of the polymerase, the high replication rate, and overlapping reading frames, mutations occur throughout the HBV genome, including the immunodominant “a” determinant of the viral envelope gene, which result with HBsAg mutants. These mutants have been described in HBV vaccine and/or hepatitis B immune globulin recipients, and in patients with underlying chronic conditions. In some patients HBsAg and anti-HBs may be found simultaneously.

In this study we aimed to detect HBsAg in isolated anti-HBc positive patients with “Immuno-Real Time PCR” and investigate “a” determinant mutations. For this purpose we optimized a new “Immuno-Real Time PCR” for sensitive detection of HBsAg. Three groups were included to the study: Serologically hepatitis B positive group (30 samples), Serologically hepatitis B negative group (30 samples) and isolated anti-HBc Positive Group (24 patients). The analytic sensitivity of “Immuno-Real Time PCR” had been estimated as 10 pg/ml. This was 20-40 fold higher than those of the available commercial ELISA kits. PPV, NPV, sensitivity and specificity were all 100 %. Anti-HBs coated magnetic beads were used in “Immuno-Real Time PCR” method. HBV DNA levels were determined with quantitative Real Time PCR. “a” determinant mutations in isolated anti-HBc and HBV DNA positive samples were investigated using DNA sequencing. All but one patient with isolated anti-HBc were positive for HBsAg and one of them harbored a premature stop codon leading truncation in S protein. As a conclusion we found “Immuno-Real Time PCR” is more sensitive than commercially available ELISA assays. C137 premature stop codon mutation in “a” determinant is first time defined in this study.

Key Words: HBV, Anti-HBc, Mutation, Immuno-PCR, “a” Determinant

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hepadnaviridae (Hepatitis Associated DNA Virus) ailesinin bir üyesi olan hepatit B virüsü (HBV) küçük, zarflı, yaklaşık 3,2 kb'lık DNA genomuna sahip bir virüstür. Bu aile içinde *Ortohepadnavirus* cinsinde yer alır. HBV genomu kısmen çift iplikli, küçük, halka şeklinde olup prekor/kor (HBcAg, HBeAg), yüzey veya zarf (S, HBsAg), polimeraz (P) ve X proteini olmak üzere dört protein kodlar. HBV'nin zarfı, konak hücrenin lipid membranından ve üç viral glikoproteinden (küçük veya temel yüzey proteini "S = small", orta yüzey proteini "M = medium" ve büyük yüzey proteini "L = large") oluşur. S proteini, bu üç partikül formu içinde, zarfta en baskın bulunan proteindir ve ortak "a" antijenik belirleyicisini taşır. S proteini, bu sebeple, hepatit B yüzey antijeni (HBsAg) olarak da anılmaktadır. HBsAg, infekte hastanın kanında 300 µg/ml düzeyine kadar ulaşabilmektedir ve HBV infeksiyonlarının tanısında temel belirteç olarak kullanılmaktadır (5, 42, 66, 78).

Evrım, tüm virüslerde farklı hızlarda ve boyutlarda gerçekleşir. *Hepadnaviridae* ailesi üyeleri DNA virüsü olarak sınıflandırılmalarına karşın, yaşam döngülerinde, genom replikasyonu sırasında ters transkriptaz ("Reverse Transcriptaz", RT) enzimi ile pregenomik RNA'yı kalıp olarak kullanarak DNA sentezler. Böylelikle DNA virüsü olmalarına karşın, mutasyon oranları DNA virüslerinden yüksek, RNA virüslerinden ise daha düşük düzeydedir. Bu oran HBV için nükleotid pozisyonu başına yıllık 2×10^{-5} olarak hesaplanmıştır.

HBsAg, HBcAg ve HBeAg virüse ait antijenik yapılardır. Bu yapılardan HBcAg zarf ile sarılı olduğundan klasik ELISA testleri ile saptanamaz. Bağışıklık sistemi bu antijenik yapılara karşı yanıt olarak anti-HBs, anti-HBc ve anti-HBe antikorlarını üretir. Bu antikorlar ELISA testleri ile saptanabilmektedir. Sayılan tüm bu antijen ve antikorlar HBV infeksiyonlarının tanımı için kullanılmaktadırlar.

Yüzey ya da zarf proteinlerini kodlayan genlerde (preS1, preS2 ve S) oluşacak mutasyonlar virüsün bağışıklık sistemi tarafından tanınmasını engelleyebilir. Bu genlerde oluşacak mutasyonlar rutin kullanılan aşılarda, mutant tip virüs üzerine etkili olabilmelerini engelleyebilir (5, 32, 33, 35, 42, 66, 78). Yüzey proteinlerini kodlayan genlerdeki mutasyonları taşıyan HBV kökenleri ile meydana gelecek infeksiyonlarda tanım yöntemi olarak seroloji testleri kullanışlı olmayacaktır. Genel olarak bu hastalarda

HBsAg saptanamazken HBsAg'ye karşı yanıt, yani anti-HBs de saptanamamaktadır. HBeAg ve anti-HBe'nin de negatif olabileceği bu gibi durumlarda sadece anti-HBc antikorları pozitif olabilir. Bu durum izole anti-HBc pozitif ayrı bir hasta grubunun oluşmasına neden olabilir. Anti-HBc IgG akut infeksiyon döneminde pozitifleştiği ve hayat boyu saptanabildiği için akut, kronik veya önceden geçirilmiş HBV infeksiyonun göstergesidir ve kişinin HBV ile karşılaşmış olduğunu gösterir. Bazı hastalarda HBV infeksiyonunun kanıtı olarak sadece anti-HBc IgG saptanabilir. Diğer serolojik göstergeler olmaksızın saptanan salt anti-HBc IgG antikorları; uzamış pencere dönemini, HBsAg'nin saptanamayacak kadar düşük olduğu kronik HBV infeksiyonlarını, mutant virüslerle oluşmuş ve bu nedenle ticari kitlerle HBsAg'nin saptanamadığı kronik infeksiyonları gösterebilir. Çok eskiden geçirilmiş ve iyileşmiş HBV infeksiyonlarından sonra anti-HBs antikorlarının saptanamayacak düzeye inmesi nedeni ile izole anti-HBc pozitifliği oluşabildiği gibi HIV infeksiyonlarda bağışıklık sisteminin baskılanması ya da HDV süperinfeksiyonunda HBsAg yapımının baskılanması da izole anti-HBc pozitif hasta grubunun oluşmasına neden olabilir.

Düşük viremi ile seyreden infeksiyonlarda HBsAg miktarı, serumda ELISA yöntemi ile saptanabilecek değerlerin altına inebilir. Bu gibi hastalarda virüsün varlığı ancak moleküler yöntemler ile gösterilebilir. Bu hastalar virüsü başka insanlara bulaştırma açısından risk oluşturlar (5, 42, 66, 78).

Bu nedenlerle tez çalışmasında ELISA yöntemi ile izole anti-HBc pozitifliği olan hastalarda bu durumun neden kaynaklandığını belirlemeyi amaçladık. Düşük viremi durumunda hasta serumunda bulunabilecek HBsAg'yi saptayabilmek için klasik ELISA testlerinden daha duyarlı yeni bir yöntem olan "Immuno-Real Time PCR" yöntemini optimize etmeyi amaçladık. Bu amaçla örneklerde vireminin varlığını PCR ile, vireminin düzeyini de Real-Time PCR ile belirlemeyi planladık. "Immuno-Real Time PCR" yönteminin optimizasyonu için 30'ar örnekten oluşan HBV pozitif ve HBV negatif kontrol grubu oluşturarak yöntemin etkinliğini araştırmayı, HBsAg'nin bilinen konsantrasyonları ile de yöntemin analitik duyarlılığını belirlemeyi amaçladık. Tez çalışması sırasında toplanacak izole anti-HBc pozitifliği olan hasta örneklerinde, HBV DNA saptanması durumunda bu durumun "a" antijeni determinantını kodlayan S genindeki mutasyonlar nedeni olup oluşmadığını araştırmayı amaçladık. Bu amaçla, izole anti-HBc pozitifliği olan hastalarda, semi nested PCR ile çoğaltım sonrası DNA

dizi analizi ile S geninin yapısını araştırmayı planladık (31, 56, 60, 61, 97). Hasta grubunda vireminin miktarının belirlenmesi ve HBV DNA varlığının kanıtlanması için standart test olarak etkinliği kanıtlanmış ve anabilim dalımızda rutin HBV DNA kantitasyon testi olarak kullandığımız COBAS TaqMan® 48 (F. Hoffmann-La Roche Ltd Group Headquarters Grenzacherstrasse 124 CH-4070 Base, İsviçre) testini referans yöntem olarak seçtik.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Günümüzde viral hepatitlerden sorumlu ajanların başında hepatit A virüsü (HAV), Hepatit B virüsü (HBV), Hepatit C virüsü (HCV) ve Hepatit D virüsü (HDV) gelmektedir (Tablo 1) (42, 58). Hepatit E virüsü (HEV) belli coğrafyalarda salgınlara neden olabilirken, hepatit G virüsü (HGV), TTV, SEN virüs gibi ajanların da viral hepatitlerin etiyolojisinde rollerinin olabileceği düşünülmekte, yine Epstein-Barr virüs (EBV), sitomegalovirus (CMV) ve enterovirus gibi virüslerin de inflamatuvar karaciğer hasarına yol açabileceği bilinmektedir. Hepatit hastalarının yaklaşık %10'luk grubunun nedeni ise hala belirsizdir (30, 42, 58, 64).

Tablo 1. İnsanda hepatit etkeni olan temel etiyolojik viral ajanlar ve bulaşma yolları.

İnsan Viral Hepatitlerinden Sorumlu Temel Etiyolojik Ajanlar		
Parenteral Yolla Bulaşanlar		Enterik (fokal-oral) Yolla Bulaşanlar
- HBV		- HAV
- HCV		- HEV
- HDV		
- HGV		

Viral hepatitler, ilk tanımlandıkları M.Ö. 5. yüzyıldan bu güne çok etkenli hastalıklar grubunu oluşturmaktadır. Epidemik sarılığın tarihi Babil Yazıtları (M.Ö. 5. yy) ve Hipokrat'a (M.Ö. 460-375) kadar dayansa da serum hepatitinin tarihi çok daha kısadır (48, 55, 78). Tarih boyunca özellikle 19. ve 20. yüzyıllarda değişik savaşlar süresince sarılık salgınları bildirilmiştir. Bu salgınlarda çoğunda etken HAV olmakla

birlikte, HBV'nin de kan ürünlerinin kullanımının yaygın olduğu durumlarda salgınlar yaptığı gözlenmiştir (55, 78).

Sarılığın kan ve kan ürünleri ile bulaşan şekli ilk kez 1883'te Almanya Bremen'de Lurman tarafından çiçek aşısı kampanyası sırasında tersane çalışanları arasında çıkan salgın sonucunda tanımlanmıştır. Aşılanan 1298 tersane çalışanından 191 (%15)'inde 8 ay sonra sarılık gelişmesine karşın aşılanmayan personelde sarılık gelişmediği gözlenmemiştir. Yirminci yüzyılın ilk yarısında bu uzun inkübasyon süreli hepatit için aralarında cinsel yolla bulaşan hastalıklar, tüberküloz ve diyabet kliniklerinde yatan veya buralara başvuran hastalar, çoğul kan transfüzyonu yapılan hastalar, kızamık, kabakulak gibi hastalıklar için tedavi ya da koruma amacıyla nekahat dönemindeki hastaların serumları uygulanan hastaların ve sarıhumma aşısı uygulanan kişilerin yer aldığı risk grupları tarif edilmiştir (48, 55, 78, 86).

1930 ve 40'lı yıllarda gönüllüler üzerinde yapılan çalışmalar, viral sarılığın etiolojisinde en az iki etkenin rolü olduğunu ortaya koymuştur. 1947'de Mac Callum ve Bauer infeksiyöz hepatit için hepatit A terimini, homolog serum hepatiti için de hepatit B terimini kullanmışlardır. Epidemiyolojik açıdan farklılıklar gösteren bu iki hepatit türünde hepatit A'nın fekal-oral yol ile bulaştığı, kuluçka süresinin 2-6 hafta olduğu ve birincil olarak küçük çocuklarda infeksiyona neden olduğu; B tipi hepatitte ise kuluçka süresinin daha uzun olduğu (2-6 ay) ve genelde yetişkinlerde infeksiyon yaptığı gözlenmiştir. Bu gözlemler Wilowbrook Enstitüsü'nde Krumarg ve arkadaşlarının 1960 ve 70'li yıllarda yaptıkları çalışmalarla desteklenmiştir (48). Bu araştırmacılar MS1 ve MS2 diye iki farklı tip hepatit tarif etmişlerdir. Bunlardan MS1, Mac Callum ve Bauer'in tarif ettiği A tipi hepatit formuna, MS2 ise B tipi hepatit formuna uymaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün "Scientific Group of Viral Hepatitis" adlı çalışma grubu da bu terimleri 1973'te kabul etmiş ve kullanmaya başlamıştır (48, 55, 78).

Sonraki yıllarda Blumberg'in Avustralya Antijeni'ni (hepatit B yüzey antijeni, HBsAg) bulması ile hepatit B konusundaki çalışmalarda çığır açılmış, sonraları geliştirilen özgül serolojik testler sayesinde hepatit A ve hepatit B arasında kuluçka süresinden daha güvenilir ayırım ölçütlerinin geliştirilmesi sağlanmıştır (48, 55, 78, 86).

Bugün dünyada 2 milyar kişinin hayatının bir döneminde bu virüs infeksiyonunu geçirdiği, 350 milyon kişinin yine bu virüsle kronik olarak infekte olduğu ve bu virüsün

neden olduğu infeksiyonlar nedeni ile yılda 1-2 milyon kişinin hayatını kaybettiği hesaplanmaktadır (54).

2.2. Sınıflandırma

Hepadnaviridae (Hepatitis Associated DNA Virus) ailesinin üyesi olan HBV, bu aile içinde *Ortohepepadnavirus* cinsi içinde yer alan, küçük, zarflı, yaklaşık 3,2 kb'lık DNA genomuna sahip bir virüstür. Bu ailenin prototipini oluşturmaktadır. Bu ailenin diğer üyeleri kemirgenlerde infeksiyona neden olan WHV (Woodchuck Hepatitis virüs), GSHV (Ground Squirrel Hepatitis virüs) ile kanatlılarda infeksiyona yol açan DHBV (Duck Hepatitis B virüs)'dur. Bunların yanında bazı maymun türlerini, bazı balıkçıl türlerini (Herons Hepatitis B virüs, HHBV) ve diğer konakları infekte edebilen daha az tanınmış virüsler yine bu aile içinde yer alırlar (Tablo 2) (8, 48, 76, 78).

HBV, WHV ve GSHV arası %70 DNA dizi homolojisi bulunmasının yanı sıra WHV ve GSHV kendi konakları dışında başka primatları ve insanı infekte edememekte, HBV ise insan dışında şempanzelerde infeksiyona neden olabilmektedir. DNA dizi homolojileri ve memelilerde infeksiyon yapmaları nedeniyle bu virüsler, *Hepadnaviridae* ailesi içinde *Ortohepepadnavirus* cinsinde toplanmışlardır. DNA dizisi bakımından homoloji göstermeyen ve infekte ettiği konaklar ördek, kaz gibi kanatlılar olan DHBV ise bu aile içinde *Avihepadnavirus* cinsi içinde yer alır (4, 7). *Hepadnaviridae* ailesi üyesi virüslerin ortak özellikleri, dar konak spektrumuna sahip olmaları ve ağırlıklı olarak hepatotropizm göstermeleridir. Bu virüsler benzer viryon yapısı gösterirler, gevşek sirküler, kısmen çift iplikli DNA genomuna sahiptirler ve sıra dışı bir genom replikasyon stratejileri vardır (8, 48, 76, 78).

Tablo 2. *Hepadnaviridae* ailesi üyelerinin genel özellikleri

	<i>Ortohepadnavirus</i>			<i>Avihepadnavirus</i>
	HBV	WHV	GSHV	DHBV
Viryon Boyutu	42 nm	40-42 nm	40-42 nm	46-48 nm
Genom Boyutu	3.2 kb	3.3 kb	3.3 kb	3.0 kb
Viral DNA	Eksik	Eksik	Eksik	Tam
Zarf Proteinleri	L,M, S	L,M,S	L,M,S	L,S
ORF'leri	S, C, P, X	S,C,P,X	S, C, P,X	S, C, P
Konak	İnsan	Dağ Sıçanı	Yer Sincabı	Ördek
	Şempanze		Dağ Sincabı	Kaz
			Amerika Sincabı	Balıkçıl
Replikasyon Bölgeleri	Karaciğer	Karaciğer	Karaciğer	Karaciğer
	Böbrek	Böbrek		Böbrek
	Pankreas	Pankreas		Pankreas
	Lökositler	Lökositler		Dalak
	Aseptomatik taşıyıcılık	Aseptomatik taşıyıcılık	Aseptomatik taşıyıcılık	Aseptomatik taşıyıcılık
Klinik	Hepatit	Hepatit	Hepatit	Hepatit
	Siroz	Hepatoselüler karsinom	Hepatoselüler karsinom	
Coğrafi Dağılımı	Tüm Dünya	Doğu A.B.D.	California	Çin
				A.B.D.

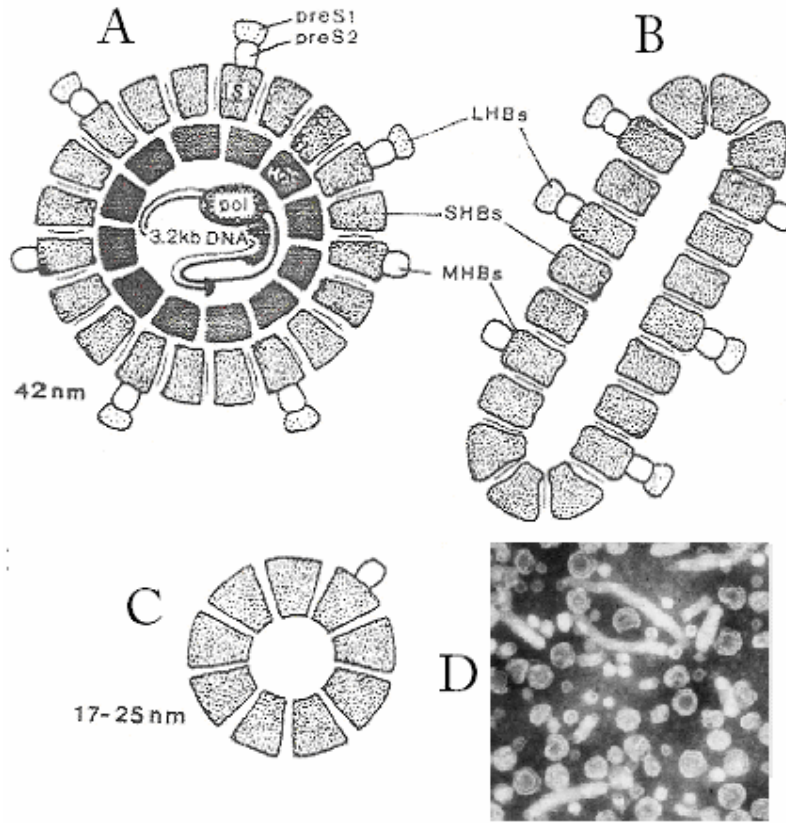
2.3. Viryon Yapısı

İnfekte bir hastanın kanında virüsle ilişkili 3 tip partikül bulunabilir (Şekil 1) bunlar (8, 48, 55, 76, 78):

- 42 nm çapında çift kabuklu partiküller; bulan kişinin adının verildiği Dane partikülleri
- 22 nm çapında küresel partiküller

- 22 nm çapında fakat değişik uzunluklardaki filamentöz partiküller

Şekil 1. HBV ile ilişkili yapılar (A.Viryon, Dane Partikülü; B. Filemantöz Partikül; C. Küresel Partikül; D. Bu yapıların elektronmikrografı) (27 ve 55. kaynaklardan derlenmiştir).



Dane partikülü, HBV'nin infeksiyöz viryon formudur ve serumda bulunması karaciğerde aktif viral replikasyonun göstergesidir. Dane partikülü 27 nm'lik iç kor (öz) partikülünü veya nükleokapsidi çevreleyen lipoprotein zarftan oluşur. Nükleokapsidin içinde viral DNA, buna bağlı viral polimeraz ve konak hücre kaynaklı protein kinaz bulunur. Küresel ve filamentöz partiküller ise yalnızca lipoprotein zarf içerirler ve bunlarda nükleokapsid ve genomik DNA bulunmaz dolayısıyla infeksiyöz değildirler

(Şekil 1). Bazı kronik infeksiyon formlarında sadece bu küresel ve filamentöz partiküller bulunabilir (8, 48, 55, 76, 78).

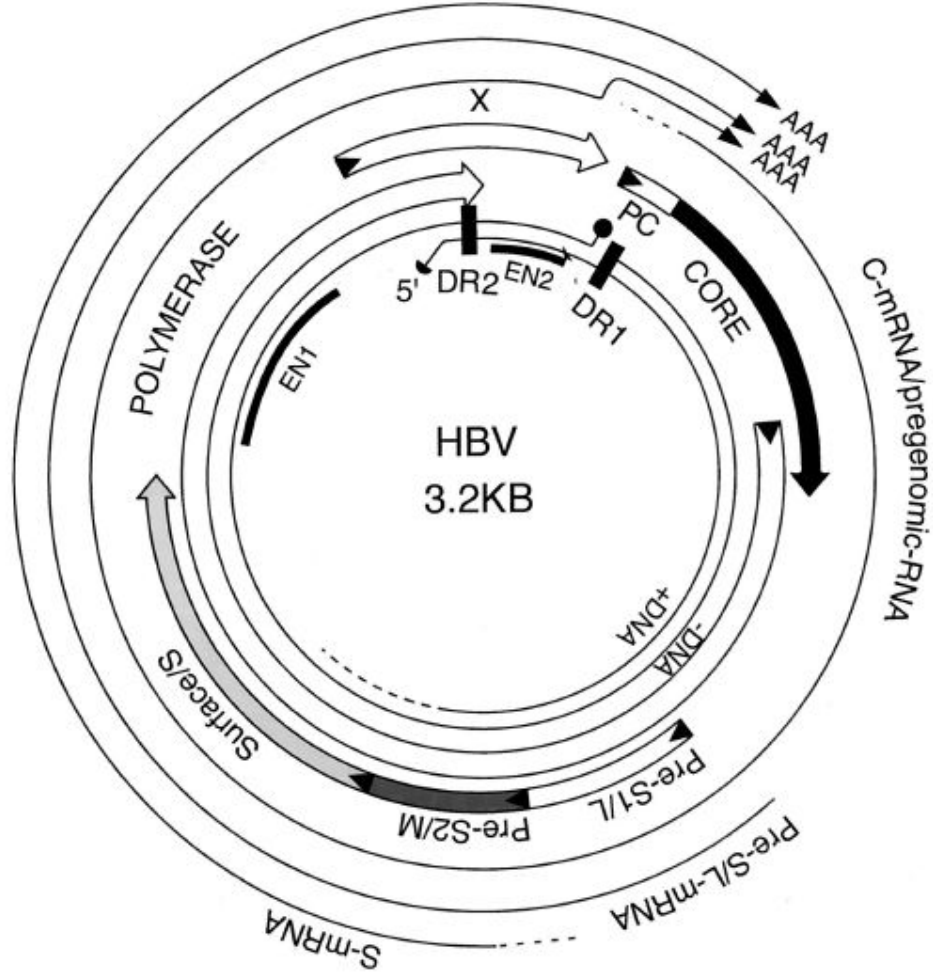
Nükleokapsid, fosforile olmuş 21 kd'luk kapsid proteinini (kor proteini, c) içerir. Bu protein aynı zamanda hepatit B kor antijeni (HBcAg) olarak ta anılmaktadır. Elektron mikroskopisi ile yapılan çalışmalarda nükleokapsidin dimer kümelerinden meydana gelen ve 180-240 alt birimden oluşan ikozohedral yapı gösterdiği gösterilmiştir. Dimer kümeleri, viral partikül yüzeyine dikensi çıkıntılar yaparlar. Bu dikensi çıkıntıların üst tarafı C proteininin immunodominant kısmını oluşturur. HBsAg ve HBcAg antijenlerinin yanı sıra infekte hücrelerden salgılanan üçüncü bir antijen daha bulunmaktadır, hepatit B e antijeni (HBeAg). Bu antijenin kanda bulunuşu infeksiyöz viryon yapımını gösterir (8, 48, 55, 76, 78).

Saflaştırılmış nükleokapsid partikülünün içinde protein kinaz aktivitesi gösterilmiştir. Bu enzim C proteinini *in vitro* fosforilleme aktivitesine sahiptir. Son dönemde 46 kd'luk hücresel kinazın hücre içi nükleokapsid ve hücre dışı 42 nm çapındaki viryonun içinde bulunan protein kinaz aktivitesinden sorumlu olduğu gösterilmiştir. Hücre içi gliseralehit 3 fosfat dehidrogenaz enziminin de HBV'nin yaşam döngüsünde yardımcı görev üstlenebileceği söylenmiştir (8, 20, 48, 55, 76, 78).

2.4. Genom Yapısı ve Organizasyonu

HBV kısmen çift iplikli küçük, halka şeklinde bir DNA genomuna sahiptir. Negatif polariteli uzun iplik (negatif iplik) ve pozitif polariteli kısa iplik (pozitif iplik) 5' uçlarında taşıdıkları 224 komplementer bazla bir üst üste binme yaparlar. Bu üst üste binmeler, ipliklerin negatif polariteleriyle birlikte, DNA'nın dairesel hal almasına olanak sağlarlar. Negatif iplik, 5' ucuna kovalan bağlı, terminal protein olarak isimlendirilmiş bir proteinle birlikte yaklaşık 3200 nükleotid uzunluğundadır. Pozitif ipliğin 5' ucu daima aynı pozisyona, negatif ipliğin 5' ucunun yaklaşık 200 nükleotid ötesine yapışır. Pozitif iplik 1700 nükleotitten 2800 nükleotide kadar değişen değişik uzunluklarda olabilir, tek iplikli bölgenin uzunluğu ise genel olarak 650-700 nükleotid civarındadır (Şekil 2) (8, 48, 55, 66, 76, 78).

Şekil 2. HBV'nin genom yapısı. (78)



HBV genomunun viral polimerazı (P), kor (c) proteini (HBcAg) ve hepatit B e antijenini (HBsAg), yüzey (S) veya zarf proteinlerini ve X proteinini (X) kodlayan 4 bölgesi (Open Reading Frame = ORF) bulunmaktadır (Şekil 2). HBV'de ORF'lerin kısmen birbirleriyle örtüşmeleri, bazı nükleotidlerin birden fazla proteini kodlamasına neden olmaktadır. Bu nedenle, polimeraz proteinini kodlayan bölgede meydana gelen bir mutasyon zarf proteinlerinin de mutasyona uğramasına neden olabilir (8, 48, 55, 66, 76, 78).

2.5. Viral Proteinler

HBV'nin yüzey proteinleri (LHBs, MHBs ve SHBs), kor (C) proteinleri (HBcAg ve HBeAg), polimeraz proteini (P) ve X proteini olmak üzere 4 temel proteini tanımlanmıştır (48, 55, 66, 75, 78).

2.5.1. Yüzey Proteinleri

Yüzey proteinleri, HBV genomunun, S bölgesi tarafından kodlanır. S bölgesi 3 iç başlangıç kodonu (ATG) içerir ve böylelikle 3 farklı protein kodlar. 368 amino asitlik büyük zarf proteini (LHBs) preS1, preS2 ve S ORF'leri tarafından kodlanmaktadır. 281 amino asitlik orta yüzey proteini (MHBs) preS2 ve S ORF'lerinin ürünü iken 126 amino asitlik küçük veya temel zarf proteini (SHBs, HBsAg) yalnızca S ORF'sinin ürünüdür.

LHBs, aynı zamanda preS1 proteini olarak ta anılır, viryonun montajı, taşınması ve hepatositlere yapışması için gereklidir. MHBs'nin (preS2 proteini) yapışma ve montajdaki rolü ayrıntılarıyla bilinmemektedir. SHBs (HBsAg), küçük zarf proteini, zarfta baskın olarak bulunan proteindir ve viryonun konak hücre kaynaklı lipidlerinin zarfta kendi kendine montajına olanak sağlar.

HBsAg ortak “a” antijenik determinanti ile alt tiplere özgü allelik determinantlar olan *d/y* ve *w/r* determinantlarını taşır. Böylelikle HBsAg 4 ana alt tipe ayrılmıştır; *adw*, *adr*, *ayw* ve *ayr*. Sonraları daha ileri alt determinantlarının bulunması sayesinde HBsAg 9 alt tipe ayrılmıştır; *ayw₁₋₄*, *ayr*, *adw₂*, *adw₄*, *adr q⁺* ve *adr q⁻*. S geninde 365. pozisyondaki A'nın G'ye değişimi sonucu kodon 122'deki lizinin yerini argininin almasıyla *d/y* değişimi meydana gelir. Aynı şekilde S geninde 476. pozisyondaki A'nın G'ye değişimi sonucu, kodon 160'taki lizinin yerini argininin almasıyla *w/r* değişimi gerçekleşir (48, 55, 66, 76, 78).

2.5.2. C Proteinleri

HBV'nin C geni 2 başlangıç kodonu (ATG) içerir. Birinci başlangıç kodonu prekor ATG = preC ATG ve ikinci başlangıç kodonu kor ATG = C ATG'dir. İki bölge arasında kalan bölge prekor bölgesidir. Kor geni promoter bölgesinde 2 mRNA sentezini yönetmektedir: prekor mRNA (preC mRNA) ve pregenomik/kor mRNA (pg/C mRNA). RNA enkapsidasyon sinyali preC mRNA bölgesinde yer almakta ve üzerinde "stem loop" adı verilen yapıyı taşımaktadır. Bu enkapsidasyon sinyali pg/C mRNA üzerine etkiliyken, preC mRNA üzerine etkisizdir. Prekor bölgesinin translasyonu, preC mRNA üzerindeki enkapsidasyon sinyalinin tanınmasını engeller. pg/C mRNA, prekor bölgesini içinden başlar, translasyonunun başlangıç noktası ise C ATG'dir. Bu sayede pg/C mRNA'dan kendi kendine kor partiküllerine birleşen nükleokapsid proteinleri olan kor proteinleri sentezlenir. PreC mRNA'nın başlangıcı ise preC ATG'dir bu bölgenin translasyonu sonucu ise prekor proteini ortaya çıkar. Bu protein N terminalinde kor proteininden farklı olarak prekor dizilerini içerir. Bu diziler preC proteinin endoplazmik retikuluma yönlenmesine ve bu sayede post transkripsiyonel modifikasyonların gerçekleşmesine ve olgun proteinin gelişmesine olanak sağlar. Bu bakımdan öncelikle tüm C genine 29 amino asitlik preC bölgesinin eklenmesiyle oluşan 212 amino asitlik öncül polipeptid üretilir. Bu ürün 19 amino asitlik bir bölgenin sinyal peptidi olarak kullanılmasıyla endoplazmik retikuluma (ER) aktarılır. Burada sinyal peptidi amino ucundan kesilir. Daha ileri bir kesim 34 amino asidin karboksi terminal kısımdan çıkarılmasıdır. Bunun sonucu 159 amino asitlik (17 kDa) HBeAg oluşur. Daha sonra bu protein dolaşıma salınır, genellikle serum proteinlerine bağlanır. HBeAg virüsün yapısal bileşenlerinden değildir. Transgenik farelerde yapılan çalışmalar HBeAg'nin olası bir immunomodulator olduğunu, intrauterin bir tolerojen olarak işlev görebildiğini veya TH2 benzeri sitokin yapımını sağladığı göstermektedir. HBeAg aynı zamanda pg/C mRNA'nın nükleokapsid içine enkapsidasyonunu da baskılamak suretiyle HBV replikasyonuna negatif düzenleyici etki yapabilir (48, 55, 66, 76, 78).

C proteinin (HBcAg) başlangıç kodonu preC başlangıç kodonunun 87 nükleotid ilerisinde yer almaktadır. HBcAg 183 veya 185 amino asit uzunluğundadır. Tüm bu proteinler tam boy 3.5 Kb'lık transkript üzerinden translasyona uğrattılır, protein

boyundaki farklılıklar, alt tip varyasyonlarının sonucudur. Nükleokapsid kendi kendine birleşip ikozohedral simetri oluşturan 180-240 C monomerinden oluşur (66, 76).

2.5.3. Polimeraz Proteini

HBV polimeraz gen bölgesi (P bölgesi) 845 amino asit uzunluğundaki viral polimerazı kodlar. P bölgesi büyük alan kaplamaktadır ve preS1/preS2/S bölgelerinin tamamı ve kor bölgesinin sonu bu bölge ile örtüşmektedir. Polimerazın 4 bölümü vardır; terminal protein olarak işlev gören veya DNA'nın negatif ipliğinin sentezinin başlaması için gerekli olan primazı oluşturan amino terminal kısım, herhangi bir bilinen özel bir fonksiyonu olmayan "spacer", RT bölümü ve RNase H aktivitesine sahip karboksiterminal kısım. HBV'nin polimerazı ve başka virüslerin RT'leri arasında benzerlikler bulunmaktadır; özellikle RT aktivitesi için gerekli olan YMDD (tirozin-metyonin-aspartik asit-aspartik asit) motifi ortaktır. RT bölümü, HBsAg'nin güçlü immunojenik bölümünü kodlayan gen bölgesi ile viral genom üzerinde aynı yerde kodlanmaktadır (48, 66, 76).

2.5.4. X Proteini

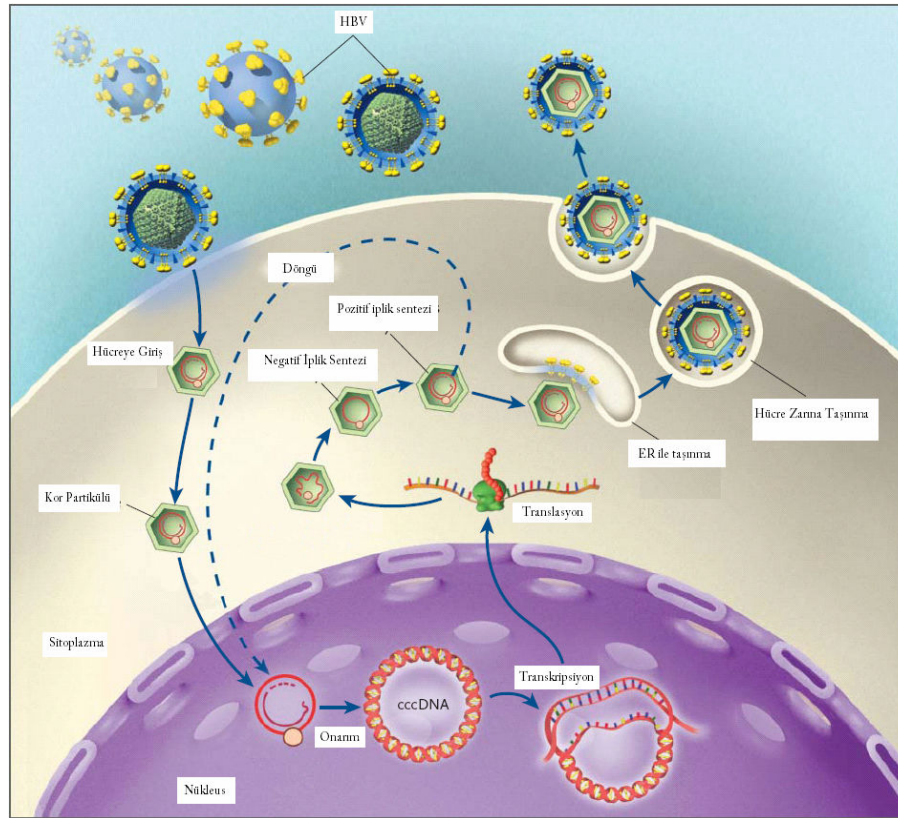
X proteini en küçük gen bölgesinin ürünüdür ve 146-154 amino asit uzunluğundadır. Viral DNA'nın enkapsidasyonu için mutlaka bulunması şart değildir, fakat transkripsiyon transaktivatörü olarak olasılıkla hepatik serin proteaz aktivitesini düzenleyerek regülatör gen işlevi görür. Bu protein sadece viral enfeksiyon sırasında yapılmaktadır. HBV ile enfekte kişilerin ve hepatoselüler karsinomlu (HCC) hastaların karaciğerlerinde saptanmıştır (48, 66, 76).

2.6. HBV'nin Replikasyon Stratejisi

HBV, diğer tüm virüslerde olduğu gibi, yaşam döngüsüne başlarken kendisinin replikasyonunu destekleyecek özel bir hücreye bağlanmak zorundadır. Karaciğer

parankiminin esas hücreleri olan hepatositler HBV'nin esas hedef hücreleridirler. Hepatositlerin dışında mononükleer hücreler, safra kanalı epitel hücreleri, endotel hücreleri, pankreasın asiner hücreleri ve düz kas hücreleri de HBV replikasyonunu orta veya düşük düzeyde desteklerler. Akut infeksiyonlu kişiler üzerinde yapılan çalışmalarda, kişilerin adrenal bezlerinde, böbrek dokularında, lenf düğümlerinde, dalaklarında, tiroid bezlerinde, gonadlarında ve kemik iliği hücre kültürlerinde viral transkriptlerin varlığı gösterilmiştir. Konak hücreye bağlanmada rol oynayan temel yapılar S gen ürünü olan zarf proteinleridir. Bunlar konakta apolipoprotein H, apolipoproteinin değişmiş şekli, insan serum albümini polimeri, fibronektin ve interlökin 6 ile etkileşebilmektedirler. Son dönemlerde gp 180 adı verilen bir proteinin de DHBV ile etkileştiği, aynı zamanda 80 kDa'luk bir proteinin de insan HBV'yi bağladığı gösterilmiştir. Virüsün hücreye bağlanmasını takiben viral soyunma işlemi gerçekleşir ve genetik materyal nükleusa aktarılır. Bu esnada oluşan olaylar hala gizemini korumaktadır ve bu aşama henüz bütünü ile aydınlatılabilmiş değildir (8, 27, 48, 55, 76, 78).

Şekil 3. HBV'nin replikasyonu (27. Kaynaktan değiştirilerek alınmıştır)



DNA genomu nükleusa girdiğinde eksik olan pozitif iplik viral DNA polimeraz tarafından tamir edilir. Genom gevşek sirküler formundan, kovalan bağlı, kapalı halka şeklinde DNA formuna (covalently closed circular DNA = cccDNA) geçer. Bu oluşan yeni DNA formu transkripsiyon için kalıp görevi görmektedir. Bu DNA'nın negatif ipliği kalıp olarak kullanılır ve hücresel DNA polimeraz II aracılığıyla genomun tümü 3.5 kb'lık bir mRNA 'ya çevrilir. Bu mRNA prekor/kor (HBeAg ve HBcAg) ve polimeraz proteinlerinin sentezi için de kalıp görevi görür. Bu mRNA ters (reverse) transkripsiyon işlemi için de kalıp görevi göreceğinden pregenomik mRNA (pg mRNA) olarak da isimlendirilir. Bu olayların oluş süresi zarfında 3 farklı mRNA sentezi daha gerçekleşir. Bunlardan en uzununu 2.4 kb uzunluğunda bir transkripttir ve bu mRNA üzerinden preS1, preS2 ve S proteinlerinin sentezi gerçekleşir. 2.1 Kb boyunda ve orta uzunlukta olan ikinci mRNA ise yalnızca preS2 ve S proteinlerinin sentezi için kalıp görevi görmektedir. En küçük transkript 0.7 kb uzunluğunda olup bu da X proteini sentezi için gerekli genetik bilgiyi ribozomlara taşır. Bu mRNA'lar sentezlendikten sonra protein sentezinde görev yapmak üzere sitoplazmaya geçerler. Sitoplazmada olgun viryon için gereken proteinlerin sentezine başlanır (Şekil 3) (8, 27, 48, 55, 76, 78).

HBV, bu mRNA'lara ait, HBV polimerazın bağlanıp transkripsiyonu başlattığı, 4 “promoter”a sahiptir (8, 43, 48, 55, 76, 78):

1. *Kor promoter*: C geninin gerisinde yer alır ve iki süpergenomik transkriptin transkripsiyonunu düzenler. Bu iki süpergenomik mRNA, replikasyon sırasında kalıp olarak C ve P proteinlerinin transkripsiyonlarının gerçekleşmesi için kullanılan pregenomik mRNA ile HBeAg'nin translasyonunun sağlandığı preC mRNA'dır. Bu “promoter”, hepatonükler faktör (HNF) 3, 4 ve C/EBP gibi karaciğere özgü transkripsiyon aktivatörlerine ihtiyaç duyar. Bu “promoter” transkripsiyonu başlatmak için yeterli olan “Minimal” veya “Basic Core Promoter” dan (BCP) ve *Core Upstream Regulatory Sequence* (CURS)'den oluşmaktadır. CURS'nin önemli bir aktive edici elementi karaciğere özgü faktörlerin bağlandığı a kutusudur (a box), bu “promoter”da aynı zamanda başka transaktivatör bağlayıcı bölgeler de lokalize olmuştur.

2. *X Promoter*: Bu “promoter” HNF 1, 3 ve C/EPB ve diğer faktörlerin bağlanacağı bölgeler içerir.

3. *preS1 Promoter*: Bu “promoter” HNF 1 ve 3 'ün yanında dokuya özgü faktörlerin bağlanması için bölümler içerir. Büyük yüzey proteininin translasyonu için gerekli RNA yapımını artırır ve HBV “promoter”ları içinde karakteristik "TATA" kutusu motifine sahip tek “promoter”dır.

4. *preS2/S Promoter*: preS 1 bölgesi içinde yer almaktadır orta ve küçük yüzey proteinlerinin translasyonunu sağlayacak iki farklı RNA'nın transkripsiyonuna olanak sağlar. Temelde her yerde bulunan SP1 proteinin bağlanması için bir bölge içerirken karaciğere özgü faktörlerin bağlanması için özel kısımlar içermez.

HBV'nin iki "enhancer"ı (EN) tanımlanmıştır; EN I ve EN II. Bunlar "cis-acting" dizileriyle transkripsiyonu büyük oranda arttırmaları. EN I genomik RNA'nın başlangıç bölgesinin 200 nükleotid gerisinde yer alır. EN II'nin 88 bazlık bölümü kor “promoter” bölgesi ile iç içe geçmiştir; bu bakımdan bu kısım kor “promoter”/EN II (Cp/ENII) bölgesi olarak ta adlandırılmaktadır. EN II üç ana element içerir: aktive edici α ve β kutuları ile “enhancer”ın aktivitesini baskılayıcı olarak görev gören "negatif regulatory element" (NRE). α kutusu kor “promoter” bölgesiyle paylaşılmaktadır. Her iki "enhancer" gen ekspresyonunun tüm düzeylerini etkileyebilir, HBV “promoter”larının çalışmasını arttırabilir. Ek olarak, HBV, transkripsiyonunu aktive edecek glukokortikoid duyarlı elemente de sahiptir (8, 48, 55, 66, 76, 78, 85). Ayrıca EN I içinde yer alan 8 bazlık palindromik dizilerin HNF 3 β gibi düzenleyici proteinlerin yanı sıra palindrom bağlayıcı protein (PBP) gibi protein veya proteinleri bağlayarak gen regülasyonuna katkıda bulunduğu gösterilmiştir (39). Yine interleukin 6'nın (IL 6) bir nükleer faktör üzerinden (IL 6 için nükleer faktör, NF-IL 6) EN I aktivitesini 4 kat arttırdığı, dolayısıyla X protein sentezinde artış sağladığı, bunun da infekte karaciğer hücrelerinde HBV replikasyonunu düzenleyebileceği HepG2 hücreleri ile yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (67).

Her iki iplikçiğin 5' ucunda, bir çift, 11 bazlık doğrudan tekrarlayan diziler (“direct repeat sequences”) DR1 ve DR2 bulunur; bunlar sırasıyla negatif ipliğin tamamı ve kısa olan pozitif ipliğin sentezi için başlangıç bölgesi olarak görev görürler. DR1 ve DR2, negatif ve pozitif ipliğin 5' uçlarında bulunan, yapışkan, üst üste binen kısmın bir bölümü gibi de davranırlar. Böylece genomun ana sirküler şeklini almasına yardımcı olurlar. Transkripsiyonun sonlanımı için bir poliadenilasyon sinyaline ihtiyaç vardır. Bu

mRNA'ların 3' ucunda bulunan poli A kuyruğuyla ("poly A tail") sağlanmaktadır. Tüm HBV transkriptlerinin 3' sonlanım kısımları aynıdır.

pg mRNA'nın ters transkripsiyonunun gerçekleşmesi için C proteinleri birbirleriyle birleşerek nükleokapsidi oluştururlar. Bu arada, pg mRNA, C proteinlerinin yüksek bazik özelliği sayesinde bu proteinlerin karboksi terminal bölgelerine nonspesifik olarak bağlanmak suretiyle nükleokapsid içine alınır. pg mRNA'nın her iki ucunda enkapsidasyon için ϵ adı verilen kısa diziler bulunur. Bu dizi halka şeklinde eşleşmemiş bir bölüm (bulge) ve "stem loop" adı verilen bir yapı gösterir (8, 48, 55, 66, 76, 78).

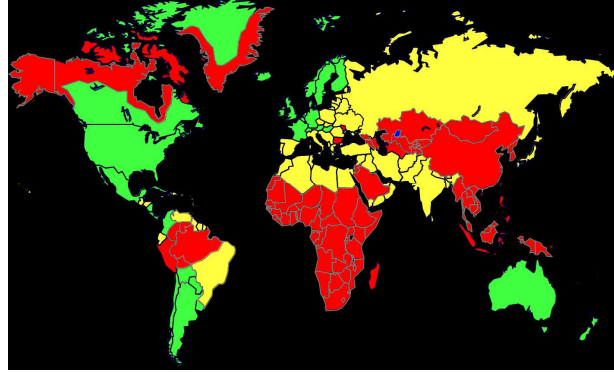
5' üstü ucundaki ϵ sinyalinin eşlenmemiş halka kısmı, P proteini için kalıp görevi üstlenir. Sonuç olarak kısa bir DNA oligomeri oluşur. Bu nükleotid-polimeraz kompleksi daha sonra DR1 bölgesine transloke olur ve oligomer negatif DNA ipliğinin sentezi için primer görevi görür. Negatif DNA ipliği sentezlendiğinde pg mRNA yine polimerazın RNaz H aktivitesi ile yıkılarak ortamdan uzaklaştırılır. Viral polimerazın aktivitesi ile pozitif ipliğin sentezi başlar. Pozitif iplik sentezlendiğinde olgun nükleokapsid zarf içine paketlenir (8, 48, 55, 66, 76, 78).

C ve P proteinleri gibi S proteinleri de sitoplazmada sentezlenirler, ancak endoplazmik retikulumun (ER) lümenine taşınırlar. Burada HBc ve HBs proteinleri arasında kovalan disülfid köprüleri oluşturulur ve viryon, daha sonra ER'den golgi aygıtına aktarılır. Son olarak da viryonlar, hücre membranı üzerinden salınırlar (Şekil 3) (8, 48, 55, 66, 76, 78, 85).

2.7. HBV'nin Epidemiyolojisi

HBV, tüm dünyaya yayılmış bir viral enfeksiyon etkenidir. Bugün için, dünya genelinde 2 milyar kişinin bu virüsle hayatlarının bir dönemlerinde karşılaştıkları, 350 milyon kişinin yine bu virüsle kronik olarak enfekte olduğu ve yılda 1-2 milyon kişinin bu virüs enfeksiyonu nedeni ile öldüğü hesaplanmaktadır (54, 103).

Şekil 4. HBV'nin dünya üzerinde dağılımı (Kırmızı yüksek, sarı orta ve yeşil düşük endemi bölgeleri, CDC verileri)



HBV ile infekte kişilerin kanında, tükürüğünde, vajinal salgılarında, semeninde, menstrüasyon kanında, anne sütünde, göz yaşında ve idrarında bulunabilir. Bu vücut sıvılarının deri veya mukoza yüzeyleriyle teması sonucu veya perinatal olarak infekte anneden bebeğine HBV bulaşması mümkündür. Bu bulaşma kalıpları ve HBV enfeksiyonunun kliniği, HBV'nin bölgedeki prevalansı ile ilişkilidir. Dünya, kronik HBV enfeksiyonlarının dağılımına göre, HBV endemi düzeyleri açısından 3 farklı bölgeye ayrılmıştır (54, 55).

Yüksek endemi bölgelerinde, kronik HBV enfeksiyonu oranı %8'in üzerindedir. Afrika kıtasının Sahra çölünün güneyinde kalan kısmı, Japonya ve Hindistan dışında kalan Güney Doğu Asya, Pasifik ve Amazon Havzaları, Kuzey Kutbu, Sovyetler Birliği'nden ayrılmış Asya Cumhuriyetleri, Orta Doğu'nun bir kısmı ve Karaippler yüksek endemi bölgelerini oluşturmaktadırlar. Ayrıca Bulgaristan, Romanya, Moldova gibi taşıyıcılık prevalansının %5-10 olduğu Doğu Avrupa'nın bir kısmını da bu kategoriye eklemek gerekmektedir. Tüm bu coğrafyada yaşayan kişilerin dünya nüfusunun yaklaşık %45'ini oluşturduğu hesaplanmaktadır. Yine bu bölgelerde temel bulaşma yolu vertikal yolla anneden çocuğuna bulaşma tarzında olup yaşam boyu HBV ile karşılaşma riskinin %60'ın üzerinde olduğu hesaplanmaktadır. HBsAg pozitif bir anneden perinatal dönemde HBV bulaşma oranı %90 gibi yüksek bir düzeydedir. Vertikal yolla edinilen enfeksiyonlara ek olarak, enfeksiyon yaşamın erken dönemlerinde, ya doğumdan kısa bir süre sonra ya da erken çocukluk döneminde HBV taşıyıcısı bir akraba ile temas sonrası da edinilebilir (48, 54, 55).

Kronik taşıyıcılık oranının %2-7 arasında olduğu bölgeler HBV endemi düzeyi açısından orta düzeyde endemi bölgeleri olarak sınıflandırılmaktadırlar. Güney Doğu Avrupa, Orta Doğunun bir kısmı, Japonya, Hindistan'dan Batı Asya'ya kadar olan bölge ve Güney Amerika'nın bir kısmı HBV infeksiyonlarının orta derecede endemik olduğu coğrafyalardır. Bu bölgelerde yaşayan insanların ise toplam dünya nüfusunun yaklaşık %43'ünü oluşturduğu hesaplanmaktadır. Bu bölgelerde tüm yaş gruplarında infekte olma riski varsa da, kronik infeksiyon daha çok doğumda veya erken çocukluk dönemindeki bulaşmalar sonucu edinilir. İnfeksiyonla hayat boyu karşılaşma riskinin bu bölgeler için %20-60 arasında olduğu hesaplanmaktadır (48, 54, 55).

Kronik taşıyıcılık oranının %2'inin altında olduğu Batı Avrupa, Avusturalya ve Kuzey Amerika düşük endemi bölgeleri olarak sınıflandırılmalarına karşın bu bölgelerde yaşayan etnik gruplar, kendi içlerinde değişik endemi oranlarına sahiptirler. Yine bu bölgelerde HBV infeksiyonu bulaşmaları en çok yetişkin kişiler arasında horizontal yolla gerçekleşmektedir. Bu da en sık cinsel yolla, damar içi ilaç kullanımı veya kontamine kan ve kan ürünleri ile gerçekleşmektedir. Bu grupta genelde 15-24 yaş arası kişiler risk altındadır ve hayat boyu infeksiyonla karşılaşma riskinin %20 civarlarında olduğu hesaplanmaktadır (48, 54, 55).

HBV'ye ait yüzey antijeni alt tiplerinin dağılımı da dünya üzerinde farklılıklar göstermektedirler. ayw_2 ve ayw_3 alt tipleri daha çok Akdeniz ülkelerinde, ayw_4 ve ayw_2 alt tipleri Batı ve Orta Afrika'da, ayw_1 ise Vietnam'da sık görülür, ayr alt tipi seyrek olarak yine Vietnam'da görülmektedir. adw alt tipi Kuzeybatı Avrupa'da, Amerika'da, Doğu ve Güney Afrika ile Hindistan ve Güneydoğu Asya' da sıktır. adr alt tipi ise Polonezya' da ($adr q^-$) ve Güneydoğu Asya'da ($adr q^+$) görülmektedir (44).

A'dan H'ye kadar 8 genotipi tanımlanmış olan HBV'nin genoepidemiolojik dağılımını incelediğimizde ise genotip A'nın ABD'de, Kuzeybatı Avrupa'da ve Afrika'nın Sahra Çölü'nün güneyinde kalan kısmında, genotip B ve C'nin Uzak Doğu'da, genotip F'nin güney Amerika'da sık gözlendiğini, D genotipinin tüm dünyada gözlenebilecek geniş bir dağılım gösterdiğini, genotip E'nin Doğu Afrika'da sık gözlendiğini, genotip G'nin Fransa ve ABD'de, son dönemde keşfedilen genotip H'nin Meksika ve Japonya da gözlendiğini görmekteyiz (3, 44, 49, 68, 84).

HBV'nin orta düzeyde endemik olduğu coğrafya içerisinde yer alan ülkemizde HBsAg seroprevalansının bölgeler arası değişiklikler göstermekle birlikte %3,9 ila 12,5

arasında olduğu çeşitli yayınlarda bildirilmektedir. Seroprevelansın en yüksek olduğu bölgenin Güneydoğu Anadolu olduğu, özellikle bu bölgede, Diyarbakır'da, bu oranın %10'un üzerinde seyrettiği bildirilmektedir. Bu sonuçlardan yola çıkarak yurdumuzda 4 milyon civarı taşıyıcının yaşadığı hesaplanmaktadır (11, 14, 17, 18, 21, 37, 41, 74, 81-83, 87, 90).

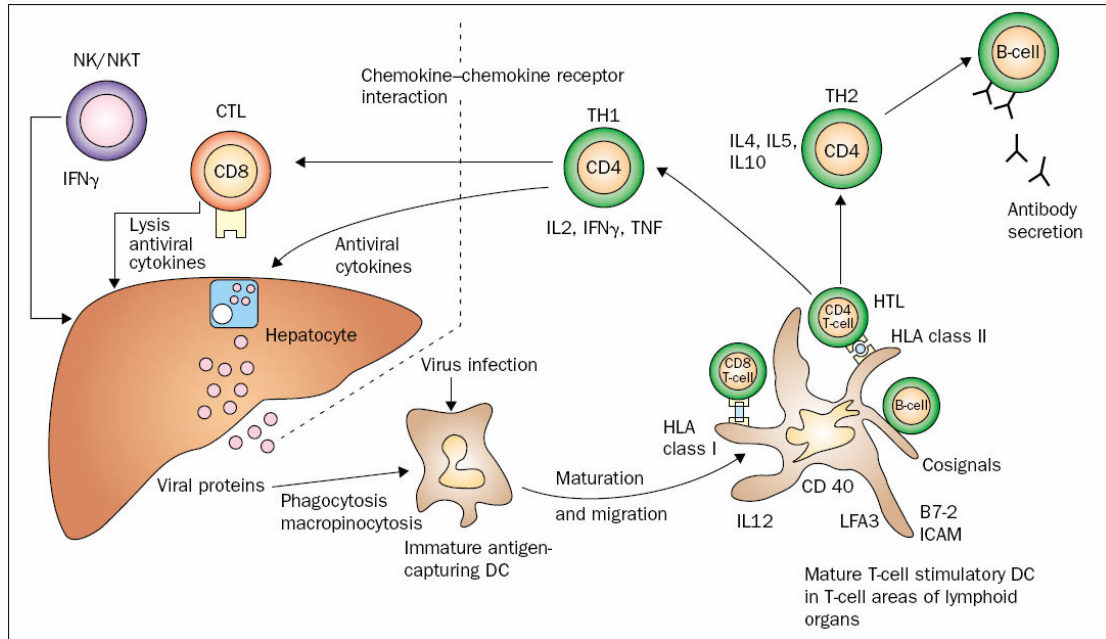
2.8. HBV'nin Patogenezi

HBV infeksiyonları esnasında gelişen hücresel ve humoral bağışık yanıt karmaşıktır. Pek çok çalışmada HBV'nin infekte hepatositler üzerine direk sitopatik etkisi olmadığı ve değişik viral proteinlere karşı oluşan hücresel cevabın klinik hastalık ve virüsün vücuttan temizlenmesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu dönemde karaciğerde hücre yıkımına bağlı olarak aspartat transferaz (AST) ve alanin aminotransferaz (ALT) enzim düzeyleri artmakta, bunlara bağlı olarak da klinik belirtiler ortaya çıkmaktadır. Bu çalışmalarda, viral zarf proteinlerine karşı oluşan antikor yanıtının virüsün vücuttan temizlenmesine yardımcı olduğu ve temelde virüsün temizlenmesinin T hücre aracılı bağışık yanıtla gerçekleştiği gösterilmiştir. Salgılanan sitokinlerin HBV genom replikasyonunu baskıladığı ve viral klirens gelişiminde en temel rolü oynadıkları düşünülmektedir. Hipotez olarak zayıf T hücre yanıtına bağlı kronik infeksiyonun geliştiği düşünülmektedir. Yeni doğan ve erken çocukluk döneminde edinilen infeksiyonlarda, henüz T hücre sisteminin gelişmemiş olmasından dolayı, kronik infeksiyon gelişim riskinin arttığı bilinmektedir (34, 48, 55, 78, 86).

HBV infeksiyonlarının immunopatogenezi, efektif hücre aracılı bağışık yanıtın sonucudur. Akut HBV infeksiyonları sırasında karaciğer hasarı sitotoksik T hücreleri ve NK ("natural killer" = doğal katil) hücreleri tarafından infekte hücrelerin yıkılması sonucu oluşur. Bu olay temelde CD4 T lenfositlerinden salınan sitokinlerle düzenlenir ve Fas ya da porin yolu üzerinden gerçekleşir. Bunların yanı sıra sitopatik olmayan antiviral mekanizmalar akut hepatit sırasında virüsün vücuttan temizlenmesine yardımcı olurlar. Bu mekanizmalar özgün bir biçimde ortaya konmamışsa da viral cccDNA'nın infekte hücre nükleusundan hücre hasarı olmaksızın uzaklaştırıldığı gösterilmiştir (34, 36, 51).

CD4 T hücreleri salgıladıkları sitokin profillerine göre TH1 ve TH2 alt gruplarına ayrılmaktadırlar. TH1 hücreleri baskın olarak interleukin (IL) 2, interferon (INF) alfa ve limfotoksin (TNF-B) salarlar ve bu sitokinler hücre aracılı bağışık yanıtı uyarırlar. TH2 hücreleri ise temelde IL 4, IL 5, ve IL 10 sitokinlerini salgırlar ve bunlar da hümorale bağışıklığı uyarırlar. Gerek akut gerekse kronik HBV enfeksiyonları esnasında, virüsün vücuttan temizlenmesi işleminin gerçekleşmesinde TH1 tipi yanıt öne çıkmaktadır. TH2 tipi yanıt ise hümorale bağışıklığın uyarılmasını ve nötrleyici antikor yapımını uyarmaktadır. Bu sayede, ileride gelişebilecek enfeksiyonların önlenmesinde önemli rol oynamaktadır (Şekil 5) (34, 36, 51, 86).

Şekil 5. HBV'nin patogenezi ve bağışık yanıt (36)



HBeAg ve HBcAg'nin sınıf I ve II HLA epitopları, bağışık yanıtın gelişmesi için hedef oluşturmaktadırlar. Bu duruma rağmen bunların virüsün konakta persiste etmesinde indüklemeye veya desteklemeye gibi bir rol oynayıp oynamadıkları çok açık değildir. Bununla birlikte transgenik fareler üzerine Milich'in yaptığı çalışmalar, HBeAg/HBcAg'nin tetiklediği TH1/TH2 yanıtlarındaki dengesizliğin, taşıyıcılık durumunun oluşmasında rol oynadığını göstermiştir. Kronik enfeksiyonda bireyin daha çok TH2 tipi sitokin yanıtına dolayısıyla antikor üretimine kaydığı, akut enfeksiyonda

ise TH1 tipi sitokin yanıtının öne çıktığı, bunun da doğrudan sitopatik etkiyi kamçılacağı gösterilmiştir. Kronik infeksiyon gelişiminde, sınıf I ve II HLA molekülünde oluşabilecek timik kusurların da rol oynayabileceği düşünülmektedir. Bu yaklaşımlar ışığında Milich, HBV infeksiyonunda prognozun iyileştirilmesi amacıyla sitokin tedavisinin TH2 tipi yanıtı TH1 tipi yanıtı kaydırarak şekilde düzenlenmesi gerektiğini söylemiştir (34, 36, 51).

2.9. HBV İnfeksiyonlarının Klinik Seyri

HBV infeksiyonunu seyri 4 döneme ayrılarak incelenebilir. İlk dönem immun tolerans dönemi olup sağlıklı bireylerde inkübasyon dönemine denk gelir. Bu dönem yeni doğanlarda bağışıklık sistemi gelişimini tamamlamadığı için onlarca yıl sürebilir. İkinci dönem bağışıklık sisteminin yanıt dönemidir. Oluşan inflamatuvar yanıt sebebi ile hücre harabiyeti, sarılık gelişimi bu dönemde gözlenir. Bu dönem kronik olgularda 10 yıldan fazla sürebilir. Üçüncü dönemde konağın bağışıklık sisteminin yanıt sonucu viral replikasyon sonlanarak kaybolur. Dördüncü dönemde, HBsAg'ye karşı anti-HBs yanıt oluşur. Kişilerin genetik yapıları, altta yatan hastalıklar, HBV'nin mutant kökenleri ile oluşan infeksiyonlar nedeni ile HBV, karaciğerde akut, kronik veya fulminan infeksiyon gibi farklı hastalık tabloları oluşturabilir. Tablo 3'te klinik ile ilişkili sık kullanılan bazı terimler ve değişik HBV infeksiyonları için tanı kriterleri sunulmuştur. (8, 48, 52, 54, 55, 76)

Tablo 3. Hepatit B'nin kliniği ile ilişkili sık kullanılan bazı terimler ve HBV enfeksiyonun farklı şekilleri için tanı ölçütleri

Tanım	Açıklama	Tanı Ölçütleri
Akut Hepatit B	Hepatit B enfeksiyonunun akut olarak geçirildiği, asemptomatik enfeksiyon, sarılıklı kolestatik hepatit, nadiren fulminan hepatit şeklinde farklı klinik tablolar gösteren hastalık.	- HBsAg'nin 6 ay içinde negatifleşmesi - Serum HBV DNA düzeyi değişken - <i>AST/ALT</i> düzeylerinde yükselme
Kronik Hepatit B	Hepatit B enfeksiyonunun persistan olarak kaldığı hastalarda neden olduğu kronik inflamatuvar hastalık. (Kronik hepatit B HBeAg negatif ve HBeAg pozitif olmak üzere iki kısma ayrılabilir).	- HBsAg'nin 6 aydan fazla sürede pozitif kalması - Serum HBV DNA düzeyinin 10^5 kopya/ml'nin üzerinde bulunması (HBeAg negatiflerde 10^4-10^5 kopya/ml olabilir) - Kalıcı veya intermitant <i>AST/ALT</i> yüksekliği - Karaciğer biyopsisinde kronik hepatit bulguları (nekroinflamatuvar skor ≥ 4) -“piecemeal” nekrozu -Lobuler inflamasyon -Asidofilik Concilman inklüzyon cisimleri
İnaktif HBsAg Taşıyıcılığı	Nekroinflamatuvar karaciğer hastalığı, önemli bir belirtisi olmaksızın gelişen persistan HBV enfeksiyonları.	- HBsAg'nin 6 aydan fazla sürede pozitif kalması - HBeAg negatif, anti-HBe pozitif - Serum HBV DNA düzeyinin 10^5 kopya/ml'nin altında bulunması - Normal <i>AST/ALT</i> düzeyleri - Karaciğer biyopsisinde önemli bir bulgu olmayışı (nekroinflamatuvar skor <4)
İyileşmiş Hepatit B	Geçirilmiş enfeksiyon kanıtlarının varlığı ve artık aktif virüs enfeksiyonuna ilişkin ileri virolojik, biyokimyasal veya histolojik kanıtın olmaması	- Akut veya kronik hepatit B hikayesi, anti-HBc pozitif, anti-HBs pozitif veya negatif, HBsAg Negatif. - Serum HBV DNA düzeylerinin saptanamayacak düzeyde oluşu. - Normal ALT düzeyleri
Hepatit B'nin akut alevlenmeleri	Aminotransferaz aktivitesinin normalin 10 kat üzerine çıkması ya da bazal aktiviteye göre 2 kat artış göstermesi	
Hepatit B'nin Reaktivasyonu	Asemptomatik HBsAg taşıyıcısı olan veya iyileşmiş hepatit B hastası olduğu bilinen kişilerde nekroinflamatuvar karaciğer hastalığının yeniden ortaya çıkması	
HBeAg klirensi	HBeAg pozitif kişideki HBeAg'nin kaybolması olayı	
HBeAg serokonversiyonu	Daha öce HBeAg pozitif olan bir kişide HBeAg'nin kaybolması ve anti-HBe'nin pozitif olarak saptanması.	
HBeAg'nin yeniden Belirmesi	HBeAg negatif, anti-HBe Pozitif kişide HBeAg'nin yeniden belirmesi.	

Akut infeksiyonda kuluçka süresi 6 haftadan 6 aya kadar değişebilmektedir. Klinik belirtilerin ortaya çıkışı yüksek oranda yaşa bağımlıdır. Yeni doğanlarda infeksiyon genellikle klinik belirti ve semptomlar olmaksızın seyreder. 1-5 yaş arası çocuklarda klinik aşıkar infeksiyon gelişimi %15 civarındadır. Daha büyük çocuklarda ve yetişkinlerde semptomatik infeksiyon gelişim oranı %33-55 arasındadır. İnfeksiyon, hafıften fulminana kadar değişen geniş bir yelpazede seyredebilir. HBV infeksiyonunun klinik belirtileri ateş, iştahsızlık, mide bulantısı, kusma, sarılık, koyu idrar, kil rengi veya açık renkli dışkı ve karın ağrısıdır. Genelde deri döküntüleri, artralji ve artrit gibi karaciğer dışı klinik belirtiler gelişebilir. Fulminan hepatit %1 ile %2 arasında değişen oranlarda gelişebilir ve vaka ölüm oranları %63'ten 93'e kadar çıkabilir. HBV infeksiyonları, yetişkin ve 5 yaş üstü çocuklarda %90 oranında akut olarak geçirilmektedir (8, 48, 52, 54, 55, 76).

Akut infeksiyonu takiben bazı olgularda HBV karaciğerden temizlenemez. Bu kişilerde HBsAg'nin, serumda 6 aydan fazla bir sürede bulunması kronik infeksiyon göstergesidir. Kronik infeksiyon gelişme riski, infeksiyonunun kazanılma yaşı ile oldukça bağlantılıdır. Yeni doğan döneminde edinilmiş bir infeksiyonun kronikleşme oranı %90'ın üzerindedir. 1-5 yaş arası edinilen infeksiyonların kronikleşme oranı %25-50 arasındadır ve bu oran daha büyük çocuklar ve erişkinlerde %6-10 aralığına iner (8, 48, 52, 54, 55, 76).

Kronik infekte olgularda siroz ve birincil hepatosellüler karsinom (HCC) gibi kronik karaciğer hastalığı gelişme riski artmıştır. Yine yeni doğan gibi erken dönemde edinilen infeksiyonda, infeksiyonun kronikleşme riskindeki artışın yanı sıra yapılan çalışmalarda bu kişilerde HCC ve siroz gelişme riski %25 iken daha geç yaşlarda edinilen infeksiyonlarda bu sekellerin gerçekleşme riskinin %15 civarında olduğu ortaya konmuştur. HCC gelişme riski kronik infeksiyonun iyileşmesi ile düşmektedir. Kronik infeksiyon gelişme riski konak faktörleri ile de sıkı ilişki içindedir. Böbrek yetmezliği nedeni ile hemodiyalize giren hastalar, organ transplantasyonu alıcıları, kemoterapi hastaları, HIV infeksiyonu veya diyabet gibi altta yatan başka kronik infeksiyon ve/ya da hastalıkları olanlarda kronik HBV infeksiyonu gelişme riski artmaktadır (8, 19, 48, 52, 54, 55, 76).

Kronik infekte kişiler karaciğer biyopsilerinin histolojik kalıplarına göre 3 gruba ayrılmaktadır: Kronik persistan hepatit, kronik aktif hepatit ve siroz. Histolojik hasarın derecesi genellikle semptomları yansıtmaz ve kronik infekte kişiler hastalığın son dönemine kadar genellikle asemptomatiktir. Kronik infekte kişilerde fibrozis gelişimi, siroz gelişimi için zemin hazırlamaktadır. Siroz karaciğer hasarının geri dönüşsüz bir şeklidir ve HCC gelişimine yol açabilir. Tipik olarak, HBV'nin kronik infeksiyonlarından yaklaşık 25-30 yıl sonra meydana gelen HCC olgularında HBV'nin özel bir onkogeni henüz saptanamamıştır (8, 19, 48, 52, 54, 55, 76).

30 yıl öncesine kadar HBsAg pozitif, HBeAg negatif kişiler, replikatif olmayan HBV ile infekte kişiler olarak kabul edilmekte idi. Bu dönemde, bu hastaların karaciğer enzimleri normal veya normale yakınsa sağlıklı ya da asemptomatik HBsAg pozitif veya HBV taşıyıcısı olarak tanımlanmakta olduğunu görmekteyiz. Ancak 1980'lerin başında HBV'nin, HBeAg negatif olsa da, replikasyonuna devam edebileceği anlaşılmıştır. Özellikle Akdeniz ülkelerinden HBeAg negatif, Anti-HBe pozitif, ancak çoğalmaya devam eden HBV'ye bağlı kronik vakalar bildirilmiştir. Bu durum üzerine HBeAg negatif ve anti-HBe pozitif HBeAg negatif kronik hepatit B kavramı önerilmiş ve yaygın kabul görmüştür. 1989 yılında bu durumun moleküler temelleri anlaşılmıştır. Daha sonra HBeAg negatif kronik hepatit B'nin Akdeniz ülkeleriyle sınırlı kalmadığı, tüm dünyada yaygın olduğu ve sıklığının giderek arttığı anlaşılmıştır (8, 19, 48, 52, 54, 55, 76).

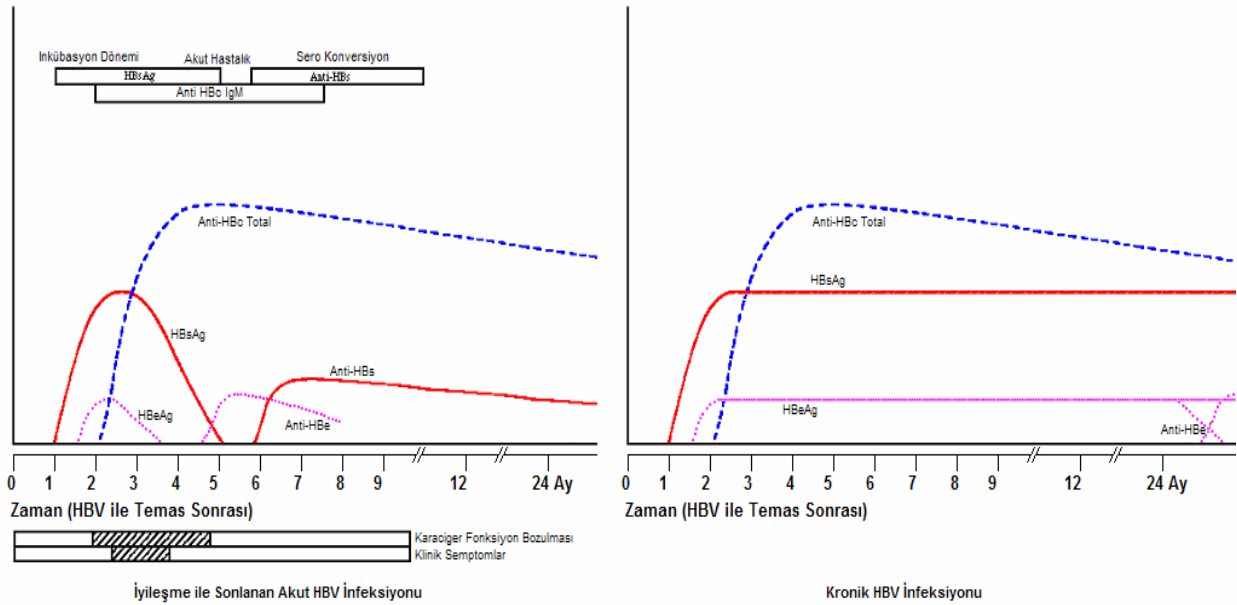
Kronik hepatit B tanı ölçütleri Tablo 3' de sunulmuştur. Eğer bu şartlar gerçekleşmemişse karaciğer hasarına eşlik eden eş zamanlı başka faktörler aranmalıdır. % 15 hastada uzun süreli remisyonlar gözlenmektedir ve tanı konulan dönemde hastaların ancak %40'ında histolojik olarak fibrozis saptanabilmektedir (8, 19, 48, 52, 54, 55, 76).

Bu tip hastaların prognozu genellikle kötüdür. İtalya'da bu tip hastaların üçte birinde siroz geliştiği, Yunanistan'da 4 yıl içinde mortalitenin %29 olduğu gözlenmiştir. Yine Yunanistan' da hepatosellüler karsinom oranı %14 olarak saptanmıştır (8, 19, 48, 52, 54, 55, 76).

2.10. HBV İnfeksiyonlarının Tanımı

Hepatit B infeksiyonları, klinik belirtileri ile diğer viral hepatitlerden ayıramadığından, bu infeksiyonların ayırıcı tanımları ağırlıklı olarak serolojik testlere dayanır. HBV infeksiyonlarını tanımlamak için pek çok farklı serolojik test uygulamak mümkündür (5, 8, 42, 48, 52, 55, 76) (Şekil 6.HBV Serolojisi).

Şekil 6. HBV Serolojisi (<http://www.mcb.uct.ac.za/cann/335/HBV.html> Sitesinden ve 55. kaynaktan düzenlenmiştir)



Akut infeksiyonlar, serumda, HBsAg'nin ve anti-HBc IgM'in bulunması ile karakterizedir. HBeAg akut infeksiyon döneminde saptanabilir. İyileşme döneminde HBsAg ve HBeAg serumdan kaybolurken, anti-HBs ve anti-HBe gelişmeye başlar. Anti-HBs virüsü nötralize edici bir antikordur. Akut infeksiyon sonunda anti-HBs oluşumu iyileşmeyi ve ilerde bulaşabilecek infeksiyonlara karşı bağışıklığı gösterir. Anti-HBs aynı zamanda hepatit B aşısı ile aşılanmış kişilerin serumunda da bulunur. Ticari kitlerle saptanan total anti-HBc (IgM ve IgG sınıfı antikorların toplamı)

pozitifliği geçirilmekte olan veya geçirilmiş infeksiyonu göstermektedir. Anti-HBc'nin IgG sınıfı antikorları HBsAg'den hemen sonra ortaya çıkar ve hayat boyu kişinin serumunda kalır. Bu yüzden anti-HBc total akut infeksiyonu göstermede güvenilir bir belirteç değildir, bununla birlikte IgM sınıfı antikorlar akut infeksiyon tanımı için daha güvenilirdir. (5, 8, 42, 48, 55, 76)

Kronik infeksiyonda, HBsAg kişi infekte olduğu sürece kalmaktadır. HBeAg durumu değişken olmasına karşın anti-HBe IgM genelde akut infeksiyondan 6 ay sonra saptanamaz düzeye iner (8, 19, 48, 52, 54, 55, 76).

HBV infeksiyonlarında, HBV DNA saptanması tanısal açıdan kullanılabilir. İki durumda moleküler testler serolojik testlerden çok daha değerlidir. Birinci durum, primer infeksiyonun düşünüldüğü durumdur, ki bu dönemde (pencere dönemi gibi) yüksek duyarlılıklı testlerin uygulanması gereklidir. İkinci durum ise izole anti-HBc pozitif hastalarda özellikle reaktivasyonun tanımlanabilmesi için kullanılmaktadır (38). Son yıllarda geliştirilmiş Real Time PCR yöntemleri ve ticari kitler ile HBV DNA saptama sınırı 10 kopyanın altına kadar çekilmiştir. Bu yöntemlerin bir avantajı da dinamik aralıklarının çok daha geniş olabilmesidir (5, 8, 10, 23, 42, 48, 50).

HBV DNA'sının kantitatif veya kalitatif PCR yöntemleri ile saptanması klinik açıdan küçük farklılıklar gösterir. Genel olarak kalitatif PCR ile HBV DNA saptanması HBsAg saptanmasına benzemekte ve aktif viral replikasyonu göstermektedir. Kantitatif saptama teknikleri ile HBV DNA saptanması ise HBeAg saptanmasına benzemekte ve viral replikasyonun derecesini saptamak açısından yararlı olmasının yanı sıra tedavi takibinde de kullanılmaktadır (5, 8, 42, 48, 55, 76).

Nükleik asit dizi analizi HBV infeksiyonları sırasında genetik varyasyonların ve antivirallere direnç gelişiminin gösterilmesi açısından önem taşımaktadır. (4) Örnek olarak Genotip A ve B, Genotip D ve C'ye göre interferon tedavisine daha duyarlıdır. Yine virüs genomundaki mutasyonlar, lamuvidin başta olmak üzere anti virallere karşı direnç gelişmesine neden olmaktadır. Bu gibi hastalarda DNA dizi analizi ya da diğer yöntemlerle dirençle ilişkili mutasyonların saptanması ve tedavinin buna göre düzenlenmesi gerekmektedir (5, 8, 42, 48, 55, 76).

2.11. HBV İnfeksiyonlarının Tedavisi

Akut HBV infeksiyonları, kendi kendilerine sınırlanabilen infeksiyonlardır. Bu nedenle bu infeksiyonlar için özel olarak tasarlanmış tedaviler bulunmamaktadır. Tedavi hastanın semptomatığına yönelik olarak, bunları düzeltmek üzere düzenlenir. Ayrıca akut infeksiyonun, kronik infeksiyona dönüşmesini önlemek amacıyla uygulanan özel bir tedavi rejimi de bulunmamaktadır (57, 98).

Kronik Hepatit B tedavisi, hastalığın klinik prognozunu iyileştirmeye yönelik olarak yapılmaktadır. Tedavide, HBV'nin viroloji ve replikasyon döngüsü ile konağın HBV'ye yanıtının göz önünde bulundurulması gerekir. Bu açıdan interferon ile tedavi edilen hepatitlerin uzun süreli izlemeleri, viral yükte HBeAg serokonversiyonunun eşlik ettiği büyük baskılanmaların olduğunu ve bunun da HBV'nin doğal seyrini sekteye uğrattığını desteklemektedir. Tedavi hedefleri olarak hepatit aktivitesinde (nekroinflamatuvar aktivitede) geçici ya da kalıcı gerileme, fibrotik ilerlemenin durdurulması, siroz ve karaciğer yetersizliğinin önüne geçilmesi ile karaciğer transplantasyonu sonrasında HBV infeksiyonu nüksünün önlenmesi olarak sıralanabilir (24, 57, 98, 101).

Yabani tip HBV infeksiyonları esnasında tercih edilen tedavi kesim noktası HBeAg serokonversiyonunu gerçekleştirdiği noktadır. Bu noktada siroz gelişmiş olsa dahi karaciğer yetersizliğinde belirgin bir azalma gözlenir. Ayrıca riski tamamen ortadan kaldırmaya bile HCC riski de azalır. Bu açıdan 1999 yılına dek onaylı tek ilaç interferon (IFN) alfa idi. IFN alfa hem direkt antiviral etki gösterir hem de immünomodülatör etki gösterir. ALT düzeyleri tarafından yansıtıldığı üzere, hasta HBV'ye karşı önemli ölçüde bir immün aktivite gösteremediği sürece bu tedavi nadiren başarılı olmaktadır. Bunun dışında ALT düzeylerindeki artışın yansıttığı üzere HBeAg serokonversiyonuna hepatitte bir ani geçici alevlenme öncülük etmektedir, bu durum sirozlu hastalarda karaciğer yetersizliğine neden olabilmektedir. Bu nedenle IFN alfa tedavisi Asya ve Pasifik ülkelerinde kronik HBV hastalarının yalnız %2 ila 5'ine yararlı olabilmektedir. Sirozlu hastalarda yine bu nedenden dolayı bu ajanın kullanımı kontrendikedir. Prekor mutant HBV ya da bağışıklık baskılanmasını olduğu durumlarda da etkin olmayan bu ajan bir çok istenmeyen etkiye de sahiptir (24, 57, 98, 101).

Lamivudin prototipini oluşturduğu hem güçlü, hem iyi tolere edilebilen, hem de ağız yoluyla alınabilen antivirallerin ortaya çıkması, daha açık tedavi hedeflerinin formüle edilmesini sağlamıştır. HBV tedavisi esnasında lamivudin orta vadede iyi bir etkinliğe sahiptir. Uzun vadede ise problem HBV'ye ait "revers transkriptaz" enzimindeki YMDD (tirozin metyonin aspartik asit aspartik asit) motifinde mutasyonların ortaya çıkması ve böylelikle bu ajana karşı direnç gelişimidir. (22 ,24, 57, 98 ,101).

Yeni klinik araştırmalarda, HBV antivirallerinin içinde adefovir dipivoksil, entakavir ve emtrisitabinin HBV replikasyonunu baskılamada en az lamivudin kadar güçlü etkiye sahip oldukları görülmektedir. Buna karşın famsiklovir o kadar güçlü görünmemektedir. *In vitro* çalışmalar, YMDD mutasyonlarının lamuvidin, emtrisitabin, ve beta-L-Fd4c (L-2',3' -didehidro-dideoksi - 5-fluorositidin) arasında çapraz dirence yol açtığını göstermektedir. Bununla birlikte, adefovir dipivoksil, lobukavir, entekavir, DAPD (beta- D-2,6- diamino pürin dioksalan) ve olasılıkla klevudin (L-FMAU) hem yabancı tip hem de YMDD mutant HBV'nin replikasyonunu baskılamaktadır. Yapılan ön çalışmalar lamuvidine direnç geliştiği halde adefovir dipivoksilin klinik açıdan etkili olmaya devam ettiğini göstermektedir (16, 22, 24, 57, 59, 98, 101).

Kronik HBV tedavisinde immünomodülatör yaklaşımlar kavramsal düzeyde ilgi çekici olmakla birlikte, kullanılmakta olan sözü edilmeye değer yeni ajanlar (timalfasilin, Interlökin 12, tedavi amaçlı aşılar) klinik araştırmalarda yeterli etkinlik gösterememişlerdir. Bunlar arasında PEG-Interferon kullanılmaya başlanmıştır. HBV tedavisinde bir sonraki aşama, sürdürülebilir bir baskılanmanın elde edilmesi için özellikle de ilaç direnci gelişimini azaltmak ve ilaç etkinliğini arttırmak için antivirallerin kombine halde kullanımı olabilir (24, 57, 98).

2.12. HBV İnfeksiyonlarından Korunma

Bulaşmanın gerçekleşmesinden hemen sonra pasif bağışıklama veya bulaşma öncesi aşılama programının uygulanması ile sağlanan aktif bağışıklama ile HBV enfeksiyonlarından korunmak mümkündür (55, 91, 98, 103).

Bulaşmadan hemen sonra verilecek olan anti-HBs antikorlarının yüksek titrelerinin (Hepatit B hiperimmün globülini = HBIG) akut veya kronik infeksiyon gelişmesini önleyebileceği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (48, 55, 103).

Bu infeksiyonla karşılaşmadan önce yapılacak aşılama ile sağlanacak aktif bağışıklama bu infeksiyonlardan korunmanın en iyi yoludur. Günümüzde rutin olarak bu amaç için rekombinant DNA teknoloji yöntemleri ile üretilen hepatit B yüzey antijenini içeren aşılar kullanılmaktadır (48, 55, 98, 103).

Hepatit B aşılamasında kas içine uygulanan 3 doz aşıdan sonra yetişkinlerde %90'ın üstünde, yeni doğanlarda, çocuklarda ve 19 yaşına kadar olan adolesanlarda %95'in üzerinde koruyucu antikorlar gelişmekte fakat bu oran 40 yaşın üzerinde ancak %90 civarına çıkmakta, 60 yaşın üstünde ise %75 civarlarında kalmaktadır. Bağışıklık, aşılama presödürünü tamamlayan kişilerde %80-100 arasında hepatit B gelişimi önlemektedir. Önerilen aşılama dozları, aşılanacak kişinin yaşına, infeksiyonun kazanılma durumuna (örn. perinatal) ve uygulanacak aşının tipine göre değişmektedir (48, 55, 98, 103).

Yetişkinlerde ve çocuklarda aşılama sonrası gelişen bağışıklık zamanla düşüş göstermektedir. Bununla birlikte iyi bir cevap ilk aşılama takvimi bittikten sonra 100 IU/ml'nin üstünde olmalıdır. Gelişen bağışık belleğin 15 yıldan uzun süre kaldığı gözlemlenmiştir. Bu açıdan artık hatırlatma dozları rutin olarak önerilmemektedir. Yalnız hemodiyaliz hastaları, sağlık personeli gibi riskli gruplar için antikor titresinin 10 IU/ml'nin altına düşürülmemesi gerektiği vurgulanmaktadır. HBV ile kronik infekte annelerden doğan bebeklere aşı ile birlikte doğar doğmaz HBIG yapılması ile hastalığa karşı etkin bir koruma sağlamaktadır (30, 48, 55, 91, 98, 103).

2.13. HBV'nin Mutantları

Evrim, tüm viruslarda farklı hızlarda ve yönlerde gerçekleşir. Yıllık bölge başına nükleik asit değişiminin 10^{-6} - 10^{-2} civarı (ortalama 10^{-4} - 10^{-5}) olduğu RNA virüslerinde bu olgu çok hızlı gelişir. Bu virüslerdeki mutasyon sıklığının bu kadar fazla oluşunun temel nedeni replikasyon sırasında kullanılan RNA polimerazın yeni oluşmakta olan RNA dizisine eklenen bazların komplementerleri ile uyumlu olup olmadıklarını kontrol

edememesidir. Bu mekanizma "proof-reading" olarak adlandırılır. RNA virüsleri bu mekanizmadan yoksun olmalarından dolayı hata yapmaya ve yapılan hataları düzeltme (3' ekzonükleaz aktivitesi) yeteneğinden yoksun olmaları nedeni ile daha sık mutasyona uğrarlar. RNA virüsleri, genetik yapı bakımından segmentli yapı gösterebilmeleri nedeni ile rekombinasyon ve hipermutageneze açıktırlar (33, 66, 78).

DNA virüslerinde ise yukarıda sayılan eksiklikler genelde olmadığından, mutasyonlara karşı RNA virüslerinden göreceli olarak daha korumalıdır. Yıllık her bölge başına nükleik asit değişimi yaklaşık 10^{-9} 'dur (33, 66, 78).

Hepadnaviridae ailesi üyeleri DNA virüsü olarak sınıflandırılmalarına karşın replikasyonları sırasında, RT enzimi ile pregenomik RNA'yı kalıp olarak kullanarak DNA sentezlerler. Böylelikle DNA virüsü olmalarına karşın mutasyon oranları DNA virüslerinininkinden yüksek, RNA virüslerinden ise daha düşük düzeydedir. Bu oran HBV için bölge başına yıllık 2×10^{-5} olarak hesaplanmıştır (33, 66, 78).

2.13.1. Prekor/Kor ve X Gen Bölgesi Mutasyonları

Prekor/kor mutantları, ilk kez 1989'da Brunetto ve çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmişlerdir. Prekor varyantların oluşumuna yol açan mutasyonlar başlıca 3 tiptir: başlangıç kodonunu (ATG) inaktif hale getiren mutasyonlar, kaymalara yol açan insersiyon veya delesyon mutasyonları ve preC içinde "stop" kodonu oluşumuna yol açan mutasyonlar. Her 3 mutasyon preC mRNA'dan kor protein sentezini engeller, bunun dışında pg/C mRNA'dan kor proteini yapımını etkilemezler (26, 33, 43, 44, 66, 89, 102).

HBeAg'nin virüsün replikasyonu için gerekli olmadığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiş olmasına karşın, bazı in vitro çalışmalarda preC kusurunun daha fazla RNA'nın kapsid içine alınmasına ve/ya da replikasyonda artışa neden olduğuna değinilmiştir. Replikasyon artışı prekor proteininin negatif düzenleyici etkisinin ortadan kalkmasına atfedilmiştir. Buna karşın preC kusurunun viral replikasyon ve enkapsidasyon üzerine etkisi gözlenmemiştir (26, 33, 43, 44, 66, 89, 102).

Prekor mutasyonları içinde en sık gözlenen mutasyonlar, stop kodon oluşumuna yol açanlardır. Bu mutasyonlar içinde de en sık gözleneni A-G mutasyonudur. Bu

mutasyonunu sık gözlenmesi G-A hipermutasyonu ile açıklanabilir. G-A hipermutasyonu genelde ard arda gelen G nükleotidlerinin ilkinde oluşmaktadır. Sonuç olarak kısa bir preC proteini oluşur. İmmünolojik çalışmalar bu proteinin infekte hepatositlerin nükleus ve sitoplazmasında bulunabildiğini göstermiştir (26, 33, 43, 44, 66, 89, 102).

pg/C mRNA'da 1817, 1874, 1897'de yer alan nükleotid değişimleri sonucu "stop" kodon oluşumuna yol açan mutasyonlar gözlenebilmektedir. Teorik olarak bu bölgede tek bir mutasyonla stop kodona dönüşebilecek 10 kodon vardır. Bu 3 mutasyonun dışında kalan mutasyonlar, RNA enkapsidasyon sinyalinin fonksiyonunu bozarlar, bundan dolayı *in vivo* rastlanmazlar (26, 33, 43, 44, 66, 89, 102).

Çerçeve kayması mutasyonları ise nadir olarak gözlenmektedirler. İnsersiyon ve delesyonların hemen hepsi de DR1 ve X genini 3' ucunun dışında yer alır, çünkü bunlar düzenleyici segmentlerdir ve istisna olarak enkapsidasyon sinyalinin yer aldığı 1899-1900'lerde meydana gelen nükleotid değişiklikleridir. İnsersiyonlar tek başına paketleme ve replikasyonda büyük düşüşler oluşturur. Buna karşın insersiyonla beraber nükleotid değişimi bu fonksiyonların geri dönmesine yol açar, X geninde bazı insersiyonlar gerçekleşebilir ve bunun sonucu X-C füzyonu gerçekleşir. Füzyona uğramış X-C proteinleri transaktivatör özelliklerini kaybetmemektedir (26, 33, 43, 44, 66, 89, 102).

Başlangıç kodonunda oluşan mutasyonlar bazı hastalarda 1896 G-A mutasyonuna ek olarak saptanmıştır. Yine 1896 G-A mutasyonları ile birlikte gözlenen 1899 G-A ve 1858 G-T mutasyonları sessiz mutasyonlardır. Ayrıca 1888 G-A, 1862 G-A,T,C (Afrika'da sık gözlenir) ve 1856 C-T mutasyonu (15. kodondaki prolinin serine dönüşüne yol açar ama HBeAg'yi etkilemez) sessiz mutasyonlardır (26, 33, 43, 44, 66, 89, 102).

Kor promoter bölgesinde ise en sık gözlenen mutasyon 1762 A-T ve 1764 A-G mutasyonudur. Tek başlarına bu mutasyonlara nadir rastlanmaktadır. Bu mutasyonlar sonucu HBeAg yapımının ve viral replikasyonun değişebileceği bildirilmiştir. Yine bu mutasyonlar fulminan hepatitli ve HCC'li hastalarda bulunmuşlardır. Tek başlarına nadir olarak bulunurlar. X gen bölgesi ile örtüşüklerinden bu proteini değişimine de yol açabilmektedirler. Bu mutasyonların yanı sıra 1764 A-G, 1766 A-G mutasyonları da 1762 mutasyonu ile beraber görülebilir. Yine bu mutasyonlara 1810-1811.

konumlardaki nükleotid değişiklikleri eşlik edebilmektedir. Ek olarak 1753-1757 mutasyonlarının da 1762-1764 mutasyonlarına eşlik ettiği gözlenmiştir. Bu bölgede yine 8 bazdan 21 baza kadar olan delesyonlarda değişik hasta gruplarında bildirilmiştir. Tüm bu mutasyonlar X gen bölgesi ile örtüşüklerinden, bu proteinin değişmesine yol açabilmektedirler. Böylelikle transaktivatör işlevi ve buna bağlı olarak replikasyon hızları da değişikliğe uğrayabilmektedir (26, 33, 43, 44, 66, 89, 102).

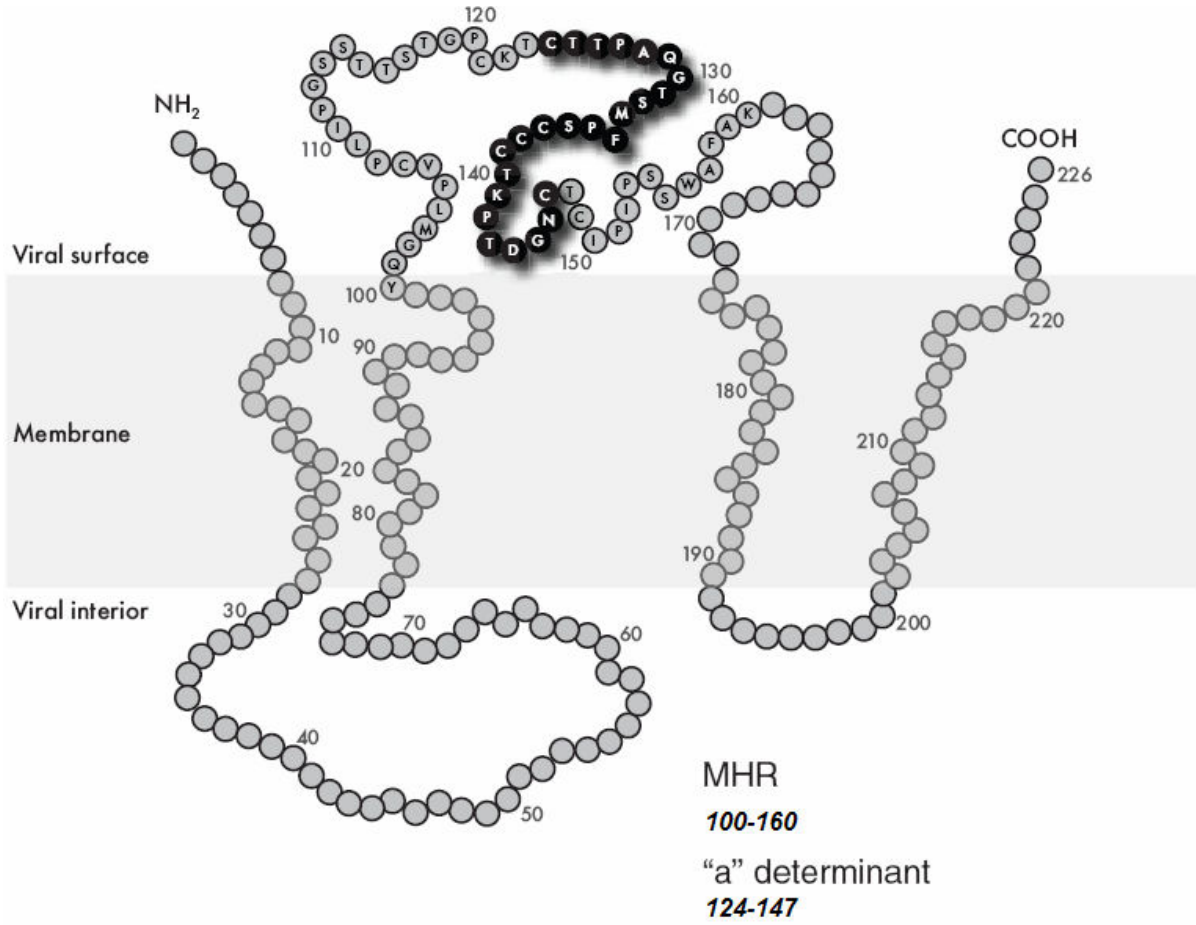
2.13.2. Yüzey Proteini Mutasyonları

Yüzey ya da zarf proteinlerini kodlayan genlerde (preS 1, preS2 ve S) oluşacak mutasyonlar virüsün bağışıklık sistemi tarafından tanınmasını engelleyebileceği gibi virüsün tanımlanmasını ve rutin kullanılan aşılarda bu mutant tip virüs üzerine etkili olabilmelerini de engelleyebilir (26, 33, 43, 44, 66, 89, 102).

Bu bölge ile ilgili delesyon mutasyonlarına en sık preS 1 ve S2 gen bölgesinde rastlanmaktadır. Bu gen bölgelerinde oluşacak değişik uzunluktaki delesyon mutasyonları HBsAg sentezini engelleyebilir. Bu durumda olgun viryonun zarfla çevrelenememesi dolayısıyla bu tip viryonların infekte hücrelerden salınımının gerçekleşmemesi beklenir. Pratikte ise bu durum virüsü infekte eden yabancı tip virüslerin sağladıkları HBsAg'lerle kompanse edilir. Bu tip delesyonlu mutantlar bu yüzden özellikle uzamış kronik enfeksiyonlu kişilerde gözlenir (26, 33, 43, 44, 66, 89, 102).

HBsAg'nin klinik açıdan en önemli determinantı “a” antijenik determinantıdır (124. amino asitten 147. amino asitte). Enfeksiyonun doğal seyri esnasında tüm antijenik belirleyicilere karşı antikorlar üretilmekte fakat “a” antijenik belirleyicisi ortak olduğu için diğer alt tip HBV enfeksiyonlarına karşı koruyucu olacak antikor bu belirleyiciye karşı oluşan antikorlardır. “a” antijenik belirleyicisi yapısı sitidin-124 ve sitidin-137 (ilk halka) ile sitidin-139 ve sitidin-147 (ikinci halka) arası disülfid bağları ile stabilize edilmiş çift halka yapısı gösterir. Bu 4 sitidin, iki halka yapısının temellini oluştururlar ve yüksek derecede korunmuşlardır (Şekil 7).

Şekil 7. “a” determinanı ve MHR bölgesi (35. Kaynaktan değiştirilerek alınmıştır)



Eğer bu yapı bir şekilde mutasyona uğrayıp bozulursa “a” antijenik belirleyicisine karşı oluşan antitikorlar da koruyucu özelliklerini kaybedeceklerdir.

Bu tip “a” antijenik belirleyicisi mutasyonlarının genellikle iki temel sebep ile geliştiği düşünülmektedir. Bunlardan ilki, konak bağışıklık sisteminin humoral veya hücrel bağışıklık mekanizmaları ile HBV’nin yabancı tiplerinin baskılanması sonucu mutant tiplerin pozitif seçimidir. İkinci görüş, HBV’nin polimeraz gen bölgesinde, uygulanan antiviral ilaç tedavisi sonucu oluşan mutasyonların, bu bölge ile örtüşen S gen bölgesini de etkilemesidir.

Virüsün immün sistem tarafından tanınmasını sağlayan belirleyicisi, virüsün zarfının dış kısmında kalan ve majör hidrofilik bölge (“Major Hydrophilic Region” =

MHR) diye adlandırılan bölge ile çevrilidir. MHR 100-160. amino asitlerini kapsamaktadır ve bu bölge mutasyonları ile HBsAg'nin antijenik yapısının bozulduğu çeşitli yayınlarda belirtilmiştir (12, 35, 72, 95).

HBsAg, immunodominant olan "a" belirleyicisi ile alt tiplere özgü allelik belirleyiciler olan d/y ve w/r determinantlarını taşır. Böylelikle HBsAg, 4 ana alt tipe ayrılmıştır; *adw*, *adr*, *ayw* ve *ayr*. Sonraları, daha ileri alt belirleyicilerin bulunması sayesinde, HBsAg 9 alt tipe ayrılmıştır; *ayw*₁₋₄, *ayr*, *adw*₂, *adw*₄, *adr* *q*⁺ ve *adr* *q*⁻. *d/y* değişimi temel olarak S geninde 122. kodondaki lizinin yerini argininin almasıyla belirlenir. Aynı şekilde *w/r* değişimi de temel olarak S geninde 160. kodondaki lizinin yerini argininin almasıyla belirlenir (48, 55, 66, 76, 78). Daha ayrıntılı serotip dağılımı Tablo 4'te sunulmuştur.

"a" determinantına zarar vermeyen fakat diğer alleler olan *w/r* (Lizin-160 - Arginin) değişiminin klinik önemi yoktur. Bunun yanı sıra enteresan olarak *d/y* allelik mutasyonu (Lizin-122-Arginin) HBeAg pozitif anneden doğan bebekte pasif-aktif immünoproflaksinin başarısızlığına yol açabilmektedir (26, 33, 45, 66, 89, 102).

Tablo 4. HBV'nin S bölgesi antijenik belirteçlerinin protein dizilerine göre serotip ayrımları.

122 Lys						
160 Lys					160 Arg	
127 Pro	127 Thr	127 Ile/Leu			177 Val	177 Ala
adw2	adw3	178 Phe	178 Gln		Adrq+	adrq-
		Adw4q+	adw4q-			
122 Arg						
160 Lys					160 Arg	
127 Pro			127 Thr		127 Ile/Leu	Ayr
159 Ala	159 not Ala		ayw3		ayw4	
ayw1	134 Phe	134 n Phe				
ayw1		ayw2				
122 Arg						
160 Lys					160 Arg	
127 Pro			127 Thr		127 Ile/Leu	Ayr
159 Ala	159 not Ala		ayw3		ayw4	
ayw1	134 Ser	134 n Ser				
ayw1		ayw2				

2.13.3. Polimeraz Geni Mutasyonları

Son yıllarda diğer viral hastalıkların tedavisi için geliştirilmiş lamivudin ve famsiklovir gibi pek çok antiviral günümüzde HBV infeksiyonlarının tedavisi için de kullanılmaktadır. HBV polimerazı, RT aktivesine de sahiptir. Bu aktivitenin katalitik kısmında (203-206. Kodonlar arasında yer alan YMDD motifi = tirozin-metyonin-aspartik asit-aspartik asit) oluşan mutasyonlar özellikle hem erişkin hem de pediatrik kronik hepatit B hastalarının tedavisinde yaygın olarak kullanılan lamivudine karşı direnç gelişimine yol açabilmektedir (26, 28, 33, 45, 66, 89, 102).

Bu açıdan uzun süreli lamivudin kullanan hastalarda bu katalitik kısımda mutasyonlar sık gözlenebilmektedir. YMDD motifi bu hastalarda incelendiğinde M204'nin V'ye, I'ya S'ye dönüştüğü bu motifin mutasyon sonucu, YVDD (metyonin - valin - aspartik asit - aspartik asit), YIDD (metyonin-izolösin-aspartik asit-aspartik asit) YSDD (metyonin-serin-aspartik asit-aspartik asit) şekline dönüştüğü gözlenmiştir. Bu durumda polimeraz enzimi aktivitesi olumsuz yönde etkilenmektedir. Bu olumsuz etki, çoğu zaman 180. kodonda oluşan lizin-metyonin mutasyonu ile kompanse edilir ve genellikle YMDD mutasyonlarına L180M mutasyonu eşlik etmektedir. Bunun dışında HBV polimerazın A, B ve D bölgelerindeki (domain) bazı mutasyonların da lamivudin direnciyle ilişkili olduğu bildirilmiştir (26, 28, 33, 45, 66, 89, 102).

En sık kullanılan antivirallere direnç mutasyonlarını lamivudin için M204V/I/S, L180M ve V173C; adefovir için A181V/T, N236T; Adefovir, entekavir direnci için V1233V, S184G, I169T, S202I, M250V (son dört mutasyon lamivudin direncine de yol açar), telbivudine tenofovir için M204I, A194T ile birlikte lamivudin direnç mutasyonları, emtricitabin için M204I/V, L180M ve V173C mutasyonlarını, valtorcitabine, clevudin ve elvicitabin için M204I/V, L180M mutasyonlarını sayabiliriz (26, 28, 33, 45, 66, 89, 102).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan Cihazlar ve Aletler

Mikrosantrifüj	Biofuge Stratos, Heraeus, Almanya
-20, +4	Beko Türkiye
Isı Blokları	Gen Probe, San Diego A.B.D.
Pipet Seti (10-100-100 µl)	Eppendorf, Almanya
Vorteks	Combispin, Biosan, Litvanya
PCR Cihazı	PT 100 PCR cihazı, MJ Research, A.B.D.
Real Time PCR Cihazı	7000SDS, AppliedBiosystems, Foster City, A.B.D.
Genetik Analiz Cihazı	ABI 310GA, AppliedBiosystems, Foster City, A.B.D.
UV Spektrofotometre	Biotech photometer UV1101, WPA, İngiltere
UV Tablası	Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, A.B.D.
Jel Elektroforez Sistemi	Midicell Primo, Thermo Scientific, A.B.D.
Manyetik Stand	King-Fisher, Thermo Scientific, A.B.D.
Etüv	Memmert, Almanya

3.1.2. Kullanılan Kimyasal ve Sarf Malzemeleri

DNA izolsyon kiti	Affigene® DNA extraction, Sangtec Molecular Diagnostics, İsveç
-------------------	--

HBV Viral Yük Tayini Kiti	COBAS TaqMan [®] 48, F. Hoffmann-La Roche Ltd, İsviçre
DNAz-RNAz İçermeyen Su	Merck, Amerika
dNTP karışımı	Fermentas, Kanada
10x Taq Buffer	Fermentas, Kanada
MgCl	Fermentas, Kanada
Taq DNA Polimeraz	Fermentas, Kanada
Primerler	AppliedBiosystems, Foster City, A.B.D.
Agaroz	Sigma-Aldrich, A.B.D.
Streptavidin	Sigma-Aldrich, A.B.D.
HBsAg Pozitif Kontrol	Surase B-96 (TMB) kitinin Pozitif Kontrol kullanıldı
Anti-HBs kaplı manyetik partiküller	Mouse, Monoklonal IgG + Monoklonal IgM, MES Buffer içinde, minimum %0.0675 konsantrasyonda, Abbot, Architect
Biyotin işaretili Anti-HBs	Goat, IgG, TRIS Buffer içinde Minimum Konsantrasyon 0.25 µg/ml, Abbot, AxSYM
PBS	Sigma-Aldrich, A.B.D.
BSA	Sigma-Aldrich, A.B.D.
Tween 20	Sigma-Aldrich, A.B.D.
TaqMan Universal Master Miks	AppliedBiosystems, Foster City, A.B.D.
TaqMan Prob	AppliedBiosystems, Foster City, A.B.D.
Internal Pozitif Kontrol	AppliedBiosystems TaqMan [™] Exogenius Internal Positive Control, AppliedBiosystems, Foster City, A.B.D.
EXO-Sap IT	USB Corp. A.B.D.
Sephadex G-50 Fine	Sigma-Aldrich, A.B.D.
Spin kolonlar (PCR Saflaştırma)	MACHEREY-NAGEL GmbH&Co.KG, Almanya

Big Dye Terminator v1.1 Kit	AppliedBiosystems, Foster City, A.B.D.
POP6	AppliedBiosystems, Foster City, A.B.D.
Kapiler	AppliedBiosystems, Foster City, A.B.D.
Pipet uçları	Gilson, Inc., A.B.D.
ELISA Plağı	Gilson, Inc., A.B.D.
Ependorf tüp	Gilson, Inc., A.B.D.
310 Örnek Tüpü	AppliedBiosystems, Foster City, USA
310 Örnek Tüpü Septası	AppliedBiosystems, Foster City, USA
0.2 ml PCR Tüpü	Gilson, Inc., A.B.D.

3.1.3. Kullanılan Yazılımlar

Primer Ekspress v 3.0	AppliedBiosystems, Foster City, A.B.D.
7000 SDS software	AppliedBiosystems, Foster City, A.B.D.
Sequencing Analysis v1.4 software	AppliedBiosystems, Foster City, A.B.D.
DNA Star SeqManII	DNASTAR, Inc., A.B.D.
BioEdit 7.0.9.0	http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/
HBV Grade Tool	http://www.hiv-grade.de/cms/grade/

3.2. Örneklerin Toplanması

Tez çalışması için İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Seroloji ve Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarlarına hastanemizin değişik birimlerinden ve diğer kurumlardan hepatit seroloji paneli için baş vuran kişilerden alınan kanlardan ayrılan serumlar ve İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalında izole-

anti-HBc nedeni ile takip edilen hastalardan alınan kanlardan ayrılan serumlar kullanıldı.

Tez çalışması sırasında seroloji laboratuvarına 2006-2007 yılları arasında başvuran, hepatit belirteçleri için yapılan testlerle HBsAg, anti-HBs, HBeAg ve anti-HBe belirteçlerinin tümü negatif, anti-HBc'leri pozitif olan bireyler tez çalışmasına dahil edildiler. Bu bireylerin serum örnekleri, yapılan ELISA testlerinin doğrulanması amacı ile iki defa kontrol edildi. Bu grup "İzole anti-HBc Pozitif" grup olarak tanımlandı.

Tasarlanan "Immuno-Real Time PCR" yönteminin kontrolü ve optimizasyonu için iki kontrol grubu oluşturulması planladı. Bu amaçla, hepatit B belirteçlerinden HBsAg pozitif, anti-HBs negatif, HBeAg ve anti-HBe pozitif ya da negatif, anti-HBc total (IgM ve IgG) pozitif olan kişilerin serumları "Hepatit B Pozitif" olarak tanımlandı. Bu serumlar "Hepatit B Pozitif" kontrol grubunu oluşturdular (n=30).

Hepatit belirteçlerinden HBsAg negatif, anti-HBs pozitif ya da negatif, HBeAg, anti-HBe ve anti-HBc total (IgM ve IgG) negatif olan kişilerin serumları "Hepatit B Negatif" olarak tanımlandılar. Bu serumlar "Hepatit B Negatif" kontrol grubunu oluşturdular (n=30).

Tüm örneklerin seroloji testlerin tamamlandıktan sonra elimizde kalan yedek serumları -20°C'de daha sonra uygulanacak laboratuvar testleri için saklandı.

3.3. Örneklerden Nükleik Asit Saflaştırılması

Örneklerden nükleik asit saflaştırılması Affigene® DNA extraction (Sangtec Molecular Diagnostics AB Box 20045, SE-161 02 Bromma, İsveç) kiti kullanılarak yapıldı.

Bu amaçla tüm örneklerden 200 µl'lik serumlar 1.5 ml'lik steril ependorf tüplerine aktararak üzerlerine 200 µl lizis solusyonu ve 25 µl proteinaz K eklendi. Oda ısısında 15 dakika inkübasyondan sonra örnekler 60°C'e 15 dakika inkübe edildiler. Inkübasyon sonrası üzerlerine 300 µl %100 etanol eklenen örnekler vortekslenip kitin içeriğindeki DNA bağlayıcı kolonlara aktararak 11.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildiler. Santrifüj sonrası örnekler sırası ile 500 ve 600 µl'lik hacimlerdeki yıkama

tamponu (wash buffer) 1 ve 2 ile yıkandılar. Örneklerde kalmış olabilecek etanolun uçması için örnek kolonları 11.000 rpm’de 1 dakika boş olarak santrüfuj edildiler, 1.5 ml’lik temiz ependorf tüplerine aktarıldılar ve oda ısısında 5 dakika daha bekletildiler. Örneklerden DNA izolasyonu için kolonların üzerine 35 µl ayrıştırma tamponu (elution buffer) eklendi, oda ısısında 3 dakika bekletildikten sonra 11.000 rpm’de santrifuj işlemi ile nükleik asit ekstraksiyon işlemi tamamlandı. Nükleik asit saflaştırma ürünleri ileri testler çalışılincaya kadar -20°C’de saklandı.

3.4. Örneklerde HBV DNA Varlığının PCR Yöntemi ile Belirlenmesi ve Viral Yüklerin Real Time PCR ile Tayini

Örneklerin nükleik asit ekstraksiyon işlemleri tamamlandıktan sonra tüm gruplar (HBV pozitif örnek grubu n=30, HBV negatif örnek grubu n=30, izole anti-HBc Pozitif örnek grubu n=24) HBV DNA varlığı açısından semi nested PCR yöntemi ile test edildiler.

Semi nested PCR test sonuçlarının doğrulanması ve viral yük belirlenmesi amacı ile izole anti-HBc pozitif örnek grubu, COBAS TaqMan® 48 (F. Hoffmann-La Roche Ltd Group Headquarters Grenzacherstrasse 124 CH-4070 Basel Switzerland) sistemi kullanılarak, üretici talimatları doğrultusunda test edildiler. İzole anti-HBc pozitif hastaların daha sonraki test çalışmaları için COBAS TaqMan® 48 testinin sonuçları referans alındı.

Semi nested PCR işlemi için Tablo 5’de dizileri verilen primerler kullanıldı. Bu primerler ile HBV genomunun polimeraz ve S Gen bölgesini kapsayan HBV genomunun 57-707. nükleotidler arasındaki 650 bp’lik bölgesi çoğaltıldı (2, 47, 84).

Tablo 5. Semi nested PCR ve DNA Dizi Analizi için kullanılan primerler

Primerin İsmi	Yönü	Dizisi
HBV14	Ters (707-687)	Biotin-ACATACTTTCCAATCAATAG
HBV12	Düz (2850-2868)	GGGTCACCATATTCTTGGG
Pol59F	Düz (57-77)	CCTGCTGGTGGCTCCAGTTC

Semi nested PCR işleminin birinci aşaması HBV12 ve HBV14 primerleri kullanılarak gerçekleştirildi. Birinci aşama işlemleri için tablo 6’da belirtilen karışım hazırlandı. Hazırlanan karışımın üzerine örnek gruplarından elde edilen nükleik asit saflaştırma ürünlerinden 15 µl eklendi. Böylelikle HBV genomunun 2850-707. bazları arasında kalan bölge çoğaltılmış oldu (1057 baz çifti). Birinci aşamadan elde edilen ürünler ikinci aşama PCR işlemleri için kullanıldı.

Laboratuvarımızda HBV pozitif kontrol olarak kullandığımız HBV DNA (daha önce yüksek viral yüke sahip hastadan elde edilen HBV DNA örneği) testler için pozitif kontrol olarak kullanıldı. Negatif kontrol olarak HBV DNA içermeyen (daha önce test edilmiş negatif hasta serumu) serum örneği kullanıldı.

Semi nested PCR işleminin ilk aşamasında düşük viral yüke sahip hastaların DNA kopya sayılarını arttırmak amaçlandı. Bunun yanı sıra ikinci amacımız “Immuno-Real Time PCR” yöntemi için kullanılacak hedef DNA’yı hazırlamaktı. Bu amaçla, HBV14 primeri biyotin işaretli sipariş edildi. Pozitif kontrol örneğinden elde edilen birinci aşama PCR ürünü saflaştırıldıktan sonra UV spektrofotometre ile kantitasyonu yapıldı ve miktarı ayarlanıp (10^{12} kopya/ml) “Immuno-Real Time PCR” yöntemi için hedef DNA olarak kullanıldı.

Tablo 6. Semi nested PCR - Birinci Aşama Bileşenleri

Bileşen	Miktar	Konsantrasyon
DNAz-RNAz İçermeyen Su	23.5 µl	50 µl son reaksiyon hacmini tamamlamak için
dNTP karışımı	1.0 µl	200 mM (Fermantas)
Primer HBV14	1.0 µl	Primerin son konsantrasyonu 25 Mm
Primer HBV12	1.0 µl	Primerin son konsantrasyonu 25 mM
10x Taq Buffer	5.0 µl	1x (Fermantas)
MgCl	3.0 µl	
Taq DNA Polimeraz	0.5 µl	2.5U (Fermantas)
Örnek DNA'sı	15.0 µl	
Toplam Hacim	50.0 µl	

PCR için hazırlanan karışım, MJ Research PT 100 PCR cihazında, çoğaltma işlemleri için Tablo 7’deki program kullanılarak inkübe edildi.

Tablo 7. Semi nested PCR - Birinci Aşama PCR Programı

Aşama	Isı	Süre (Dakika)	Tanım
1. Bekleme	95 °C	02.00	Denatürasyon
2. PCR Aşaması	95 °C	00.45	45 Döngü PCR ile Çoğaltma
	49 °C	01.00	
	72 °C	02.00	
3. Bekleme	72 °C	05.00	Uzaması tamamlanmamış ürünlerin tamamlanması
4. Bekleme	04 °C	Sonsuz	İkinci aşama PCR’a Kadar Saklamak için

Semi nested PCR işleminin ikinci aşaması Pol59F ve HBV14 primerleri kullanılarak gerçekleştirildi. İkinci aşama işlemleri için Tablo 8’de belirtilen karışım hazırlandı. Hazırlanan karışımın üzerine birinci aşama ürünlerinden 3 µl eklendi. Böylelikle HBV genomunun 57-707. bazları arasında kalan bölgesi çoğaltılmış oldu (650 baz çifti).

PCR için hazırlanan karışım, MJ Research PT 100 PCR cihazında, çoğaltma işlemleri için tablo 9’daki program kullanılarak inkübe edildi.

Değerlendirme için örnekler %1,5’luk agaroz jel elektroforezinde yürütüldükten sonra UV tablada bantlar incelenerek 650 bp’de pozitif bant veren sonuçlar kaydedildi. İzole anti-HBc pozitif hasta grubunda HBV DNA’sını PCR yöntemi ile saptadığımız hastaların PCR ürünleri -20 °C’de DNA dizi analizi için saklandı.

Tablo 8. Semi nested PCR - İkinci Aşama Bileşenleri

Bileşen	Miktar	Konsantrasyon
DNAz-RNAz içermeyen Su	35.5 µl	50 µl son reaksiyon hacmini tamamlamak için
dNTP karışımı	1.0 µl	200 mM (Fermantas)
Primer HBV14	1.0 µl	Primerin son konsantrasyonu 25 Mm
Primer Pol59F	1.0 µl	Primerin son konsantrasyonu 25 mM
10x Taq Buffer	5.0 µl	1x (Fermantas)
MgCl	3.0 µl	
Taq DNA Polimeraz	0.5 µl	2.5U (Fermantas)
Birinci Aşama DNA'sı	3.0 µl	
Toplam Hacim	50.0 µl	

Tablo 9. Semi nested PCR - İkinci Aşama PCR Programı

Aşama	Isı	Süre (Dakika)	Tanım
1. Bekleme	95 °C	02.00	Denatürasyon
2. PCR Aşaması	95 °C	00.45	45 Döngü PCR ile Çoğaltma
	50 °C	01.00	
	72 °C	02.00	
3. Bekleme	72 °C	05.00	Uzaması tamamlanmamış ürünlerin tamamlanması
4. Bekleme	04 °C	Sonsuz	Yürütme aşama PCR'a Kadar Saklamak için

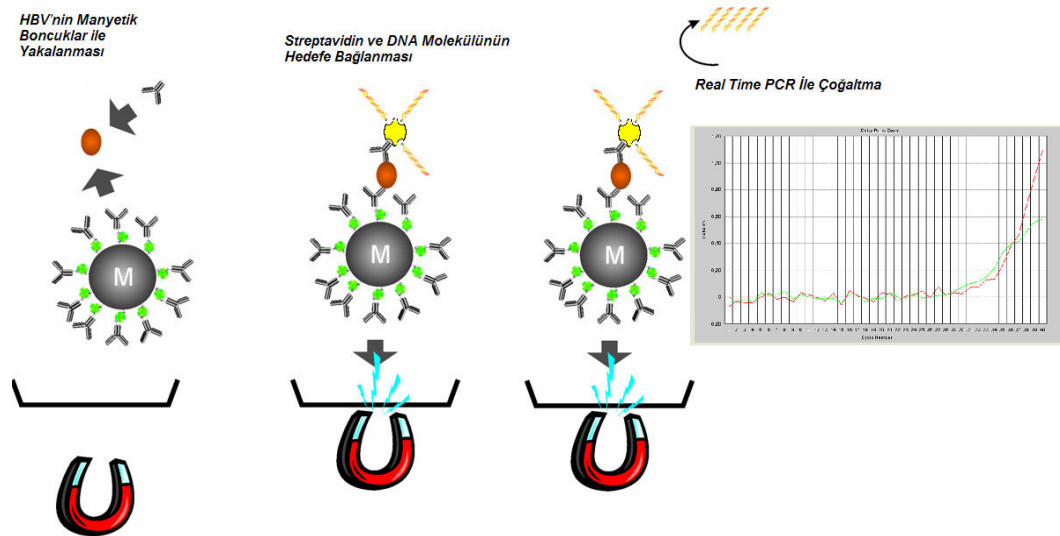
3.5. Örneklerin “Immuno-Real Time PCR” Testleri

“Immuno-Real Time PCR” yöntemi klasik ELISA yöntemi ile moleküler bir teknik olan “Real Time PCR” yönteminin birleştirilmesinden türetilmiş yeni bir tanı

yöntemidir. Bu yöntemde klasik ELISA'dan farklı olarak konjugat (enzim işaretli antikor) bir enzim yerine DNA dizisi ile işaretlenir. Antijen antikor bağlanma aşamalarından sonra (klasik ELISA'daki konjugat gibi) antikora bağlı olan DNA, genellikle bir restiriksiyon enzimi ile kesim ve sonrasında saflaştırma ile sistemden ayrılır. Saflaştırılan DNA dizisinin saptanması, klasik ELISA yönteminde olduğu gibi kemilüminisans ya da kolorometrik yöntemler ile değil Real Time PCR ile yapılmaktadır (56, 60, 61, 62, 65, 94).

Optimize ettiğimiz “Immuno-Real Time PCR” testinde, daha duyarlı ve otomasyona daha açık olmaları nedeni ile antikor kaplı ELISA plakları yerine, antikor kaplı manyetik boncukları kullandık. Hazırladığımız hedef DNA'yı, antijen antikor reaksiyonlarının gelişmesi halinde, sisteme bağlayabilmek için (biyotin işaretli ikincil antikor ile biyotin işaretli hedef DNA'mız arasında köprü oluşturmak amacı ile) streptavidin molekülünü köprü olarak kullandık. Antikor ile konjugasyon için gerekli DNA, (hedef DNA, 10^{12} kopya/test) daha önce de belirttiğimiz gibi, semi nested PCR işleminin ilk aşamasında HBV'nin polimeraz gen bölgesinin, biyotinli primerler kullanılarak çoğaltılması ve saflaştırılması ile elde edildi. (Şekil 8. Immuno Real Time PCR Aşamaları)

Şekil 8. Immuno-Real Time PCR” Aşamaları



Öncelikle hepatit B pozitif ve negatif örnek gruplarından 4'er örnek alındı ve optimizasyon çalışmalarına başlandı. Optimizasyon aşamaları başarı ile tamamlandıktan

sonra “Hepatit B Pozitif” kontrol grubundaki 30 örnek, “Hepatit B Negatif” kontrol grubundaki 30 örnek “Immuno-Real Time PCR” yöntemi ile test edilerek yöntemin güvenilirliği belirlendi. Daha sonra HBsAg’nin bilinen konsantrasyonları (Surase B-96 (TMB) kitinin Pozitif Kontrolü kullanıldı) ile yöntemin analitik duyarlılığı belirlendi. Bu amaçla HBsAg’nin 1-400.000 pg’lık dilüsyon serisi hazırlandı ve bu örnekler “Immuno-Real Time PCR” yöntemi ile test edildiler. Tüm bu kontrol ve optimizasyon çalışmalarından sonra izole anti-HBc pozitif örnek grubu “Immuno-Real Time PCR” yöntemi ile test edildi.

Yapılan optimizasyon çalışmalarından sonra “Immuno-Real Time PCR” testinin uygulanma basamakları aşağıdaki gibi planlandı.

1. Anti-HBs kaplı manyetik partiküller (Mouse, Monoklonal IgG + Monoklonal IgM, MES Buffer içinde, minimum %0.0675 konsantrasyonda, Abbot, Architect) 100 µl olacak şekilde U tabanlı ELISA plağına aktarıldı. Bu partiküller üzerine 100 µl serum eklenerek pipetle karıştırma işlemi yapıldı ve karışım 45 dakika 37 °C inkübe edildi.
2. Manyetik stand üzerine alınan örneklerde manyetik partiküllerin çökmesi sağlandı ve üstte kalan kısım ayrılarak atıldı, kalan manyetik boncukların üzerine 100 µl biyotin işaretli anti-HBs (Goat, IgG, TRIS buffer içinde minimum konsantrasyon 0.25 µg/ml, Abbot, AxSYM) eklenerek pipetle karıştırma işlemi yapıldı ve karışım 45 dakika 37 °C inkübe edildi.
3. Manyetik stand üzerine alınan örneklerde manyetik partiküllerin çökmesi sağlandı ve üstte kalan kısım ayrılarak atıldı. Kalan manyetik boncuklar 150 µl PBSw (PBS, %1 BSA ve 0.1 Tween 20) ile 10 defa yıkandı. Üst sıvı atıldı.
4. Kalan manyetik boncukların üzerine 100 µl Tampon C (Biyotin işaretli hedef DNA (10^{12} kopya) ve streptavidinin (10 µg/ml) taze hazırlanmış karışımı) eklendi. 45 dakika oda ısısında inkübasyon yapıldı.

5. Manyetik stand üzerine alınan örneklerden üstte kalan kısım ayrılarak atıldı. Kalan manyetik boncuklar 150 µl PBSw (PBS, %1 BSA ve 0.1 Tween 20) ile 10 defa yıkandı. Üst sıvı atıldı.
6. Kalan manyetik boncuklar üzerlerine 50 µl DNAz-RNAz içermeyen distile su konularak süspanse edildiler ve 0.2 ml'lik steril ependorf tüpe alındılar. Süspansiyon, 99⁰C'de 5 dakika MJ Research PT 100 cihazında inkübe edilerek DNA'ların tek iplikli halde sıvı faza geçmesi sağlandı. Denatürasyonu takiben (örnekleri soğutmadan) hemen manyetik standa alınan süspansiyonda manyetik boncukların çökmesi ve sıvı içinde tek iplikli hedef DNA'nın kalması sağlandı. Bu üst sıvı yeni steril 0.2 ml'lik ependorf tüpüne aktarılarak Real Time PCR reaksiyonları için kullanıldılar.

Real Time PCR için primerler ve prob X68292 numaralı HBV genomu baz alınarak Primer Ekspres v 3.0 (AppliedBiosystems Foster City, USA) ile tasarlandı. Testi inhibe edebilecek PCR inhibitörlerinin varlığının kontrolü amacı ile “AppliedBiosystems TaqManTM Exogenous Internal Positive Control” kiti kullanıldı.

Tablo 10. “Immuno-Real Time PCR” için kullanılan primerler ve prob

Primerin İsmi	Yönü	Dizisi
HBV-IPCR-f	Düz	TAGGGCTTTCCCCCACTGT
HBV-IPCR-r	Ters	GGCCCCCAATACCACATCA
HBV-Probe	Düz	FAM-TGGGTTTCAGCTATATGG-MGB

Real Time PCR işlemi için tablo 11’de belirtilen karışım hazırlandı. Hazırlanan karışımın üzerine yapılan “Immuno-Real Time PCR”ın 6. basamağında elde edilen DNA örneklerinden 5 µl eklendi.

Tablo 11. “Immuno-Real Time PCR” testi, Real Time PCR Bileşenleri

Bileşen	Miktar	Konsantrasyon
DNAz-RNAz İçermeyen Su	1.5 µl	25 ul son reaksiyon hacmini tamamlamak için
TaqMan Universal		
Master Miks	12.5 µl	1x
Primer HBV-IPCR-f	1.0 µl	Primerin son konsatrasyonu 900 nM
Primer HBV-IPCR-r	1.0 µl	Primerin son konsatrasyonu 900 nM
Primer HBV-Probe	1.0 µl	Probun son konsatrasyonu 200 nM
10x IPC Miks	2.5 µl	1x
IPC DNA	0.5 µl	1x
DNA'sı	5.0 µl	
Toplam Hacim	25.0 µl	

Real Time PCR için hazırlanan karışım, AppliedBiosystems SDS 7000 cihazında, çoğaltma ve saptama işlemleri için tablo 12’deki program kullanılarak inkübe edildi. AppliedBiosystems SDS 7000 cihazı ile gerçek zamanlı toplanan PCR amplifikasyon verileri, cihazın kendi yazılımı olan SDS 7000 software v1.0 ile analiz edildiler. Yazılımın elde ettiği eşik döngü değerleri (“cycle of threshold” = Ct) ileri analizler için kullanıldı.

Tablo 12. Real Time PCR Programı

Aşama	Isı	Süre (Dakika)	Tanım
1. Bekleme	95 °C	10.00	Taq Polimeraz Aktivasyonu
2. PCR ve	95 °C	00.15	
Deteksiyon	60 °C	01.00	40 Döngü
Aşaması			

3.6. Örneklerin DNA Dizi Analizi ve “a” Determinantı Mutasyonlarının Belirlenmesi

Daha önce de belirtildiği gibi, semi nested PCR ürünleri pozitif bulunan izole anti-HBc pozitif örnek grubunun çoğaltılan HBV DNA parçaları, DNA dizi analizi ile incelendi.

DNA dizi analizinden önce PCR karışımında bulunan ve DNA dizi analiz reaksiyonları ile etkileşime girerek sonuçların bozulmasına sebep olabilecek bileşenlerin (Primer ve dNTP gibi) ortadan kaldırılması için PCR ürünleri EXO-Sap IT (USB Corp. USA) ile muamele edildiler. Bu işlem için tablo13’deki karışım hazırlandı ve karışım MJ Research PT 100 PCR cihazında tablo 14’deki program kullanılarak inkübe edildi.

Tablo 13. PCR ürünlerinin saflaştırılması için kullanılan bileşenler

Bileşen	Miktar	Konsantrasyon
Exo-Sap IT	2.0 µl	1x (USB Corp. USA)
PCR Ürünü	5.0 µl	
Toplam Hacim	7.0 µl	

Tablo 14. PCR ürünlerinin saflaştırılması için kullanılan PCR Programı

Aşama	Isı	Süre (Dakika)	Tanım
1. Bekleme	37 °C	15.00	Enzim Reaksiyonları
2. Bekleme	85 °C	15.00	Enzim İnaktivasyonu

dNTP ve kullanılmamış primerlerden arındırılan PCR örneklerinin DNA Dizi Analizleri AppliedBiosystems Big Dye v1.1 (AppliedBiosystems, Foster City, USA) kiti kullanılarak yapıldı. Bu amaçla tablo 15’deki DNA dizi analiz karışımı hazırlandı ve karışım MJ Research PT 100 PCR cihazında tablo 16’deki program kullanılarak döngüsel dizileme “cyclesequencing” işlemine tabi tutuldu.

Tablo 15. Döngüsel Dizileme Reaksiyonları Bileşenleri

Bileşen	Miktar	Konsantrasyon
DNAz-RNAz İçermiyen Su	5.0 µl	
5x Sequencing Buffer	1.0 µl	
Big Dye Ready Reaction Mix	2.0 µl	
Primer (Düz ya da Ters)	1.0 µl	Primerin son konsatrasyonu 3.2 pmol
Saf PCR Ürünü	1.0 µl	
Toplam Hacim	10.0 µl	

Tablo 16. “Döngüsel Dizileme Reaksiyonları PCR Programı

Aşama	Isı	Süre	Tanım
1. Bekleme	96 °C	02.00	Taq Polimeraz Aktivasyonu
2. PCR Aşaması	96 °C	00.10	30 Döngü PCR ile Çoğaltma
	50 °C	00.05	
	60 °C	04.00	
4. Bekleme	04 °C	Sonsuz	Yürütme aşamasına Kadar Saklamak için

Çıkan DNA dizi analiz ürünleri Sephadex G-50 (Sigma) kullanılarak temizlendi. Bunun için 1 gr Sephadex G-50 12 ml DNAz-RNAz içermeyen distile su ile yarım saat hidrate edildi. DNA bağlayıcı özelliği olmayan spin kolonlara (Macherey Nagel) aktarılan 700 µl hidrate Sephadex G-50 2000 g’de 2 dakika santrifüj edilerek temizleme kolonları hazırlandı. Bu kolonlara 10 µl döngüsel dizileme ürünü konarak örnekler yeniden 2000 g’de 2 dakika santrifüj edildiler ve 310 Genetik Analiz Cihazına (AppliedBiosystems, Foster City USA) yüklemeye hazır hale getirildiler.

Döngüsel dizileme “cyclesequencing” ürünleri aşağıdaki yürütme parametreleri kullanılarak 310 Genetik Analiz cihazında yürütüldüler.

Yürütme için Kullanılan Kapiler	36 cm 50 um iç çaplı kapiler (AppliedBiosystems)
Yürütme için Kullanılan Polimer	POP6 (AppliedBiosystems)
Yürütme Modülü	RapidRun36 (1mL) E.md4
Enjeksiyon Zamanı	30 Saniye
Enjeksiyon Voltajı	15 kV
Yürütme Voltajı	15 kV
Yürütme Zamanı	36 Dakika
Yürütme Isısı	50 °C

Elde edilen elektroferogram verilerinin öncelikle AppliedBiosystems Sequencing Analysis v1.4 software ile baz isimlendirme “base calling” işlemleri gerçekleştirildi, kalite kontrolleri yapıldı. Daha sonra DNA elektroferogramları DNA Star SeqManII programında çift yönlü eşleştirme ve karşılaştırma işlemlerine tabi tutuldular. Sonuç olarak, veri analizi için, tüm filogenetik analiz yazılımlarının okuyabileceği *.fasta formatında standart DNA dizi verileri hazırlandı. Elde edilen son dizilerin protein çevrimleri çoklu sıralamaları ve filogenetik analizleri (BioEdit 7.0.9.0 program paketi içindeki “DNADist-NEIGHBOR phlogenetic tree” yazılımı kullanılarak komşu ekleme yöntemi “Neighbour Joining” ile filogenetik ağaç çizildi) ile mutasyon analizleri BioEdit 7.0.9.0 programı ile yapıldı. Dünya veri tabanı karşılaştırması ve mutasyon analizi doğrulaması için online (<http://www.hiv-grade.de/cms/grade/>) HBV Grade Tool for analysis of HBV-resistance programı kullanıldı.

Gen Bankası numaraları AB014370, X02763, X70185, AB0333555, D00329, AB033557, D00330, AB033559, Y18855, X02496, X65257, X68292, X72702, X75664, X75657, AB032431, X75658, X75663, AF160501, AB179747 ve AB064315 olan HBV Genotip A-H DNA dizileri çalışma için standart diziler olarak kullanıldılar (bknz. Ham Veriler)

4. BULGULAR

4.1. Örnek Gruplarının HBV DNA ve Viral Yük Sonuçları

Tasarlanan “Immuno-Real Time PCR” yönteminin kontrolü ve optimizasyonu için iki kontrol grubu oluşturulması planlandı; “Hepatit B Pozitif” kontrol grubu (n=30) ve “Hepatit B Negatif” kontrol grubu (n=30). Kontrol gruplarında HBV DNA varlığı semi nested PCR yöntemi ile araştırıldı. “Hepatit B Pozitif” kontrol grubunun tüm örneklerinde semi nested PCR yöntemi ile HBV DNA saptanırken, “Hepatit B Negatif” kontrol grubu örneklerinin hiçbirinde semi nested PCR yöntemi ile HBV DNA saptanmadı (Tablo 17 ve 18). Bu kontrol gruplarına ait örnekler “Immuno-Real Time PCR” yönteminin kontrolü ve optimizasyonu için kullanılmıştır.

Tablo 17. “Hepatit B Pozitif” örnek grubunun Semi nested PCR ile HBV DNA sonuçları.

Örnek No	Semi nested PCR ile HBV DNA Sonucu	Örnek No	Semi nested PCR ile HBV DNA Sonucu	Örnek No	Semi nested PCR ile HBV DNA Sonucu
1	Pozitif	11	Pozitif	21	Pozitif
2	Pozitif	12	Pozitif	22	Pozitif
3	Pozitif	13	Pozitif	23	Pozitif
4	Pozitif	14	Pozitif	24	Pozitif
5	Pozitif	15	Pozitif	25	Pozitif
6	Pozitif	16	Pozitif	26	Pozitif
7	Pozitif	17	Pozitif	27	Pozitif
8	Pozitif	18	Pozitif	28	Pozitif
9	Pozitif	19	Pozitif	29	Pozitif
10	Pozitif	20	Pozitif	30	Pozitif

Tablo 18. “Hepatit B Negatif“ örnek grubunun Semi nested PCR ile HBV DNA sonuçları.

Örnek No	Semi nested PCR ile HBV DNA Sonucu	Örnek No	Semi nested PCR ile HBV DNA Sonucu	Örnek No	Semi nested PCR ile HBV DNA Sonucu
1	Negatif	11	Negatif	21	Negatif
2	Negatif	12	Negatif	22	Negatif
3	Negatif	13	Negatif	23	Negatif
4	Negatif	14	Negatif	24	Negatif
5	Negatif	15	Negatif	25	Negatif
6	Negatif	16	Negatif	26	Negatif
7	Negatif	17	Negatif	27	Negatif
8	Negatif	18	Negatif	28	Negatif
9	Negatif	19	Negatif	29	Negatif
10	Negatif	20	Negatif	30	Negatif

Tez çalışması sırasında seroloji laboratuvarına 2006-2007 yılları arasında başvuran, hepatit belirteçleri için yapılan testlerle HBsAg, anti-HBs, HBeAg ve anti-HBe belirteçlerinin tümü negatif, anti-HBc’leri pozitif olan izole anti-HBc pozitif kriterine uyan 21 kişi bulundu ve çalışmaya alındı. Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı’nı da izole anti-HBc nedeni ile takip edilen 3 kişinin de çalışmaya dahil edilmesi ile deneyler gerçekleştirildi. İzole anti-HBc pozitif örnek grubunu bu nedenle 24 kişi oluşturdu (n=24).

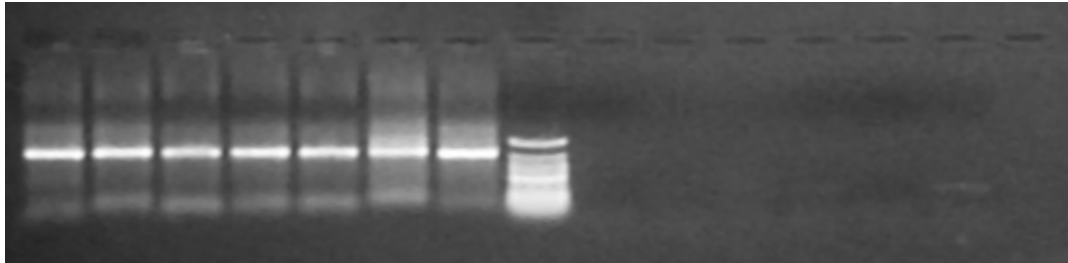
İzole anti-HBc pozitif örnek grubunda da HBV DNA varlığı semi nested PCR yöntemi ile araştırıldı. Bunun yanı sıra, bu grupta, semi nested PCR test sonuçlarının doğrulanması ve viral yük belirlenmesi amacı ile örnekler COBAS TaqMan® 48 (F. Hoffmann-La Roche Ltd Group Headquarters Grenzachstrasse 124 CH-4070 Basel Switzerland) sistemi kullanılarak, üretici talimatları doğrultusunda ikinci defa test edildiler. İzole anti-HBc pozitif hastaların daha sonraki test çalışmaları için COBAS TaqMan® 48 testinin sonuçları referans alındı. Bu gruba ait semi nested PCR ile HBV DNA sonuçları ile COBAS TaqMan® 48 viral yük sonuçları Tablo 19’da verilmiştir.

Ayrıca Şekil 9’da semi nested PCR ile yapılmış HBV DNA Pozitif ve Negatif sonuçlara ait jel elektroforez görüntü sonuç örneği verilmiştir.

Tablo 19. “İzole Anti-HBc Pozitif” örnek grubunun Semi nested PCR ile HBV DNA ve viral yük sonuçları.

Örnek No	Semi nested PCR ile HBV DNA Sonucu	Viral Yük (Kopya/ml)	Örnek No	Semi nested PCR ile HBV DNA Sonucu	Viral Yük (Kopya / ml)
1	Negatif	<6	13	Negatif	Negatif
2	Pozitif	32	14	Negatif	Negatif
3	Pozitif	8.9	15	Negatif	Negatif
4	Negatif	Negatif	16	Pozitif	17
5	Negatif	Negatif	17	Negatif	Negatif
6	Negatif	Negatif	18	Pozitif	36
7	Pozitif	13.9	19	Negatif	Negatif
8	Pozitif	62	20	Negatif	Negatif
9	Pozitif	>1000000	21	Negatif	Negatif
10	Negatif	Negatif	22	Negatif	Negatif
11	Negatif	Negatif	23	Negatif	Negatif
12	Negatif	Negatif	24	Negatif	Negatif

Şekil 9. Semi nested PCR jel elektroforez görüntü sonuç örneği (sol taraf pozitif, sağ taraf negatif sonuçlar)

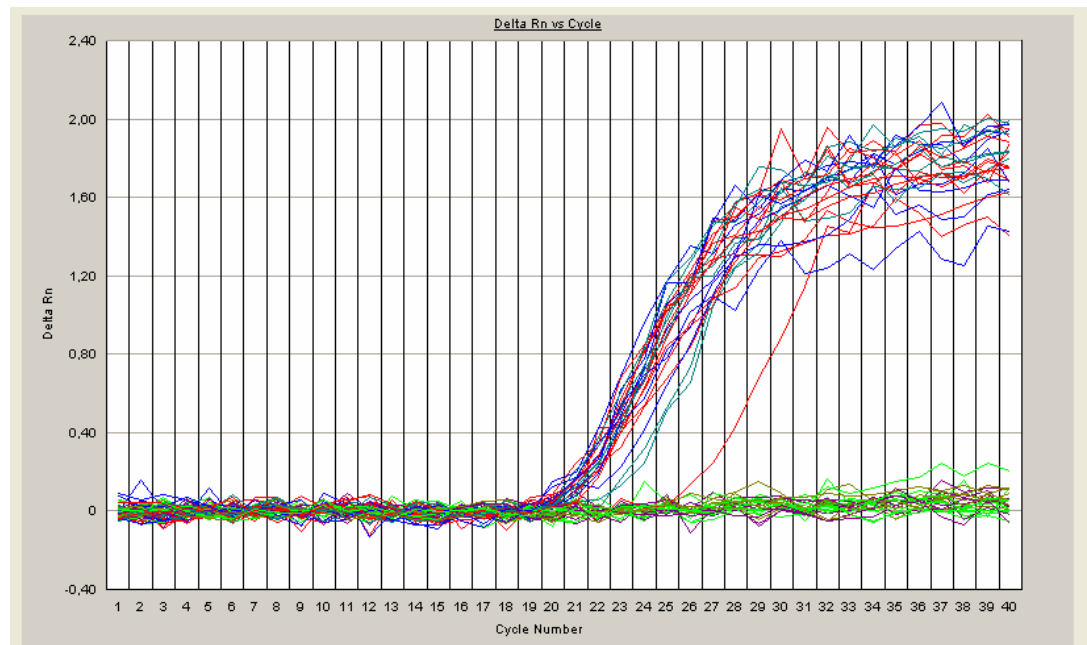


“İzole Anti-HBc Pozitif” örnek grubunda, 24 örneğin 8’inde (%33) HBV DNA COBAS TaqMan® 48 ile saptanmıştır. Semi nested PCR test sonuçları ile referans yöntem olarak kullandığımız COBAS TaqMan® 48 sonuçları bir örnek dışında (<6 Kopya/ml viral yükü olan ilk örnek) uyumlu bulunmuştur. Semi nested PCR işlemi sonrası HBV DNA’sı pozitif bulunan, izole anti-HBc pozitif örneklerin PCR ürünlerinin DNA dizi analizleri yapılmış, fakat viral yükü <6 kopya/ml olan örnekte amplifikasyon yapılamadığından DNA dizi analizi yapılamamıştır.

4.2. Örneklerin “Immuno-Real Time PCR” Sonuçları

“Hepatit B Pozitif” ve “Hepatit B Negatif” kontrol grubundan 30’ar örnek kullanılarak yapılan “Immuno-Real Time PCR” testi kontrol ve optimizasyon çalışmaları sonucunda pozitif kontrol grubundaki 30 örneğin “Immuno-Real Time PCR” test sonuçları pozitif bulunmuş, negatif kontrol grubundaki 30 örneğin 29’unun “Immuno-Real Time PCR” test sonuçları negatif bulunmuştur. Negatif kontrol grubunda 1 örnek pozitif olarak saptanmıştır. Bu örnek 11.000 rpm’de 2 dakika çevrildikten sonra yapılan tekrar çalışmasında negatif bulunmuştur (Şekil 10).

Şekil 10. Negatif ve pozitif kontrol gruplarına ait “Immuno-Real Time PCR” testi kontrol ve optimizasyon test sonuçlarının amplifikasyon eğrileri.



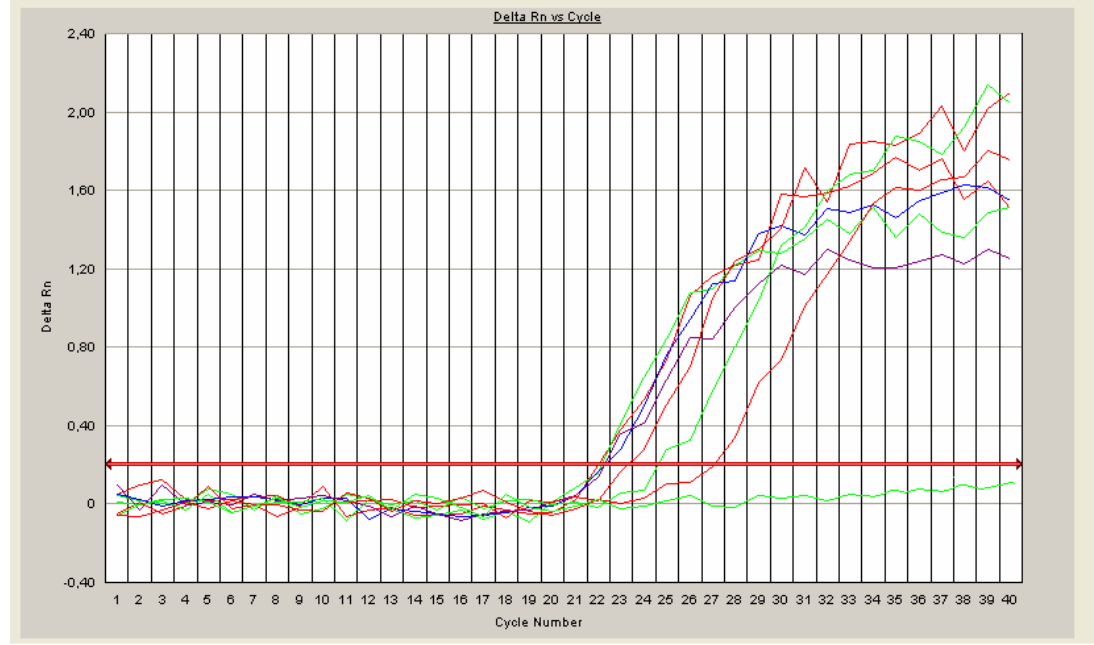
Yapılan kontrol ve optimizasyon testleri sonuçunda “Immuno-Real Time PCR” testinin negatif prediktif değeri %100, pozitif prediktif değeri %100, özgüllüğü %100 ve duyarlılığı %100 olarak bulunmuştur. (Tablo 20)

Tablo 20. “Immuno-Real Time PCR” Test Sonuçlarının Değerlendirilmesi

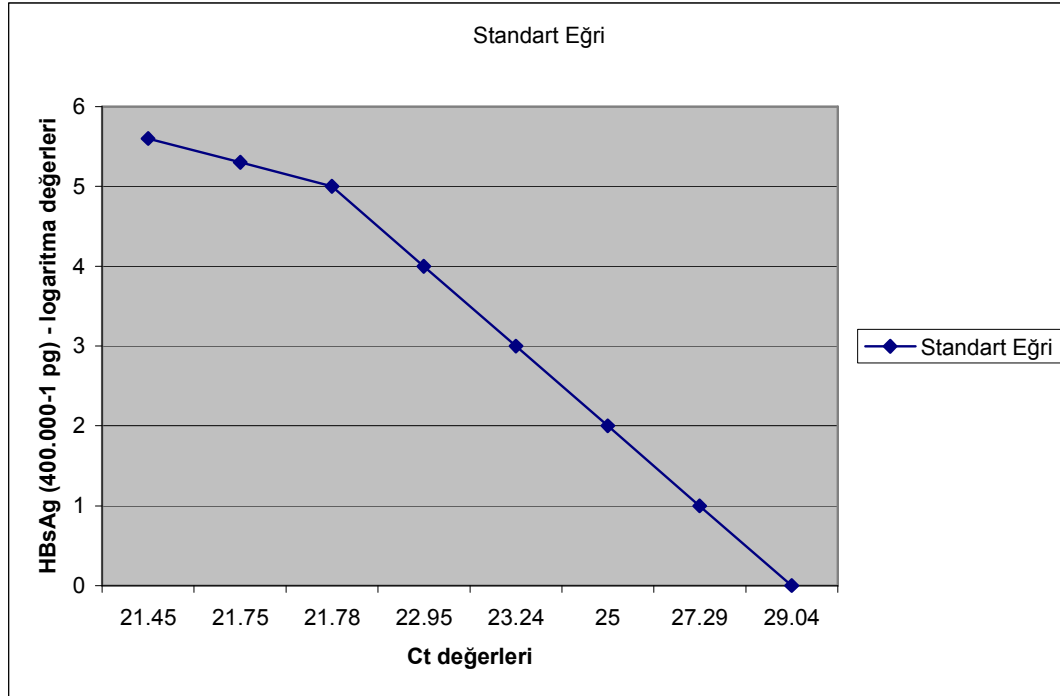
Immuno PCR Sonucu	HBV Pozitif Kontrol Grubu	HBV Negatif Kontrol Grubu	Toplam
Pozitif	30	0	30
Negatif	0	30	30
Toplam	30	30	60
Duyarlılık	100		
Özgüllük	100		
Pozitif Prediktif Değer	100		
Negatif Prediktif Değer	100		

HBsAg’nin bilinen konsantrasyonları ile “Immuno-Real Time PCR” testi tekrar uygulanmıştır. Bu sayede testin analitik duyarlılığı belirlenmiştir. Bu amaçla HBsAg’nin 1-400.000 pg’lık dilüsyon serisi hazırlanmışt ve bu rnekler “Immuno-Real Time PCR” ile test edilmiştlerdir. Yapılan HBsAg dilüsyon miktarları sırası ile 400.000 pg/ml, 200.000 pg/ml, 100.000 pg/ml, 10.000 pg/ml, 1.000 pg/ml, 100 pg/ml, 10 pg/ml ve 1 pg/ml olacak şekilde düzenlenmiştir. Test üç kere tekrarlanmıştır. 3 tekrarın ortalama Ct değerleri ve pg/ml cinsinden HBsAg miktarının negatif logaritması alınarak standart eğri çizilmiştir. (Şekil 11 ve 12). Yapılan dilüsyonlarda testin 400.000 pg/ml, 200.000 pg/ml ve 100.000 pg/ml’lik konsantrasyonlarda anlamlı bir ayırım yapamadığı, bu konsantrasyon Ct değerlerinin çok yakın olduğu ve bu miktarlarda testin doyuma ulaştığı gözlenmiştir. Test 100.000 pg/ml, 10.000 pg/ml, 1.000 pg/ml, 100 pg/ml ve 10 pg/ml arasında lineer bir eğri oluşturmuşt ve kantitasyon için dinamik aralığın 100.000 pg/ml - 10 pg/ml olduğu hesaplanmıştır. 1 pg/ml’lik HBsAg miktarı 2 testte saptanamazken 1 testte saptanmıştır. Böylelikle testin saptama limiti 10 pg/ml olarak belirlenmiştir. (Şekil 11-12).

Şekil 11. HBsAg Dilüsyon Dağılımı (400.000 pg - 1 pg) Amplifikasyon eğrileri



Şekil 12. HBsAg miktarlarının negatif logaritmaları ve “Immuno-Real Time PCR” sonucu elde edilen Ct değerleri ile çizilen standart eğri



İzole anti-HBc pozitif örnek grubunda bulunan 24 örneğin “Immuno-Real Time PCR” test sonuçları Tablo 21’de sunulmuştur.

24 örneğin 7’sinde (%33) “Immuno-Real Time PCR” test pozitif sonuç vermiştir. Burada dikkati çeken viral yükü düşük olan ve PCR ile saptanamayan hastanın “Immuno-Real Time PCR” test sonucu pozitif bulunurken (6 no’lu örnek), viral yükü yüksek hastanın (9 no’lu örnek) “Immuno-Real Time PCR” test sonucunun negatif bulunmuş olmasıdır. Bu bulgular dışında HBV DNA negatif hastalar ve diğer HBV DNA pozitif hastaların “Immuno-Real Time PCR” test sonuçlarında bir uyumsuzluğa rastlanmamıştır.

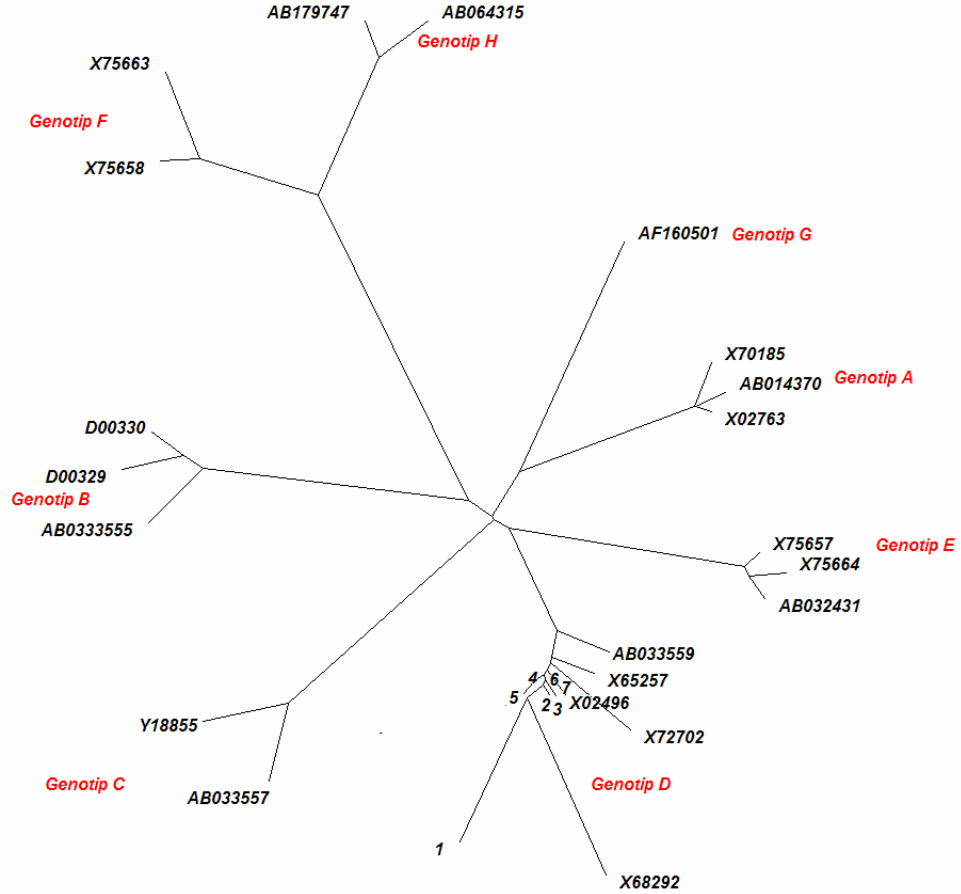
Tablo 21. İzole anti-HBc pozitif örnek grubu “Immuno-Real Time PCR” test sonuçları.

Örnek No	HBV DNA PCR Sonucu	Viral Yük (Kopya/ml)	Immuno Real Time PCR Sonucu	Örnek No	HBV DNA PCR Sonucu	Viral Yük (Kopya/ml)	Immuno Real Time PCR Sonucu
1	Negatif	<6	Pozitif	13	Negatif	Negatif	Negatif
2	Pozitif	32	Pozitif	14	Negatif	Negatif	Negatif
3	Pozitif	8.9	Pozitif	15	Negatif	Negatif	Negatif
4	Negatif	Negatif	Negatif	16	Pozitif	17	Pozitif
5	Negatif	Negatif	Negatif	17	Negatif	Negatif	Negatif
6	Negatif	Negatif	Negatif	18	Pozitif	36	Pozitif
7	Pozitif	13.9	Pozitif	19	Negatif	Negatif	Negatif
8	Pozitif	62	Pozitif	20	Negatif	Negatif	Negatif
9	Pozitif	>1000000	Negatif	21	Negatif	Negatif	Negatif
10	Negatif	Negatif	Negatif	22	Negatif	Negatif	Negatif
11	Negatif	Negatif	Negatif	23	Negatif	Negatif	Negatif
12	Negatif	Negatif	Negatif	24	Negatif	Negatif	Negatif

4.3. Örneklerin DNA Dizi Analizi ve “a” Determinantı Mutasyonları

Semi nested PCR ürünleri pozitif bulunan 7 izole anti-HBc pozitif örnek DNA dizi analizi işlemi için seçildi. Yapılan filogenetik analiz sonrası bu örnekler Genotip D ve ayw2 olarak tanımlandılar. (Şekil 13)

Şekil 13. BioEdit 7.0.9.0 program paketi içindeki “DNADist-NEIGHBOR phlogenetic tree” yazılımı kullanılarak komşu ekleme yöntemi “Neighbour Joining” ile çizilen filogenetik ağaç.



7 “İzole Anti-HBc Pozitif” örnek DNA dizi analizi işlemi sonrası elde edilen *.fasta formatında standart DNA dizi verileri ile Gen bankası standart DNA dizilerinin karşılaştırılmaları ile yapılan mutasyon analizleri sonucunda S geninin 1-226. amino asitleri incelendi. 18 No’lu örnekte, bu bölgeye ait S6L, V14A, T45A, S193L, P211H,

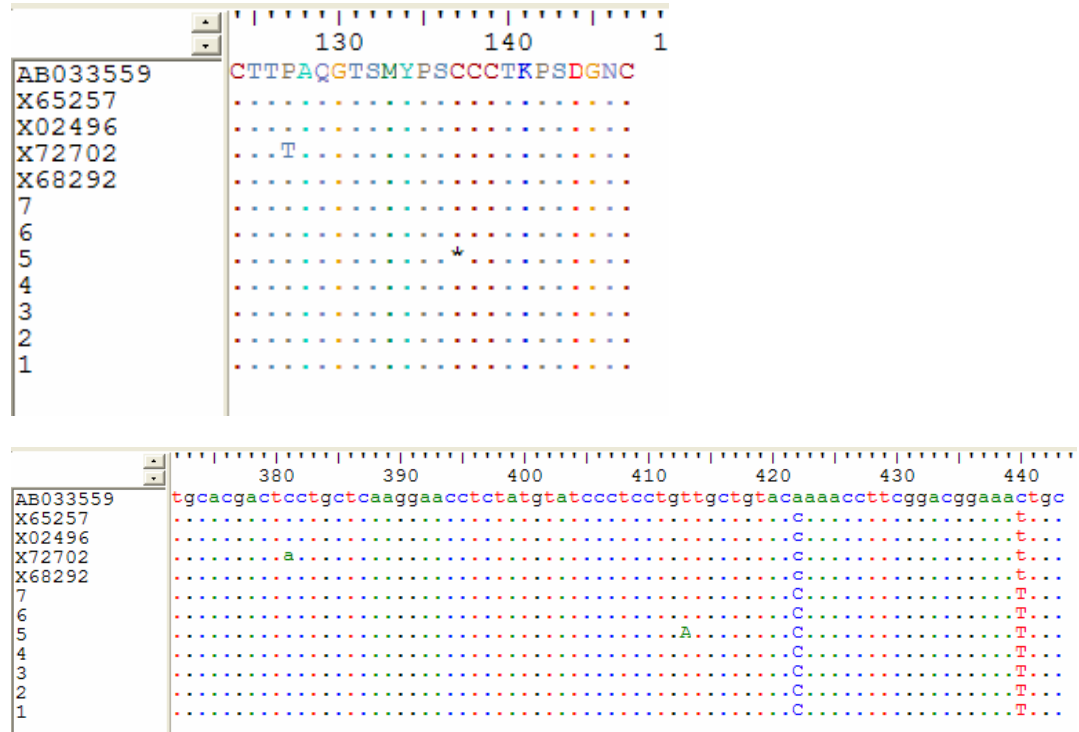
L213T, P217L, F220C, V224A amino asit değişimleri, 9 No’lu örnekte C137 “Stop” Kodon değişimi, 4 No’lu örnekte L209V amino asit değişimi gözlemlendi.

Tablo 22. Vakalara Ait Polimeraz Geni (10-234. amino asitler Arası) ve S Geni (1-226. Aminoasitler Arası) DNA Dizi Analizi Toplu Sonuçları.

DNA Dizi Analiz No	Gen	Genotip D'den Farklı Olan Aminoasitler	İlaç Direnç Paneli ve HBsAg Mutasyon Paneli			
			3TC	ADV	ETV	TDF
1 (18 No’lu Örnek)	Polimeraz	N53S, L91I, H124Y, Y135S, F221Y	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı
	S	S6L, V14A, T45A, S193L, P211H, L213T, P217L, F220C, V224A	Varyant			
2 (16 No’lu Örnek)	Polimeraz	H124Y, Y135S	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı
	S	Yok	Normal HBsAg			
3 (2 No’lu Örnek)	Polimeraz	H124Y, Y135S	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı
	S	Yok	Normal HBsAg			
4 (3 No’lu Örnek)	Polimeraz	H124Y, Y135S	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı
	S	Yok	Normal HBsAg			
5 (9 No’lu Örnek)	Polimeraz	H124Y, Y135S, L146M	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı
	S	C137*	Stop Kodon			
6 (4 No’lu Örnek)	Polimeraz	Y135S, L217R	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı
	S	L209V	Varyant			
7 (5 No’lu Örnek)	Polimeraz	H124Y, Y135S	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı
	S	Yok	Normal HBsAg			

S Geni 1-226 ile örtüşen polimeraz gen bölgesi 10-234. amino asitleri arası kalan bölgenin de mutasyon analizleri ve protein dizileri Gen bankası standart DNA dizilerinin karşılaştırıldı. 18 No’lu örnekte, N53S, L91I, H124Y, Y135S, F221Y amino asit değişimleri, 9 No’lu örnekte H124Y, Y135S, L146M değişimi, 4 No’lu örnekte Y135S, L217R amino asit değişimi gözlemlendi. Diğer örneklerde bu bölge ile ilgili H124Y, Y135S değişimleri bulundu.

Şekil 14. Hastaların ve Genotip D Prototiplerinin “a” Determinat Protein ve DNA Dizileri.



5. TARTIŞMA

Hepadnaviridae (Hepatitis Associated DNA Virus) ailesinin bir üyesi olan HBV'nin zarfı, konak hücrenin lipid membranından ve üç viral glikoproteinden (küçük veya temel yüzey proteini (S = small), orta yüzey proteini (M = medium) ve büyük yüzey proteininden (L = large)) oluşur. S proteini, bu üç partikül formu içinde, zarfta en baskın bulunan proteindir ve ortak "a" antijeni belirleyicisini taşır. Bu protein bu yüzden hepatit B yüzey antijeni (HBsAg) olarak da anılmaktadır. İnfekte bir hastanın kanında HBsAg 300 µg/ml düzeyine kadar ulaşabilmektedir ve bunun yanında HBsAg, HBV enfeksiyonlarının tanısında temel immünolojik belirteç olarak kullanılmaktadır (5, 42, 66, 78).

Evrım, tüm virüslerde fakat farklı hızlarda ve boyutlarda gerçekleşir. *Hepadnaviridae* ailesi üyeleri DNA virüsü olarak sınıflandırılmalarına karşın replikasyonları sırasında, ters transkriptaz ("Reverse Transcriptaz", RT) enzimi ile pregenomik RNA'yı kalıp olarak kullanarak DNA sentezler. Böylelikle DNA virüsü olmalarına karşın mutasyon oranları DNA virüslerinden yüksek, RNA virüslerinden ise daha düşük düzeydedir. Bu oran HBV için nükleotid pozisyonu başına yıllık 2×10^{-5} olarak hesaplanmıştır.

Yüzey ya da zarf proteinlerini kodlayan genlerde (preS1, preS2 ve S) oluşacak mutasyonlar virüsün bağışıklık sistemi tarafından tanınmasını engelleyebileceği gibi rutin kullanılan aşılarda bu mutant tip virüs üzerine etkili olabilmelerini de engelleyebilir (5, 32, 33, 35, 42, 66, 78). Bu gibi mutant HBV kökenleri ile meydana gelecek enfeksiyonlarda tanım yöntemi olarak immünolojik testler kullanışlı olmamaktadırlar.

Genel olarak bu hastalarda HBsAg saptanamazken HBsAg'ye karşı yanıt olan anti-HBs'de saptanamamaktadır. HBeAg ve anti-HBe'nin de negatif olabileceği bu gibi durumlarda sadece anti-HBc antikorları pozitif olabilir. Bu durum izole anti-HBc pozitif ayrı hasta grubunun oluşmasına neden olur.

Anti-HBc IgG akut enfeksiyon döneminde pozitifleştiği ve hayat boyu saptanabildiği için akut, kronik veya önceden geçirilmiş HBV enfeksiyonun göstergesidir ve kişinin HBV ile karşılaşmış olduğunu gösterir. Diğer serolojik

göstergeler olmaksızın saptanan salt anti-HBc IgG antikorları; uzamış pencere dönemini, HBsAg'nin saptanamayacak kadar düşük olduğu kronik HBV enfeksiyonlarını, mutant virüslerle oluşmuş ve bu nedenle ticari kitlerle HBsAg'nin saptanamadığı kronik enfeksiyonları gösterebilir. Çok eskiden geçirilmiş ve iyileşmiş HBV enfeksiyonlarından sonra anti-HBs antikorlarının saptanamayacak düzeye inmesi nedeni ile izole anti-HBc pozitifliği oluşabildiği gibi HIV enfeksiyonlarda bağışıklık sisteminin baskılanması ya da HDV süperenfeksiyonunda HBsAg yapımının baskılanması da izole anti-HBc pozitif hasta grubunun oluşmasına neden olabilir.

Düşük vireminin olduğu enfeksiyonlarda da HBsAg miktarı serumda ELISA yöntemi ile saptanabilecek değerlerin altına düşebilmekte ve bu durumda da izole anti-HBc seroloji sonucu oluşabilmektedir. Bu gibi hastalarda vireminin varlığı moleküler yöntemler ile gösterilebilir. Bu gibi hastalar virüsü başka insanlara bulaştırmak açısından risk oluşturlar. Yapılan çalışmalarda HBV'nin düşük düzeyde endemik olduğu bölgelerde bile izole anti-HBc vakaları %10-20 civarlarında bulunabilmektedir. Bu vakalar içinde HBV DNA saptama oranı yaklaşık %10'dur. HBV prevalansı arttıkça izole anti-HBc vakalarında HBV DNA saptama oranı %40'lara kadar çıkmaktadır. (5, 42, 66, 78). Çalışmamızda 24 izole anti-HBc pozitif hastanın 8'inde (%33) HBV DNA COBAS TaqMan® 48 ile saptanmıştır. Bu oranın göreceli olarak yüksek çıkmasının nedeni Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalında takip edilen izole anti-HBc pozitif 3 olgunun (Bunların HBV DNA'ları pozitif olarak bulundu), serimiz içinde bulunmasıdır. Bu olgular göz ardı edilirse 21 örneğin 5'inde (%23) HBV DNA saptanmış olur ki HBV'nin orta düzeyde endemik olduğu ülkemiz için bu oran kabul edilebilir düzeydedir.

HBsAg varyantlarının oluşmasında iki neden olabileceği düşünülmektedir. Bunlardan ilki uygulanan pasif ve aktif immunizasyon nedeni ile yabancı tip virüsün baskılanarak mutant tip virüslerin pozitif seçimine neden olduklarıdır. İkinci neden olarak tedavide kullanılan antiviral ajanların polimeraz geni mutasyonlarına neden olabileceği, HBsAg'yi kodlayan S gen bölgesinin polimeraz geni ile örtüşmesi nedeni ile bu P geni mutasyonlarından etkilenerek HBsAg'nin antijenik yapısında değişime uğrayabileceği ileri sürülmektedir (13, 95).

Vijayakumar ve arkadaşlarının HBsAg pozitif anneler ve bebekleri üzerine yaptıkları çalışmada immunizasyonun indüklediği HBsAg "a" determinantı varyantları

tanımlamıştır. Bu kapsamda HBsAg pozitif 68 anne adayını ve bunların bebeklerini çalışmalarına dahil etmişler ve bebekler doğar doğmaz standart aşılama (0., 1. ve 6. aylarda aşı uygulaması) programına almışlar ve 1., 7., 12. ve 24. ayda bebeklerden kan toplayarak HBsAg ve viral DNA varlığını araştırmışlardır. Yapılan çalışma sonunda 68 bebekten 2'sinde (%2.9) HBsAg ile birlikte anti-HBs ve HBV DNA saptanmıştır. DNA dizi analizi ile HBsAg'nin MHR bölgesini incelediklerinde T125M, I126T, P127T F134Y mutasyonlarını bir bebekte, I126T, T131N ve S143T mutasyonlarını ikinci bebekte saptamışlardır. Böylelikle immün sistem baskılamasına karşın virüsün bir kaçış yolu olarak antijenik yapı değiştirebileceğini söylemişlerdir. İmmün yanıtın virüsü daha etkin bir şekilde baskılaması için aşılara pre-S epitoplarının da konulmasını önermişlerdir (92).

Shields ve arkadaşları immunoglobulin profilaksisi uygulanmasına rağmen karaciğer transplantasyonundan 5 ay sonra gerçekleşen HBV reinfeksiyonu bildirmişlerdir. Bu hastada MHR bölgesinin DNA dizi analizi yapıldığında D144G mutasyonunu saptamışlardır. Araştırmacılar HBsAg'yi kodlayan S geninin P geni ile üst üste binmelerine dikkati çekmişler ve yüzey antijeni değişimine neden olabilecek mutasyonun polimeraz geni mutasyonuna neden olabileceği ve bunun da antiviral ilaç direncine neden olabileceğini bildirmişlerdir (72).

Michael P Cooreman ve arkadaşları da özellikle HBIG ile uygulanan profilaksinin HBsAg “a” determinantı mutantlarına neden olabileceğini, aşılama ile uygulanan başarılı HBV infeksiyonlarından korunma protokollerinin yabancı tipler üzerine baskı uygulayarak mutant kökenlerin yayılmasında rol oynayabileceklerini bildirmişlerdir. En sık olarak kodon 144 ve 145'in bu immünolojik baskıdan etkilendiklerini bildirmişlerdir (13).

Sheldon ve Soriano lamivudin direncine yol açan V173L, L180M ve M204V mutasyonlarının HBsAg'de E164D ve I195M değişimlerine neden olabileceğini bildirmişler ve bu değişimlerin antijenik yapıyı etkileyebileceğini söylemişlerdir. Bunun yanı sıra Yeh, A181T mutasyonunun lamivudin direncine neden olduğunu bildirerek bu mutasyonun HBsAg'de W172stop kodon oluşumuna ve tamamlanmamış HBsAg sentezine neden olabileceğini bildirmişlerdir. Bunun yanı sıra adefovir direnci ile ilişkili N236T ve tenofovir direnci ile ilişkili A194T mutasyonlarının HBV S geninde mutasyona neden olmadığını söylemişlerdir (80, 100).

Bartholomeusz ve Locarnini antiviral terapiler ve yüzey mutasyonları için geniş bir derleme yapmışlar, lamivudin direncine neden olan M204V değişiminin yüzey proteininde I195M değişimine neden olabileceğini ve ilave olarak W196S değişimine de yol açabileceğini bildirmişlerdir. Adefovir direncine neden olan N236T zarf proteinini etkilemezken A181T mutasyonunun W172 stop kodon oluşumuna yol açacağını bildirmişlerdir. Entekavir ile ilişkili I169T, S184G ve S202I değişimlerinin yüzey proteininde F161L, L/V176G ve sV194F mutasyonlarına neden olabileceği, M250V değişiminin ise S geni dışında kalıp bir etkisinin olmadığını bildirmişlerdir (6).

Bildirilen bu mutasyonların HBsAg sentezinin kusurlu olmasına neden olup serolojik testlerin etkisiz kalmalarına yol açmalarının düşünülmesine rağmen, yapılan çeşitli çalışmalar da serolojik testlerin bu gibi mutantların bazılarını tespit edebildikleri yönündedir (35, 45, 46).

Lei'nin yaptığı çalışmada, HBsAg, "a" determinantı mutasyona uğramış olan 13 hasta örneğinin 12'sinde HBsAg'yi kemiluminisans tabanlı Immulite^(R) 2000 HBsAg Assay ile saptamışlardır. Yanlış negatif sonuç buldukları örnekte HBV DNA kopya sayısını 100'ün altında bulmuşlardır. Yanlış negatifliğin düşük viral yükten kaynaklandığını, testin G145R mutasyonu dahil, T126S, Q129H, G130D, T131N, M133L, T143L, T143M, D144A, T126S + Q129H + M133L, R122G ve R123GT mutasyonlarına sahip kökenleri saptayabileceğini bildirmişlerdir (35).

La'ulu ve Roberts HBsAg mutasyonu olan değişik hastalarda altı ticari kitin etkinliğini denemişlerdir. ARCHITECT, AUSZYME MONOCLONAL, AxSYM, ADVIA Centaur, Test System3 ve VITROS ECi testlerini kullanarak yaptıkları çalışmada; ARCHITECT, AUSZYME MONOCLONAL AxSYM testlerinin tüm mutantları saptadığını, ADVIA Centaur testinin 145. kodon mutasyonunda yanlış negatif sonuç verdiğini, Test System 3 ve VITROS ECi testlerinin 143, 144 ve 145. kodonlarda meydana gelen mutasyonları saptayamadıklarını bildirmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar 0,4 ng/ml HBsAg'nin ya da 0,1 IU/ml HBV DNA'nın kanda bulunması gerekliliğine dikkati çekmişlerdir (46).

Bu açıdan bakıldığında sadece mutant HBsAg'ler değil aynı zamanda düşük viral yüke sahip olan sessiz HBV infekte hastalar da toplum sağlığı açısından risk oluşturmaktadırlar.

Özellikle kan bankacılığı açısından sorun oluşturacak bu tanı problemlerine karşın, anti-HBs'nin ya da nükleik asit tekniklerinin HBV taramalarında kullanılması düşünülmüştür (1, 29, 35, 46, 69, 88).

Montalvo ve arkadaşları 158 anti-HBs pozitif gönüllü üzerinde yaptıkları çalışmada 13 örnekte HBV DNA saptamışlardır (% 8.23). (63) Bhatii ve arkadaşları Pakistanlı kan donörlerinde yaptıkları çalışmada HBsAg negatif anti-HBc pozitif hastaların %76'sında anti-HBs saptayabilmişlerdir (9).

Veriler bu gibi hastaların sessiz HBV enfeksiyonları olduğu ve toplum sağlığı açısından tehdit oluşturdukları yönündedir. Kronik HBV enfeksiyonlarında yapılan araştırmalarda Kohno ve arkadaşları anti-HBs varlığında HBsAg mutasyonu nedeni ile oluşan enfeksiyon tekrarını bildirmişlerdir (39). Weinberg ve arkadaşları da HBsAg serumda bulunmazken HBV DNA'nın düşük düzey de olsa serumda bulunabileceğini ve polimeraz ve "a" determinantına ait polimorfik fragmanlar içerebileceğini bildirmişlerdir (96). Vitale ve arkadaşları izole anti-HBc pozitifliğini sessiz HBV enfeksiyonlarında %5.9 olarak bulmuşlardır (93).

HBV ile gelişen kronik enfeksiyonlarda, düşük düzey viremi, virüsün saptanmasını önleyebilmektedir. Bu gibi sessiz enfeksiyonlar hastanın karaciğer karsinom gelişim riskini de arttırmaktadır. HBV'nin replikasyonunda konağa ait pek çok faktör (HNF1, 3, interleokinler, interferon gibi) rol oynamaktadır. Bu gibi sessiz enfeksiyon geliştiren kişilerde bu tip genlerde mutasyon ya da polimorfizmlerin olabileceği düşünülebilir. Bunun yanı sıra virüse ait mutasyonlar da ilginç araştırma konusu olmaktadır (12, 79, 73). Sengupta ve arkadaşları sessiz HBV enfeksiyonlarında promoter mutasyonlarının HBsAg sentez ve salınımı üzerine olan etkilerini incelemişler sık rastlanan küçük gen havuzunu oluşturan farklı genetik yapıdaki "quasispecies" varyasyonlarının bulunmasını, pre S2/S bölgesinde oluşan delesyonları, 3025-3054 arası delesyonları, stop kodon nedeni ile kısa kor ve prekor protein sentezini, polimeraz geninde alternatif başlangıç kodonu oluşumunu ve YMDD mutasyonlarını sessiz enfeksiyonların oluşumuna neden olabilecek etmenler olarak saymışlardır (79).

Parka ve arkadaşları hepatosellüler karsinomlu hastalarda yaptıkları çalışmada S geninde 126. kodon değişimini prekor bölgesinde TAG stop kodon oluşumunu X geni EN II bölgesi değişimlerini, özellikle nükleer faktör/enhacer bölgesi değişimlerini rapor etmişlerdir (73).

HBV'ye ait antijenik yapıların bu gibi sessiz infeksiyonlarda sağladıkları bilginin yetersiz olması nedeni ile özellikle kan bankacılığında kolay uygulanabilen ELISA ile anti-HBc taramasının risk belirlemek için kullanılması gerekliliği genel kabul gören görüşlerdendir. Bunun yanı sıra nükleik asit saptamaya yönelik testler uygulamaları zor da olsa seroloji testleri için çok önemli bir doğrulama testi olmakla birlikte, anti-HBc verileri ile kullanıldıklarında HBV bulaşma riskini azaltmaktadırlar (10, 23, 29, 38, 50). Kleinman ve arkadaşlarının gösterdikleri gibi, nükleik asit tabanlı testlerin uygulanması ile bulaşmadan sonra, pencere dönemi geriye çekilebilmekte ve tanı 2.56 gün önce konulabilmektedir (38).

Komiya ve arkadaşları HBV'nin infektif dozunu saptamak amacı ile şempanzeler üzerine yaptıkları çalışmada infektif dozu 10 kopya/ml olarak bulmuşlardır. Genotip A ve C ile yapılan bu çalışmada iki genotip arasında infektivite açısından araştırmacılar fark bulamamışlardır. Bizim çalışmamızda C137 Stop kodon mutasyonu olan örnek dışında diğer örnekler 25 ± 19 kopya/ml'lik viral yüke sahiptiler. Bu viral yük miktarı bu kişilerin infeksiyonu diğer sağlıklı bireylere yayabileceğini göstermektedir (40).

Ülkemizden Fındık ve arkadaşlarının Konya'da 1000 kan vericisi üzerine yaptığı çalışmada kan vericilerinin 200'ünde anti-HBc pozitifliği (%20) saptamışlardır. Anti-HBs pozitifliğini bu hasta grubu içinde %29.5 olarak bulurlarken anti-HBs negatiflik oranını %70.5 olarak bulmuşlardır. Anti-HBc saptanan hastaların hiçbirinde HBV DNA saptamamışlardır (25).

Sunbul ve Leblebicioğlu'nun ülke genelinde 15 hastaneden topladıkları 88 kronik hepatit B hastasında yaptıkları çalışmada 78 hastanın genotipini genotip D olarak bulmuşlardır (53).

Özdemir ve arkadaşlarının yaptığı genotip çalışmasında 45 kronik hepatit B infekte hastanın genotiplerini D olarak bulmuşlardır (70).

Yalçınkaya ve arkadaşları yaptıkları çalışmada hepatit B serolojik alt tiplerini incelemişler, 129 serumun 113'ünü ayw (%87.6) ve 4'ünü adw olarak bulmuşlardır (99).

Bizim çalışmamızda, Türkiye verileri ile uyumlu olarak, tüm genotipler "genotip D" ve serotipler "ayw2" olarak saptandı.

Sayiner ve arkadaşlarının bir böbrek transplantasyon hastasında yaptıkları çalışmada HBsAg mutasyonu tanımlamışlardır. Hipersensitif nefroskleroz tanısı ile takip edilen 25 yaşında kadın hastanın diyaliz öncesi 1999'da immunize edilerek tedavisi düzenlenmişti. Periton diyalizi alan hastanın 2003 yılında HBsAg, HBeAg, anti-HBc IgM ve anti-HBs serolojik test sonuçlarının pozitifleşmesi üzerine yapılan HBV DNA testinde 2×10^5 kopya/ml'lik sonuç elde edilmiş. Hastanın S gen DNA dizi analizi yapılarak "a" determinantı S143L mutasyonunu bildirmişlerdir. Hasta serotip olarak ayw2 bulunmuş ve ayrıca Q101H, S117N, T118R ve P120Q değişimleri hastada "a" determinantı mutasyonlarına ilave olarak bulunmuştur (77).

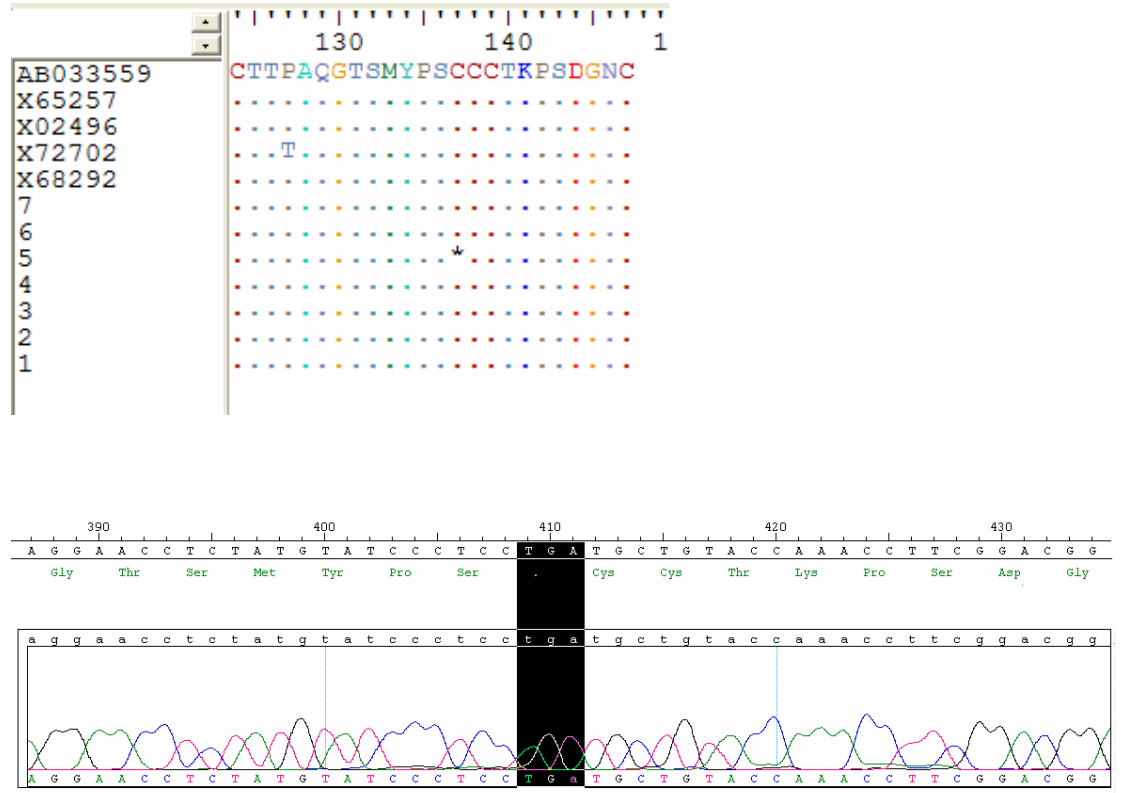
Özaslan ve arkadaşları yaptıkları çalışmada 125. M-T, T-P değişimleri rapor etmişlerdir. Bu değişimler genotip içinde gözlenebilecek polimorfizmler olup HBsAg'nin antijenitesini etkilememektedirler (71).

Çalışmamızda S geninin 1-226. amino asitleri ile örtüşen polimeraz gen bölgesinin 10-234. amino asitlerinin mutasyon analizleri yapıldı. Polimeraz protein dizileri "HBV Grade Tool for analysis of HBV-resistance" programı ile değerlendirilmelerinin yanı sıra gen bankası standart DNA dizileri ile de karşılaştırıldı. Polimeraz geninin analiz yaptığımız bölgesinde N53S, L91I, F221Y amino asit değişimleri 18 No'lu örnekte, L146M değişimi 9 No'lu örnekte, L217R amino asit değişimi 4 No'lu örnekte gözlemlendi. Tüm örneklerde bu bölge ile ilgili H124Y, Y135S değişimi ortak olarak (H124Y değişimi 4 no'lu örnekte yoktu) gözlemlendi. Gen bankası standart DNA dizileri ile karşılaştırma sonucu, Genotip D'de gözlenmeyen bu değişimlerin diğer genotiplerde olabileceği görüldü. Tüm bu sayılan değişimler gerek literatür taraması gerekse web tabanlı "HBV Grade Tool for Analysis of HBV-resistance" programı taraması sonucu ilaç direncine neden olmadıkları belirlendi. Bu değişimlerin bu nedenlerle ülkemizde gözlenen polimorfizmler olabileceği düşünüldü.

S geninde de 1-226. amino asitleri incelendi. Bu bölgeye ait S6L, V14A, T45A, S193L, P211H, L213T, P217L, F220C, V224A aminoasit değişimleri 18 No'lu örnekte, C137 Stop Kodon değişimi 9 No'lu örnekte, L209V aminoasit değişimi 4 No'lu örnekte gözlemlendi. Yapılan literatür taramalarında S6L, V14A, T45A, S193L, P211H, L213T, P217L, F220C, V224A, L209V değişimlerinin antijenik yapıyı değiştirmedikleri saptanmış ve bunların diğer genotiplerde görülen değişim olduklarının belirlenmesi nedeniyle bu değişimlerin polimorfizm olabileceği düşünülmüştür.

Dünyada HBsAg'nin erken sonlanmasına ve bu antijenin sentez bozukluğuna neden olan iki stop kodon oluşumu bildirilmiştir. Yeh, A181T mutasyonunun lamuvidin direncine neden olduğunu bildirerek bu mutasyonun HBsAg'de W172stop kodon oluşumunu rapor ederken Data ve arkadaşları, kodon 69'da stop kodon oluşumunu bildirmişlerdir (15, 80, 100). Bizim çalışmamızda çok yüksek viral yüke sahip (>1000000 kopya/ml) 9 no'lu örnekte serolojik olarak izole anti-HBc gözlenmesi dikkatimizi çekmişti. Testler üç kere tekrarlanarak izole anti-HBc doğrulandı ve yapılan çalışmada C137Stop kodon oluşumu saptandı. (Şekil 15).

Şekil 15. 9. Örnekte “Stop” Kodon



“Immuno-Real Time PCR” yöntemi klasik ELISA yöntemi ile moleküler bir teknik olan Real Time PCR yönteminin birleştirilmesinden türetilmiş yeni bir tanı yöntemidir. Bu yöntemde klasik ELISA’dan farklı olarak konjugat bir enzim yerine DNA dizisi ile işaretlenir ve bu DNA dizisi, antijen antikor birleşme reaksiyonları gerçekleşmesinden sonra sistemden izole edilir. Daha sonra bu DNA dizisinin, PCR

işlemi ile çoğaltılması saptanması gerçekleştirilir. Saptama klasik ELISA yönteminde olduğu gibi kemilüminisans yada kolorometrik yöntemler ile değil Real Time PCR ile yapılmaktadır (56, 60-62, 65, 94).

Wacker ve arkadaşları bu yöntemi daha duyarlı ve otomasyona daha açık olan antikor kaplı manyetik boncuklara adapte etmişler böylelikle testin daha kolay uygulanabilirliğini sağlamışlardır. Bu gün için pek çok DNA ekstraksiyon cihazı bu manyetik partikülleri kullanmakta ve laboratuvarların iş yükünü azaltmaktadır (94). Bu nedenle çalışmamızda manyetik boncuklarla kaplı anti-HBs'yi HBsAg aramak için kullandık.

“Immuno-Real Time PCR”ın sunduğu bir diğer avantaj da kantitasyona olanak sağlamasıdır. HBsAg'nin 1-400.000 pg'lık dilüsyon serisi hazırlanarak yaptığımız çalışmada (400.000 pg/ml, 200.000 pg/ml, 100.000 pg/ml, 10.000 pg/ml, 1.000 pg/ml, 100 pg/ml, 10 pg/ml ve 1 pg/ml) yöntemin 400.000 pg/ml, 200.000 pg/ml ve 100.000 pg/ml'lik konsantrasyonlarda anlamlı bir ayırım yapamadığı, bu konsantrasyonlarda Ct değerlerinin çok yakın olduğu ve testin çok hızlı doyuma ulaştığı gözlenmiştir. Test 100.000 pg/ml, 10.000 pg/ml, 1.000 pg/ml, 100 pg/ml ve 10 pg/ml arasında lineer bir eğri oluşturmuş ve kantitasyon için dinamik aralığın 10-100.000 pg/ml olduğu hesaplanmıştır. 1 pg/ml'lik HBsAg miktarı 2 testte saptanamazken 1 testte saptanmıştır. Böylelikle testin saptama limiti 10 pg/ml olarak belirlenmiştir. Bu miktar klasik ELISA testlerinin ortalama 200-400 pg/ml'lik saptama sınırından 20-40 kat daha fazladır. Tez çalışmamızda düşük düzey viremlerin saptanmasında “Immuno-Real Time PCR” testini çok duyarlı bir yöntem olarak bulduk.

İzole anti-HBc hasta grubunu oluşturan neden ne olursa olsun bu olgular doğru ve dikkatli biçimde incelenmedikleri zaman kendilerinin ve toplumun sağlığı için tehdit oluşturabilirler. Bu gibi kişiler özellikle kan ve kan ürünlerinin kullanımı, organ nakilleri için risk oluşturabilirler. Bunun yanı sıra, hastalığın ilerleyen zamanlarında kendilerinde kalıcı karaciğer hasarı gerçekleşebilir. Bildirilen çalışmalar, bu tip olgularda genel tanı probleminin mutant virüs kökenlerinden kaynaklanmadığına dikkat çekmektedirler. Genel görüş, sorunun düşük viral yük nedeni ile oluşan sessiz enfeksiyonlar olduğu yönündedir. Bu sessiz enfeksiyonları klasik ELISA yöntemsel olarak saptayamamaktadır. “Immuno-Real Time PCR” yöntemi ise bu sorunun çözümünde, yapılacak optimizasyon ve kontrol çalışmalarından sonra, rutin tanı için

çok ümit vericidir. Ülkemizde, bu çalışma ile ilk defa bulunan ve dünyada (meydana geldiği pozisyon bakımından ilk, mutasyon tipi bakımından üçüncü) üçüncü olarak gözlenen, HBsAg'nin erken sonlanması ve dolayısı ile saptanmasını engelleyen “stop” kodon oluşum mutasyonu dikkat çekicidir. Bizim bulduğumuz mutasyon diğer ikisinden farklı pozisyonladır. Bu gibi mutasyonlarda, saptanacak antijenik yapı büyük oranda değiştiğinden immünolojik yöntemler yetersiz kalmaktadır. Bu gibi vakaların mutlaka nükleik asit tabanlı teknikler ile kontrol edilmeleri gerekmektedir.

Sonuç olarak, “Immuno-Real Time PCR” testinin daha hassas saptama sınırının olmasının yanı sıra yapılabilecek çoklu amplifikasyonlar ile birden fazla patojenin (HIV, HBV, HCV ya da HBsAg, Anti-HBs, Anti-HBc gibi) serolojik olarak daha duyarlı saptanabileceğini ve sistemin manyetik boncuk teknolojisi ile otomatize edilerek özellikle kan bankacılığı gibi sessiz HBV enfeksiyonlarının tanısının çok önem taşıdığı alanlarda kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Ali A., Pearce S., Coleman P. (2007): Factors affecting immunodetection of hepatitis B surface antigen recombinant mutants. *J Med Virol.*, Sep 14: 79 (S1):S47-S51.
2. Aoki M., Saito T., Watanabe H., et al. (2002): Clinical Significance of a Highly Sensitive Enzyme Immunoassay of Hepatitis B Surface Antigen Using a Novel Electron Spin Resonance Technique. *Journal of Medical Virology* 66:166-170.
3. Arauz-Ruiz P., Norder H., Robertson B.H., Magnius L.O. (2002): Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *Journal of General Virology*, 83: 2059–2073.
4. Arens M. (2001): Clinically relevant sequence-based genotyping of HBV, HCV, CMV and HIV. *J Clin. Virol.*, 22: 11-29.
5. Badur S., Akgün A. (2001): Diagnosis of Hepatitis B Infection and Monitoring Treatment. *J. Clin. Virol.*, 21: 229-237.
6. Bartholomeusz A., Locarnini S. (2006): Hepatitis B Virus Mutations Associated With Antiviral Therapy. *Journal of Medical Virology*, 78: 52–55.
7. Baumert T.F., Rogers S.A., Hasegawa K., Liang T.J. (1996): Two core promotor mutations identified in a Hepatitis B virus strain associated with fulminant hepatitis results in enhanced viral replication. *J. Clin. Invest.*, 98: 10:2268-76.
8. Bernard N.F., David M.K. (Chief Editors) (1990): *Fundamental Virology* (Sec. Ed.). Chapter 38: Hepadnaviridae 989-1024.
9. Bhatti F.A., Ullah Z., Salamat N., Ayub M., Ghani E. (2007): Anti-hepatitis B core antigen testing, viral markers, and occult hepatitis B virus infection in Pakistani blood donors: implications for transfusion practice. *Transfusion*, 47: 74-79.
10. Busch M.P. (2004): Should HBV DNA NAT replace HBsAg and/or anti-HBc screening of blood donors? *Transfusion Clinique et Biologique*, 11(1) :26-32.
11. Ceylan T., Özgüneş N., Ceylan N. ve ark. (1997): 0-15 yaş grubu çocuklarda hepatit A ve B seroprevalansı. *Viral Hepatit Dergisi*. 2: 115-117.
12. Chaudhuri V., Tayal R., Nayak B. et al (2004): Occult hepatitis B virus infection in chronic liver disease: full-length genome and analysis of mutant surface promoter. *Gastroenterology*. 127 (5): 1356-71.

13. Cooreman M.P., Leroux-Roels G., Paulij W. (2001): Vaccine and Hepatitis B Immune Globulin Induced Escape Mutations of Hepatitis B Virus Surface Antigen. *J. Biomed. Sci.*, 8: 237-247.
14. oşkun Ő., Keskin M., Önal O. (1996): Normal ve riskli gruplarda Hepatit B enfeksiyonu prevalansı. *Viral Hepatit Dergisi* 2: 84-88.
15. Datta S., Banerjee A., Chandra P.K., et al (2007): Detection of a premature stop codon in the surface gene of hepatitis B virus from an HBsAg and antiHBc negative blood donor. *Journal of Clinical Virology*, 40(3): 255-258.
16. De Clercq E. (1999): Perspectives for the treatment of hepatitis B virus infections. *Antimicrobial Agents*, 12: 81-95.
17. Devocioğlu C., Dikici B., Yıldırım I., Boşnak M. (1999): Kan ve kan ürünleri verilen hastalarda hepatit A, B, C ve E seropozitifliğı. *Viral Hepatit Dergisi* 2: 65-68.
18. Devocioğlu Donma M.H., Can I. (1991): Sık kan transfüzyonu yapılan pediyatrik maliniteli hastalarda HBsAg sıklığı. *İnfeksiyon Dergisi*, 5: 113-114.
19. Di Marco V., Lo Iarcono O. Camma C. et al (1999). The Long-Term Course of Hepatitis B. *Hepatology*. 30: 257-264.
20. Duclos-Vallee J.C., Capel F., Mabit H., Petit M.A. (1998): Phosphorylation of the hepatitis B virus core protein by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase proteinkinase activity. *J. Gen. Virol.* 79: 1665-1670.
21. Durmaz R., Durmaz B. (1991): Viral hepatit ön tanıli hastalarda ve hastane personeline HBsAg pozitifliğı. *Mikrobiyoloji Bült.* 25: 261-264.
22. Dusheiko G. (1998): Lamuvudine treatment of chronic hepatitis B. *Rev. Med. Virol.* 8: 153-159.
23. Fang C.T. (2006): Blood Screening for HBV DNA. *Journal of Clinical Virology*, 36 (s1): S30-S32.
24. Farrell G.E. (2000): Clinical Potential of Emerging New Agents in HepatitisB. *Drugs* 60: 701-710.
25. Findik D., Arslan U., Baykan M. (2007): Determination of hepatitis B virus DNA incidence, viral load, and mutations in blood donors with HBsAg and anti-HBs-negative serology and antibodies to hepatitis B core antigen. *European Journal of Internal Medicine*, 18 (8): 571-575.

26. François G., Kew M., Van Dame P. et al. (2001): Mutant hepatitis B viruses: a matter of academic interest only or a problem with far-reaching implications? *Vaccine*. 19: 3799-3815.
27. Ganem D., Prince A.M. (2004): Hepatitis B Virus Infection - Natural History and Clinical Consequences. *N. Engl. J. Med.* 350: 1118-29.
28. Geoffrey F., Suzanne K., Johan N., Erik D.C. (2008): Antiviral treatment of chronic hepatitis B virus infections: the past, the present and the future. *Reviews in Medical Virology*, 18 (1): 19-34.
29. Gerlich W.H., Wagner F.F., Chudy M. et al (2007): HBsAg non-reactive HBV infection in blood donors: Transmission and pathogenicity. *Medical Virology*, 79: S32-S36.
30. Gerlich WH, Caspari G. (2000): Hepatitis Viruses and safety of blood donations. *J Viral Hepatitis*. 6 (Suppl. 1): 6-15.
31. Grethe S., Monazahian M., Bohme I., Thomssen R., (1998): Characterization of unusual escape variants of hepatitis B virus isolated from a hepatitis B surface antigen-negative subject. *J Virol. Sep*: 72(9):7692-6.
32. Grethe S., Monazahian M., Bohme I. et al (2000): Serological pattern "anti-HBc alone": report on a workshop. *J Med Virol. Dec*: 62(4):450-5.
33. Günther S., Fischer L., Pult I., et al (1999): Naturally occurring variants of hepatitis B virus. *Adv in Virus Res.* 52: 25-137.
34. Hilleman M.R. (2001): Overview of the pathogenesis, prophylaxis and therapies of viral hepatitis B with focus on reduction to practical applications. *Vaccine* 19: 1837-1848
35. Jason Lei, Bruce A., Cervantes C., et al. (2006): Detection of Hepatitis B Virus Surface Antigen (HBsAg) Mutants by IMMULITE® 2000 HBsAg Assay. Diagnostic Products Corporation Technical Report.
36. Jung MG, Pape GR. (2002): Immunology of the hepatitis B infection. *The Lancet Inf. Dis.* 2: 43-50.
37. Kılıçturgay K., Badur S. Edt. (2001): *Viral Hepatitis*, 121-129.
38. Kleinman S.H., Busch M.P. (2006): Assessing the impact of HBV NAT on window period reduction and residual risk. *Journal of Clinical Virology*, 36 (s1): S23-S29

39. Kohno H., Inoue T., Tsuda F., et al. (1996): Mutations in the envelope gene of hepatitis B virus variants co-occurring with antibody to surface antigen in sera from patients with chronic hepatitis B. *J Gen Virol*, 77: 1825-1831.
40. Komiya Y., Katayama K., Yugi H., et al (2008): Minimum infectious dose of hepatitis B virus in chimpanzees and difference in the dynamics of viremia between genotype A and genotype C. *Transfusion*, 48: 286-294.
41. Koşar A., Sünbül M., Saniç A., Alıcı S. (1995): Tıp öğrencileri ve sağlık personelinde HBsAg ve anti HBs pozitifliği. *Mikrobiyoloji Bült.* 29: 52-57.
42. Kotwal J.G. (2000): Approaches of the Diagnosis of Hepatitis Viruses. *Molecular Biotechnology*. 16: 271-289.
43. Kramvis A. and Kew N.C. (1999): The core promotor of hepatitis B virus. *J Viral Hepat.* 6: 415-27.
44. Kreutz C. (2002): Molecular, immunological and clinical properties of mutated hepatitis B viruses. *J. Cell. Mol. Med.* 6: 113-143.
45. Kuhns M.C., McNamara A.L., Holzmayer V., et al (2007): Frequency of Diagnostically Significant Hepatitis B Surface Antigen Mutants. *Journal of Medical Virology* 79: S42–S46
46. La'ulu S.L., Roberts W.L. (2006): The Analytic Sensitivity and Mutant Detection Capability of Six Hepatitis B Surface Antigen Assays. *Am. J. Clin. Pathol*, 125: 748-751.
47. Lau G.K.K., Leung Y., Fong D.Y.T., et al. (2002): High hepatitis B virus (HBV) DNA viral load as the most important risk factor for HBV reactivation in patients positive for HBV surface antigen undergoing autologous hematopoietic cell transplantation. *Blood*, 99(7): 2324-2330.
48. Lee W.M. (Guest Edt.). (1999): Hepatitis B. *Clinics in Liver Disease*. 3(2): 179-428.
49. Lindh M., Hannmm C. and Dhillon A.P. (1998): Core promotor mutations and geneotypes in relation to viral replication and liver damage in East Asian hepatitis B virus carriers. *JID*, 179: 775-82.
50. Liu C.J., Chen D.S., Chen P.J. (2006): Epidemiology of HBV infection in Asian blood donors: Emphasis on occult HBV infection and the role of NAT. *Journal of Clinical Virology*, 36 (s1): S33-S44.

51. Locarnini S. (2000): Molecular pathogenesis of viral hepatitis. *J. of Gastroenterol. and Hepatol.* 15: 46-48.
52. Lok A.S.F., McMahon B.L., (2001): Chronic Hepatitis B. *Hepatology.* 34:1225-1237.
53. M. Sunbul and H. Leblebicioglu (2003): Distribution of hepatitis B virus genotypes in patients with chronic hepatitis B infection in Turkey. *Journal of Hepatology,* 38 (s1): 175-179
54. Maddrey W.C. (2000): Hepatitis B: An Important Public Health Issue. *J Med Virol.* 61: 362-366.
55. Mahoney F.J. (1999): Update on Diagnosis, Management, and Prevention of Hepatitis B Virus Infection. *Clin. Microb. Rev.* 12(2): 351-366.
56. Maia M., Takahashib B., Adler K., Garlick R.K., Wands J.R. (1995): Development of a two-site immuno-PCR assay for hepatitis B surface antigen *Journal of Virological Methods,* 52(3): 273-286.
57. Malik A.H., Lee M.W. (2000): Chronic Hepatitis B Virus Infection: Treatment Strategies for the Next Millennium. *Ann. of Int. Med.* 132: 723-73.
58. Mallat D., Schiff E. (2000): Viral Hepatitis. *Cur. Op. in Gastroenterol.* 16: 255-261.
59. Marques A.R., Straus S.E. (1998): Advances in the treatment of Chronic Hepatitis B virus Infection. *Rev in Med Viral* 8: 223-234.
60. McKie A., Samuel D., Cohen B., Saunders N.A. (2002): Development of a quantitative immuno-PCR assay and its use to detect mumps-specific IgG in serum. *Journal of Immunological Methods,* 261: 167–175.
61. McKie A., Vyse A., Maple C. (2002): Novel methods for the detection of microbial antibodies in oral fluid. *Lancet Infectious Diseases:* 2: 18–24.
62. McKie A., Samuel D., Cohen B., Saunders N.A. (2002): A quantitative immuno-PCR assay for the detection of mumps-specific IgG. *Journal of Immunological Methods,* 270: 135– 141.
63. Montalvo B.M.G., Farfán-Ale J.A., Acosta-Viana K.Y., Puerto-Manzano F.I. (2005): Hepatitis B virus DNA in blood donors with anti-HBc as a possible indicator of active hepatitis B virus infection in Yucatan, Mexico. *Transfusion Medicine,* 15: 371–378.

64. Mushahwar I.K. (2000): Recently Discovered Blood-Borne Viruses: Are They Hepatitis Viruses or Merley Endosymbionts? *J. Med. Virol.* 62: 399-404.
65. Mweene A.S., Ito T., Okazaki K., Ono E., Shimizu Y., Kida H. (1996): Development of Immuno-PCR for Diagnosis of Bovine Herpesvirus 1 Infection *Journal of Clinical Microbiology*, Mar.: 748–750.
66. Ngui S.L., Hallet R., Teo C.G. (1999): Natural and Iatrogenic Variation in Hepatitis B Virus. *Rev Mol Virol.* 9: 183-209
67. Ohno H., Kaneko S., Koboyashi K., Murakami S. (1997) Human Hepatitis B Virus Enhancer 1 is Responsive to Human Interleukin-6. *J Med Virol.* 52: 413-418.
68. Ohnuma H., Yoshikawa A., Mizoguchi H., et al (2005): Characterization of genotype H hepatitis B virus strain identified for the first time from a Japanese blood donor by nucleic acid amplification test. *Journal of General Virology*, 86: 595–599.
69. Olinger C.M., Weber B., Otegbayo J.A. et al. (2007): Hepatitis B virus genotype E surface antigen detection with different immunoassays and diagnostic impact of mutations in the preS/S gene. *Med. Microbiol. Immunol.*, 196: 247–252.
70. Ozdemir F.T., Duman D., Ertem D. et al. (2005): Determination of hepatitis B genotypes in patients with chronic hepatitis B virus infection in Turkey. *Turk J Gastroenterol*, 16 (4): 183-87.
71. Özaslan M., Özaslan E., Barsgan A., Koruk M. (2007): Mutations in the S gene region of Hepatitis B virus genotype D in Turkish Patients. *Journal of Genetics*, 86(3): 195-201.
72. P Shields L., Owsianka A., Carman W.F. et al. (1999): Selection of hepatitis B surface “escape” mutants during passive immune prophylaxis following liver transplantation: potential impact of genetic changes on polymerase protein function. *Gut*, 45: 306–309.
73. Parka Y.N. Nakai K., Park C., Abe K. (1997): Hepatitis B virus mutants in hepatocellular carcinoma patients with coexisting HBsAg and anti-HBs. *Hepatology Research* 8(1): 52-62.
74. Pasha A., Üzsoy M.F., Altunay H. ve ark. (1999): İstanbul'da Hepatit C ve B Seroprevelansı. *Gülhane Tıp Derg.* 41: 325-330.

75. Pringle CR. (1999): Virus Taxonomy - 1999 (The Universal System of Virus Taxonomy, updaed to inculude the new proposals ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses during 1998). Arch Virol. 144/2.
76. Richman D.D., Whitley R.J. Hayden G.F. (Edt.) (1997): Clinical Virology Section II. Part 29. Hepatitis B virus 633-682 First Pup.
77. Sayiner A.A., Agca H., Sengonul A., Celik A., Akarsu M. (2007): A new hepatitis B virus vaccine escape mutation in a renal transplant recipient Journal of Clinical Virology, 38(2): 157-160.
78. Seeger C and Mason WS. (2000): Hepatitis B virus biology. Microb. and Mol. Bio. Rev. (64), 1: 51-68.
79. Sengupta S., Rehman S., Durgapal H., et al (2007): Role of surface promoter mutations in hepatitis B surface antigen production and secretion in occult hepatitis B virus infection. Med Virol. 79 (3): 220-228.
80. Sheldon J., Soriano V. (2008): Hepatitis B virus escape mutants induced by antiviral therapy. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 61(4): 766-768
81. Sıdal M., Oğuz F., Okan F. ve ark. (1990): Akut viral hepatiHerin analizi. Klimik Dergisi. 3: 87-91.
82. Sıdsal M., Ünvar E., Oğuz F., et al. (2001): Age spesifik seroepidemiology of hepatitis A, B and E infections among children in Istanbul Turkey. Eurp. J. Epidemiol. 17: 141-144.
83. Sönmez E., Kutlu O., Bayındır Y. ve ark. (2000): 0-6 yaş grubunda hepatit B, C, D, E virüs enfeksiyonlarının prevalansı. Viral Hepatit Dergisi 1: 12-17.
84. Stuyver L., De Gendt S., Van Geyt C. et al. (2000): A New Genotype of Hepatitis B Virus: Complate Genome and Phylogenetic Relatedness. J. Gen. Virol. 1: 67-74.
85. Su H., Yee J.K. (1992): Regulation of hepatitis B virus gene expression by its two enhancers. Proc Natl Acad Sci. 89: 2708-2712.
86. Suk A., Lok F. (2000): Hepatitis B infection: pathogenesis and managemen. J. Hepatology 32 (suppl. 1): 89-97.
87. Tansuğ Ş, Düzgünsıvacı E., Ünal Z., Gürel H. (1999): HBV enfeksiyonlarının seroepidemiolojik araştırılması. Viral Hepatit Dergisi. 2: 96-109.
88. Thoai Duong Ly. (2007): Detection HBsAg mutants by immunoassays. J. Med. Virol. 79: S37-S41.

89. Tong W. (2000): Genetic variations of hepatitis B virus. *Cur. Op. in Infect. Dis.* 13: 481-487.
90. Ulusoy Ş., Bilgiç A. (1993): Hastane personelinde hepatit B Virüsü enfeksiyonu serolojik göstergeleri. *İnfeksiyon Derg.* 7: 265-267.
91. Van Damme P. (2001): Hepatitis B: vaccination programmes in Europe - an update. *Vaccine.* 19: 2375-2379.
92. Velu V. (2008): Transmission of "a" determinant variants of hepatitis B virus in immunized babies born to HBsAg carrier mothers. *Jpn. J. Infect. Dis.* 61(1): 73-6.
93. Vitale F., Tramuto F., Orlando A., et al (2008): Can the serological status of anti-HBc alone be considered a sentinel marker for detection of occult HBV infection? *Journal of Medical Virology*, 80 (4): 577-582.
94. Wacker R., Ceyhan B., Alhorn P., et al (2007): Magneto Immuno-PCR: A novel immunoassay based on biogenic magnetosome nanoparticles. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 357: 391–396.
95. Weber B. (2005): Genetic variability of the S gene of hepatitis B virus: clinical and diagnostic impact. *Journal of Clinical Virology*, 32(2): 102-112.
96. Weinberger K.M., Bauer T., Boshm S., Jilg W. (2000): High genetic variability of the group-specific a- determinant of hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) and the corresponding fragment of the viral polymerase in chronic virus carriers lacking detectable HBsAg in serum. *Journal of General Virology* 81: 1165–1174.
97. Weinberger K.M., Wiedenmann E., Bohm S., Jilg W. (2000): Sensitive and accurate quantitation of hepatitis B virus DNA using a kinetic fluorescence detection system (TaqMan PCR). *J Virol Methods.* 85(1-2): 75-82.
98. Wright M., Main L. (2000): The prevention and management of viral hepatitis. *Cur. Op. in Infect. Dis.* 13: 489-494.
99. Yalcinkaya K.T., Ucar H., Uzun M., et al (2005): Subtypes of Hepatitis B Surface Antigen in Turkey. *Jpn. J. Infect. Dis.* 58: 120-122.
100. Yeh C., Chien R., Chu C., et al. (2000): Clearance of the original hepatitis B virus YMDD-motif mutants with emergence of distinct lamivudine-resistant mutants during prolonged lamivudine therapy. *Hepatology*: 31: 1318–26.

101. Yuen M.F., Lai C.L. (2001): Treatment of chronic hepatitis B. *The Lancet Infect. Dis.* 1: 232-241.
102. Zuckerman A.J. and Zuckerman N. (1999): Molecular Epidemiology of Hepatitis B Virus Mutants. *J Med Virol.* 58: 193-195.
103. Zuckerman N.J., Zuckerman N. (2000): Current Topics in Hepatitis B. *J Infect.* 41: 130-136.

HAM VERİLER

>AB014370

atggagaacatcacatcaggattcctaggaccctgctcgtgttacaggcggggtttttc
 ttgttgacaagaatcctcacaataccgcagagtctagactcgtgggtggacttctctcaat
 tttctaggggggatcacccgtgtgtccttggccaaaattcgcagtcocccaacctccaatcac
 tcaccaaacctcctgtcctccaatttgcctcgtgttatcgctggatgtgtctgcggcggtttt
 atcatattcctcttcatcctgctgctatgcctcatcttcttattgggttcttctggattat
 caaggtatgttgcccgtttgtcctctaattccaggatcaacaacaaccagtacgggacca
 tgcaaaacctgcacgactcctgctcaaggcaactctatgtttccctcatgttgctgtaca
 aaacctacgggatggaaattgcacctgtattcccatcccatcgctcctgggctttcgcaaaa
 ttcctatgggagtgggcctcagtcctgtttcttgggtcagtttactagtgccatttgtt
 cagtggttcgtagggttttccccactgtttgggtttcagctatatggatgatgtggtat
 tgggggccaagtctgtacagcatcgtgaggccctttataccgctgtttaccaattttcttt
 tgtctctgggtatacatt

>X02763

atggagaacatcacatcaggattcctaggaccctgctcgtgttacaggcggggtttttc
 ttgttgacaagaatcctcacaataccgcagagtctagactcgtgggtggacttctctcaat
 tttctaggggggatctcccggtgtgtccttggccaaaattcgcagtcocccaacctccaatcac
 tcaccaaacctcctgtcctccaatttgcctcgtgttatcgctggatgtgtctgcggcggtttt
 atcatattcctcttcatcctgctgctatgcctcatcttcttattgggttcttctggattat
 caaggtatgttgcccgtttgtcctctaattccaggatcaacaacaaccagtacgggacca
 tgcaaaacctgcacgactcctgctcaaggcaactctatgtttccctcatgttgctgtaca
 aaacctacgggatggaaattgcacctgtattcccatcccatcgctcctgggctttcgcaaaa
 tacctatgggagtgggcctcagtcctgtttcttgggtcagtttactagtgccatttgtt
 cagtggttcgtagggttttccccactgtttgggtttcagctatatggatgatgtggtat
 tgggggccaagtctgtacagcatcgtgagtcctttataccgctgtttaccaattttcttt
 tgtctctgggtatacatt

>X70185

atggagaacatcacatcaggattcctaggaccctgctcgtgttacaggcggggtttttc
 ttgttgacaagaatcctcacaataccgcagagtctagactcgtgggtggacttctctcaat
 tttctaggggggtcacccgtgtgtccttggccaaaattcgcagtcocccaacctccaatcac
 tcaccaaacctcctgtcctccaatttgcctcgtgttatcgctggatgtgtctgcggcggtttt
 atcatattcctcttcatcctgctgctatgcctcatcttcttgggttcttctggattat
 caaggtatgttgcccgtttgtcctctaattccaggatcaacaacaaccagtacgggacca
 tgcaaaacctgcacgactcctgctcaaggcaactctatgtttccctcatgttgctgtaca
 aaacctacgggatggaaattgcacctgtattcccatcccatcgctcctgggctttcgcaaaa
 tacctatgggagtgggcctcagtcctgtttcttgggtcagtttactagtgccatttgtt
 cagtggttcgtagggttttccccactgtttgggtttcagctatatggatgatgtggtat
 tgggggccaagactgtacagcatcgtgagtcctttataccgctgtttaccaattttcttt
 tgtctctgggtatacatt

>AB033355

atggagaacatcgcatcaggactcctaggaccctgctcgtgttacaggcggggtttttc
 ttgttgacaaaaatcctcacaataccacagagtctagactcgtgggtggacttctctcaat
 tttctaggggggaacaccgtgtgtccttggccaaaattcgcagtcoccaaactcctcagtcac
 tcaccaacttgttgcctccgatttgcctcgtgttatcgctggatgtgtctgcggcggtttt
 atcatcttctctgcactcctgctgctatgcctcatcttcttgggttcttctggactat
 caaggtatgttgcccgtttgtcctctaattccaggatcatcaaccaccagcaccggacca
 tgcaaaacctgcacgactcctgctcaaggaaacctcttgtttccctcatgttgctgtaca
 aaacctacgggacggaaattgcacctgtattcccatcccatcatcttgggctttcgcaaaa
 tacctatgggagtgggcctcagtcctgtttcttgggtcagtttactagtgccatttgtt
 cagtggttcgtagggttttccccactgtctgggtttcagttatatggatgatgtggttt
 tgggggccaagtctgtacaacatcttgagtcctttatgccgctgtttaccaattttcttt
 tgtctttgggtatacatt

>D00329

atggagaacatcgcatcaggactcctaggaccctgctcgtgttacaggcggggtttttc
 ttgttgacaaaaatcctcacaataccacagagtctagactcgtgggtggacttctctcaat

tttctagggggaacacccgtgtgtcttggccaaaattcgcagtcoccaaattctccagtcac
tcaccaaacctgttgtcctccaatttgtcctgggtatcgctggatgtgtctgcggcgtttt
atcatcttccctctgcatcctgtgtctatgcctcatcttctgttggttcttctggactac
caaggtatgttgcccgtttgtcctctaattccaggatcatcaacaaccagcacccggacca
tgcaaaacctgcacaactcctgtcaaggaacctctatgtttccctcatgttgctgtaca
aaacctacggatggaaactgcacctgtattcccatcccatcatcttgggctttcgcaaaa
tacctatgggagtgggcctcagtcggtttcttctgggtcagtttactagtgccatttgtt
cagtggttcgtagggctttcccccactgtctggccttcagttatatggatgatatgggtt
tggggccaagtctgtacaacatcttgagtccttttatgccgctgttaccaattttcttt
tgtctttgggtatacatt

>AB033557

atggagaacacaacatcaggattcctaggaacctgtcgtgttacaggcggttttttc
ttgttgacaagaatcctcacaataccacagagtcctagactcgtgggtggacttctctcaat
tttctagggggagcacccacgtgtcctggccaaaattcgcagtcoccaaactccaatcac
tcaccaaacctcttgtcctccaatttgtcctgggtatcgctggatgtgtctgcggcgtttt
atcatattcctcttcatcctgtgtctatgcctcatcttctgttggttcttctggactac
caaggtatgttgcccgtttgtcctctacttccaggaacctcaactaccagcacggggcca
tgcaagacctgcacgattcctgtcgaaggaacctctatgtttccctcttgttgctgtaca
aaaccttcggacggaaactgcacctgtattcccatcccatcatcctgggctttcgcaaaa
ttcctatgggagtgggcctcagtcggtttctcctgggtcagtttactagtgccatttgtt
cagtggttcgtagggctttcccccactgtttggccttcagctatatggatgatgtgggtat
tggggccaagtctgtacaacatcttgagtcctttttaccgctgttaccaattttcttt
tgtctttgggtatacatt

>D00330

atggagaacatcgcatcaggactcctaggaacctgtcgtgttacaggcggttttttc
ttgttgacaaaaatcctcacaataccacagagtcctagactcgtgggtggacttctctcaat
tttctagggggaacacccgtgtgtcttggccaaaattcgcagtcoccaaattctccagtcac
tcaccaaacctgttgtcctccaatttgtcctgggtatcgctggatgtgtctgcggcgtttt
atcatcttccctctgcatcctgtgtctatgcctcatcttctgttggttcttctggactac
caaggtatgttgcccgtttgtcctctaattccaggatcatcaaccaccagcacgggacca
tgcaagacctgcacaactcctgtcgaaggaacctctatgtttccctcatgttgctgtaca
aaacctatggatggaaactgcacctgtattcccatcccatcatcttgggctttcgcaaaa
tacctatgggagtgggcctcagtcggtttcttctgggtcagtttactagtgccatttgtt
cagtggttcgtagggctttcccccactgtctggccttcagttatatggatgatgtgggtat
tggggccaagtctgtacaacatcttgagtccttttatgccgctgttaccaattttcttt
tgtctttgggtatacatt

>AB033559

atggagaacatcacatcaggattcctaggaacctgtcgtgttacaggcggttttttc
ttgttgacaagaatcctcacaataccgcagagtcctagactcgtgggtggacttctctcaat
tttctaggggggaactaccgtgtgtcttggccaaaattcgcagtcoccaaactccaatcac
tcaccaaacctcctgtcctccaacttgtgtcgtgggtatcgctggatgtgtctgcggcgtttt
atcatcttccctcttcatcctgtgtctatgcctcatcttctgttggttcttctggactac
caaggtatgttgcccgtttgtcctctaattccaggatcatcaaccaccagcacgggaccc
tgcaaacctgcacgactcctgtcgaaggaacctctatgtatccctcctgttgctgtaca
aaaccttcggacggaaactgcacctgtattcccatcccatcatcctgggctttcggaaaa
ttcctatgggagtgggcctcagcccgtttcttctgggtcagtttactagtgccatttgtt
cagtggttcgtagggctttcccccactgtttggccttcagttatatggatgatgtgggtat
tggggccaagtctgtacagcatcttgagtcctttttaccgctgttaccaattttcttt
tgtctttgggtatacatt

>Y18855

atggagaacacaacatcaggattcctaggaacctgtcgtgttacaggcggttttttc
ttgttgacaagaatcctcacaataccacagagtcctagactcgtgggtggacttctctcaat
tttctagggggagcacccacgtgtcctggccaaaattcgcagtcoccaaactccaatcac
tcaccaaacctcttgtcctccaatttgtcctgggtatcgctggatgtgtctgcggcgtttt
atcatattcctcttcatcctgtgtctatgcctcatcttctgttggttcttctggactac
caaggtatgttgcccgtttgtcctctacttccaggaacatcaactaccagcacgggacct
tgcaagacctgcacgattcctgtcgaaggaacctctatgtttccctcttgttgctgtaca
aaaccttcggacggaaactgcacctgtattcccatcccatcatcctgggctttcgcaaga
ttcctatgggagtgggcctcagtcggtttctcctgggtcagtttactagtgccatttgtt
cagtggttcgtagggctttcccccactgtttggccttcagttatatggatgatgtgggtat

tgggggccaagtctgtacaacatcttgagtcctttttacctctattaccaattttcttt
tgtctttgggtatacatt

>X02496

atggagaacatcacatcaggattcctaggaccctgctcgtgttacaggcggtttttc
ttgttgacaagaatcctcacaataccgcagagtctagactcgtgggtgacttctctcaat
tttctagggggaactaccgtgtgtcttgccaaaattcgcagtcaccaacctccaatcac
tcaccaacctcctgtcctccaacttgctcctgggtatcgctggatgtgtctgcggcgtttt
atcatcttctcttcatcctgctgctatgcctcatcttctgttggttcttctggactat
caaggtatgttgcccggttgctcctctaattccaggatcttcaactaccagcacgggacca
tgcagaacctgcacgactcctgctcaaggaacctctatgtatccctcctgttgctgtacc
aaaccttcggacggaaattgcacctgtattcccatcccatcatcctgggctttcgaaaaa

ttcctatgggagtgggcctcagccggtttctcctggctcagtttactagtgccatttggt
cagtggttcgtagggcgtttcccccactgtttggctttcagttatatggatgatgtggtat
tgggggccaagtctgtacagcatcttgagtcctttttaccgctgttaccaattttcttc
tgtctttgggtatacatt

>X65257

atggagaacatcacatcaggattcctaggacccttctcgtgttacaggcggtttttc
ttgttgacaagaatcctcacaataccgcagagtctagactcgtgggtgacttctctcaat
tttctagggggaactaccgtgtgtcttgccaaaattcgcagtcaccaacctccaatcac
tcaccaacctcctgtcctccaacttgctcctgggtatcgctggatgtgtctgcggcggttt
atcatcttctcttcatcctgctgctatgcctcatcttctgttggttcttctggactat
caaggtatgttgcccggttgctcctctaattccaggatcctcaaccaccagcacgggacca
tgcagaacctgcacgactcctgctcaaggaacctctatgtatccctcctgttgctgtacc
aaaccttcggacggaaattgcacctgtattcccatcccatcatcctgggctttcgaaaaa
ttcctatgggagtgggcctcagccggtttctcctggctcagtttactagtgccatttggt
cagtggttcgtagggcgtttcccccactgtttggctttcagttatatggatgatgtggtat
tgggggccaagtctgtacagcatcttgagtcctttttaccgctgttaccaattttcttt
tgtctttgggtatacatt

>X68292

atggagaacatcacatcaggattcctaggaccctgctcgtgttagaggcggtttttc
ttgttgacaagaatcctcacaataccgcagagtctagactcgtgggtgacttctctcaat
tttctagggggaactaccgtgtgtcttgccaaaattcgcagtcaccaacctcccatcac
tcaccaacctcctgtcctccaatttgctcctgggtatcgctggatgtgtctgcggcggttt
atcatattcctcttcatcctgctgctatgcctcatcttctgttggttcttctggactat
caaggtatgttgcccggttgctcctctaattccaggatcttcaacaaccagcacgggacca
tgcagaacctgcacgactcctgctcaaggaacctctatgtatccctcctgttgctgtacc
aaaccttcggacggaaattgcacctgtattcccatcccatcatcctgggctttcgaaaaa
ttcctatggcagtgggcctcagccggtttctcctggctcagtttactagtgccatttggt
cagtggttcgtagggcgtttcccccactgtttgggtttcagctatatggatgatgtggtat
tgggggccaagtctgtacagcatcgtgagtcctttttaccgctgttaccaattttcttt
tgtctctgggtatacatt

>X72702

atggagaacatcacatcaggattcctaggaccctgctcgtgttacaggcggtttttc
ttgttgacaagaatcctcacaataccgcagagtctagactcgtgggtgacttctctcaat
tttctagggggaaccaccgtgtgtcttgccaaaattcgcagtcaccaacctccaatcac
tcaccaacctcctgtcctccaacttgctcctgggtatcgctggatgtgtctgcggcggttt
atcatcttctcttcatcctgcttctatgcctcatcttctgttggttctactggactat
caaggtatgttgcccggtgtgtcctctaattccaggatcttcaaccaccagcgcgggacca
tgcagaacctgcacgactactgctcaaggaacctctatgtatccctcctgttgctgtacc
aaaccttcggacggaaattgcacctgtattcccatcccatcatcctgggctttcgaaaaa
ttcctatgggagtgggcctcagccggtttctcctggctcagtttactagtgccatttggt
cagtggttcgtagggcgtttcccccactgtttggctttcagttatatggatgatgtggtat
tgggggccaagtctgtacagcatcttgagtcctttttaccgctgttaccaattttcttt
tgtctttgggtatacatt

>X75664

atggaaaagcatcacatcaggattcctaggaccctgctcgtgttacaggcggtttttc
ttgttgacaaaaatcctcacaataccgcagagtctagactcgtgggtgacttctctcaat
tttctagggggagctcccggtgtgtcttgccaaaattcgcagtcaccaacctccaatcac
tcaccaacctcttgtcctccaatttgctcctgggtatcgctggatgtgtctgcggcggttt

atcatcttcctcttcacccctgctgctatgcctcatcttcttgttggttcttctggactat
 caaggtatgttgcccgtttgtcctctaattccaggatcatcaaccaccagcacgggaccc
 tgccgaacctgcacgactcttgctcaaggaacctctatgtttccctcatgttgctgttca
 aaaccttcggacggaaattgcacttgattcccatcccatcatcatgggctttcgaaaaa
 ttcctatgggagtgggcctcagcccgtttctcctggctcagtttactagtgccatttggt
 cagtggttcgcggggctttcccccactgtctggctttcagttatatggatgatgtggtat
 tgggggccaagtctgtacgacatcttgagtcctttataacctctgttaccaattttcttt
 tgtctttgggtatacatt

>X75657

atggaaagcatcacatcaggattcctaggaccctgctcgtgttacaggcgggggttttc
 ttgttgacaaaaatcctcacaataccgcagagtctagactcgtgggtggacttctctcaat
 tttctaggggagctcccggtgtgtcttgcccaaaattcgcagtcaccaacctccagtcac
 tcaccaacctcttgtcctccaatttgctcctggctatcgtggatgtgtctgcggcggttt
 atcatcttcctcttcacccctgctgctatgcctcatcttcttgttggttcttctggactat
 caaggtatgttgcccgtttgtcctctaattccaggatcatcaaccaccagtcacgggaccc
 tgccgaacctgcacgactcttgctcaaggaacctctatgtttccctcatgttgctgttca
 aaaccttcggacggaaattgcacttgattcccatcccatcatcatgggctttcgaaaaa
 ttcctatgggagtgggcctcagcccgtttctcctggctcagtttactagtgccatttggt
 cagtggttcgcggggctttcccccactgtctggctttcagttatatggatgatgtggtat
 tgggggccaagtctgtacaacatcttgagtcctttataccgctgttaccaattttcttt
 tgtctttgggtatacatt

>AB032431

atggaaagcatcacatcaggattcctaggaccctgctcgtattacaggcgggggttttc
 ttgttgacaaaaatcctcacaataccgcagagtctagactcgtgggtggacttctctcaat
 tttctaggggagctcccggtgtgtcttgcccaaaattcgcagtcaccaacctccaatcac
 tcaccaacctcttgtcctccaatttgctcctggctatcgtggatgtgtctgcggcggttt
 atcatcttcctcttcacccctgctgctatgcctcatcttcttgttggttcttctggactat
 caaggtatgttgcccgtttgtcctctaattccaggatcatcaaccaccagtcacgggaccc
 tgccgaacctgcacgactcttgctcaaggaacctctatgtttccctcatgttgctgttca
 aaaccttcggacggaaattgcacttgattcccatcccatcatcatgggctttcgaaaaa
 ttcctatgggagtgggcctcagcccgtttctcctggctcagtttactagtgccatttggt
 cagtggttcgcggggctttcccccactgtctggctttcagttatatggatgatgtggtat
 tgggggccaagtctgtacaacatcttgagtcctttataccgctgttaccaattttcttt
 tgtctttgggtatacatt

>X75658

atggacaacatcacatcaggactcctaggaccctgctcgtgttacaggcgggtgtgttcc
 ttgttgacaaaaatcctcacaataccacagagtctagactcgtgggtggacttctctcaat
 tttctagggggactaccgggtgtcctggccaaaattcgcagtcaccaacctccaatcac
 ttaccaacctctgtcctccaacttgctcctggctatcgtggatgtgtctgcggcggttt
 atcatcttcctcttcacccctgctgctatgcctcatcttcttgttggttcttctggactat
 caaggtatgttgcccgtttgtcctctaattccaggatctacgaccaccagcacgggacca
 tgcaaaacctgcacaaactcttgctcaaggaacctctatgtttccctcctgttgctgttcc
 aaaccttcggacggaaactgcacctgtattcccatcccatcatcttgggcttttaggaaaa
 tacctatgggagtgggcctcagcccgtttctcctggctcagtttactagtgaatttggt
 cagtggtgcgtagggctttcccccactgtctggcttttagttatatggatgatctggtat
 tgggagccaaatctgtgcagcatcttgagtcctttataccgctgttaccaattttctgt
 tatctgtgggtatccatt

>X75663

atggagaacatcacatcaggactcctaggaccctgcgcgtgttacaggcgggtgtgttcc
 ttgttgacaaaaatcctcacaataccacagagtctagactcgtgggtggacttctctcaat
 tttctagggggactaccaggtgtcctggccaaaattcgcagtcaccaacctccaatcac
 ttaccaacctctgtcctccaacttgctcctggctatcgtggatgtgtctgcggcggttt
 atcatcttcctcttcacccctgctgctatgcctcatcttcttgttggttcttctggactac
 caaggtatgttgcccgtttgtcctctacttccaggatccacgaccaccagcacgggacca
 tgcaaaacctgcacagctcttgctcaaggaacctctatgtttccctcctgttgctgttcc
 aaaccttcggacggaaactgcacctgtattcccatcccatcatcttgggcttttaggaaaa
 tacctatgggagtgggcctcagcccgtttctcctggctcagtttactagtgaatttggt
 cagtggtgcgtagggctttcccccactgtctggcttttagttatatggatgatctggtat
 tgggggccaatctgtgcagcatcttgagtcctttataccgctgttaccaattttctgt
 tatctgtgggtatccatt

>AF160501

atggagaacatcacatcaggattcctaggacccttgctcgtgttacaggcggggtttttc
 ttgttgacaagaatcctcacaataccgcagagtctagactcgtgggtggacttctctcaat
 tttctagggggagtgcccggtgtgtcctggcctaaattcgcagtcocccaaacctccaatcac
 tcaccaatctcctgtcctccaacttgctcgtggtatcgctggatgtgtctgcggcggtttt
 atcatattcctcttcatcctgctgctatgcctcatcttcttgttggttcttctggactat
 caaggtatgttgcccggttgcctctgattccaggatcctcgaccaccagtagcgggaccc
 tgcaaaacctgcacgactcctgctcaaggcaactctatgtatccctcatgttgctgtaca
 aaaccttcggacggaattgcacctgtattcccatcccatcatcttgggctttcgcaaaa
 tacctatgggagtgggcctcagtcctgttctcttggctcagttactagtgccattttgt
 cagtgggtcgtagggttttccccactgtctggctttcagctatatggatgatgtgggtat
 tgggggccaatctgtacaacatcttgagtcctttataccgctgttaccaattttcttt
 tgtcttgggtatacatc

>AB179747

atggagaacatcacatcaggactcctaggacccttctcgtgttacaggcgggtgtgtttc
 ttgttgacaaaaatcctcacaataccaaagagtctagactcgtgggtggacttctctcaat
 tttctaggggtaccaccgggtgtcctggccaaaattcgcagtcocccaatctccaatcac
 ttaccaacctcctgtcctccaacttgctcgtggtatcgctggatgtgtctgcggcggtttt
 atcatcttctcttcatcctgctgctatgcctcatcttcttgttggttcttctggactat
 caaggtatgttgcccggtgtgtcctctacttccaggatcwcaccaccagcagcgggaccc
 tgcaaaacctgcaccactcttgctcaaggaaacctctatgtttccctcctgctgctgtacc
 aaaccttcggacggaattgcacctgtattcccatcccatcatcttgggctttcgcaaaa
 tacctatgggagtgggcctcagcccggttctcttggctcagttactagtgaattttgt
 cagtgggtgcgtagggttttccccactgtctggcttttagttatatggatgatctgggtat
 tgggggccaatctgtgcagcatcttgagtcctttataccgctgttaccaattttttgt
 tatctgtgggcatccatt

>AB064315

atggagaacatcacatcaggactcctaggacccttctcgtgttacaggcgggtgtgtttc
 ttgttgacaaaaatcctcacaataccacggagtctagactcgtgggtggacttctctcaat
 tttctaggggtaccaccgggtgtcctggccaaaattcgcagtcocccaatctccaatcac
 ttaccaacctcctgtcctccaacttgctcgtggtatcgctggatgtgtctgcggcggtttt
 atcatcttctcttcatcctgctgctatgcctcatcttcttgttggttcttctggactat
 caaggtatgttgcccggtgtgtcctctacttccaggatcttcaaccaccagcagcgggaccc
 tgcaaaacctgcaccactcttgctcaaggaaacctctatgtttccctcctgctgctgtacc
 aaaccttcggacggaattgcacctgtattcccatcccatcatcttgggctttcgcaaaa
 tacctatgggagtgggcctcagcccggttctcttggctcagttactagtgaattttgt
 cagtgggtgcgtagggttttccccactgtctggcttttagttatatggatgatttgggtat
 tgggggccaatctgtgcaacatcttgagtcattttataccgctgttaccaattttttgt
 tatctgtgggcatccatt

>7

ATGGAGAACATCACATCAGGATTTCCTAGGACCCCTGCTCGTGTTACAGGCGGGGTTTTTC
 TTGTTGACAAGAATCCTCACAATACCGCAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTCAAT
 TTTCTAGGGGGAACCTACCGTGTGTCTTGGCCAAAATTTCGCAGTCCCCAACCTCCAATCAC
 TCACCAACCTCCTGTCTCTCCAACCTGTCTGCTGGTTATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGTTTT
 ATCATCTTCTCTTTCATCTCTGCTGCTATGCCTCATCTTCTTGTGTTGTTCTTCTGGACTAT
 CAAGGTATGTTGCCCGTTTGTCTCTAATTCAGGATCTTCAACTACCAGCACGGGACCA
 TGCAGAACCTGCACGACTCCTGCTCAAGGAACCTCTATGTATCCCTCCTGTTGCTGTACC
 AAACCTTCGGACGGAATTCACCTGTATTCCcATCCcATCATCTGGGCTTTTCGGAAAA
 TTCTTATGGGAGTGGGCCTCAGCCCGTTTCTCTGGCTCAGTTTACTAGTGCCATTGTGT
 CAGTGGTTTCGTAGGGCTTTCCCCACTGTTTGGCTTTTTCAGTTATATGGATGATGTGGGTAT
 TGGGGGCCAAGTCTGTACAGCATCTTGAGTCCCTTTTTTACCCTGTGTACCAATTTTCTTT
 TGTCTCTGGGTATACATT

>6

ATGGAGAACATCACATCAGGATTTCCTAGGACCCCTGCTCGTGTTACAGGCGGGGTTTTTC
 TTGTTGACAAGAATCCTCACAATACCGCAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTCAAT
 TTTCTAGGGGGAACCTACCGTGTGTCTTGGCCAAAATTTCGCAGTCCCCAACCTCCAATCAC
 TCACCAACCTCCTGTCTCTCCAACCTGTCTGCTGGTTATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGTTTT
 ATCATCTTCTCTTTCATCTCTGCTGCTATGCCTCATCTTCTTGTGTTGTTCTTCTGGACTAT
 CAAGGTATGTTGCCCGTTTGTCTCTAATTCAGGATCTTCAACCACCAGCACGGGACCA
 TGCAGAACCTGCACGACTCCTGCTCAAGGAACCTCTATGTATCCCTCCTGTTGCTGTACC

AAACCTTCGGACGGAAATTGCACCTGTATTCCCATCCCATCATCTTGGGCTTTCGGAAAA
 TTCTATGGGAGTGGGCCTCAGCCCGTTTCTCTTGGCTCAGTTTACTAGTGCCATTTGTT
 CAGTGGTTTCGTAGGGCTTTCCTCCACTGTTTGGCTTTCAGTTATATGGATGATGTGGTAT
 TGGGGGCCAAGTCTGTACAGCATCTGAGTCCCTTTTTACCGCTGTTACCAATTTCTTT
 TGTCTTTGGGTATACATT

>5

ATGGAGAACATCACATCAGGATTCCCTAGGACCCCTGCTCGTGTTACAGGCGGGGTTTTTC
 TTGTTGACAAGAATCCTCACAATACCGCAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTCAAT
 TTTCTAGGGGGAACCTACCGTGTGTCTTGGCCAAAATTTCGCAGTCCCCAACCTCCAATCAC
 TCACCAACCTCCTGTCTCCAACTTGTCTGGTTATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGTTTT
 ATCATCTTCCTCTTCATCTGCTGCTATGCCTCATCTTCTTGTGGTTCTTCTGGACTAT
 CAAGGTATGTTGCCCCTTGTCTCTAATTCCAGGATCTTCAACTACCAGCACGGGACCA
 TGCAGAACCTGCACGACTCCTGCTCAAGGAACCTCTATGTATCCCTCCTGATGCTGTACC
 AAACCTTCGGACGGAAATTGCACCTGTATTCCCATCCCATCATCTTGGGCTTTCGGAAAA
 TTCTATGGGAGTGGGCCTCAGCCCGTTTCTCTTGGCTCAGTTTACTAGTGCCATTTGTT
 CAGTGGTTTCGTAGGGCTTTCCTCCACTGTTTGGCTTTCAGTTATATGGATGATGTGGTAT
 TGGGGGCCAAGTCTGTACAGCATCTTGAAGTCCCTTTTTACCGCTGTTACCAATTTCTTT
 TGTCTTTGGGTATACATT

>4

ATGGAGAACATCACATCAGGATTCCCTAGGACCCCTGCTCGTGTTACAGGCGGGGTTTTTC
 TTGTTGACAAGAATCCTCACAATACCGCAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTCAAT
 TTTCTAGGGGGAACCTACCGTGTGTCTTGGCCAAAATTTCGCAGTCCCCAACCTCCAATCAC
 TCACCAACCTCCTGTCTCCAACTTGTCTGGTTATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGTTTT
 ATCATCTTCCTCTTCATCTGCTGCTATGCCTCATCTTCTTGTGGTTCTTCTGGACTAT
 CAAGGTATGTTGCCCCTTGTCTCTAATTCCAGGATCTTCAACTACCAGCACGGGACCA
 TGCAGAACCTGCACGACTCCTGCTCAAGGAACCTCTATGTATCCCTCCTGTTGCTGTACC
 AAACCTTCGGACGGAAATTGCACCTGTATTCCCATCCCATCATCTTGGGCTTTCGGAAAA
 TTCTATGGGAGTGGGCCTCAGCCCGTTTCTCTTGGCTCAGTTTACTAGTGCCATTTGTT
 CAGTGGTTTCGTAGGGCTTTCCTCCACTGTTTGGCTTTCAGTTATATGGATGATGTGGTAT
 TGGGGGCCAAGTCTGTACAGCATCTTGAAGTCCCTTTTTACCGCTGTTACCAATTTCTTT
 TGTCTTTGGGTATACATT

>3

ATGGAGAACATCACATCAGGATTCCCTAGGACCCCTGCTCGTGTTACAGGCGGGGTTTTTC
 TTGTTGACAAGAATCCTCACAATACCGCAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTCAAT
 TTTCTAGGGGGAACCTACCGTGTGTCTTGGCCAAAATTTCGCAGTCCCCAACCTCCAATCAC
 TCACCAACCTCCTGTCTCCAACTTGTCTGGTTATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGTTTT
 ATCATCTTCCTCTTCATCTGCTGCTATGCCTCATCTTCTTGTGGTTCTTCTGGACTAT
 CAAGGTATGTTGCCCCTTGTCTCTAATTCCAGGATCTTCAACTACCAGCACGGGACCA
 TGCAGAACCTGCACGACTCCTGCTCAAGGAACCTCTATGTATCCCTCCTGTTGCTGTACC
 AAACCTTCGGACGGAAATTGCACCTGTATTCCCATCCCATCATCTTGGGCTTTCGGAAAA
 TTCTATGGGAGTGGGCCTCAGCCCGTTTCTCTTGGCTCAGTTTACTAGTGCCATTTGTT
 CAGTGGTTTCGTAGGGCTTTCCTCCACTGTTTGGCTTTCAGTTATATGGATGATGTGGTAT
 TGGGGGCCAAGTCTGTACAGCATCTTGAAGTCCCTTTTTACCGCTGTTACCAATTTCTTT
 TGTCTTTGGGTATACATT

>2

ATGGAGAACATCACATCAGGATTCCCTAGGACCCCTGCTCGTGTTACAGGCGGGGTTTTTC
 TTGTTGACAAGAATCCTCACAATACCGCAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTCAAT
 TTTCTAGGGGGAACCTACCGTGTGTCTTGGCCAAAATTTCGCAGTCCCCAACCTCCAATCAC
 TCACCAACCTCCTGTCTCCAACTTGTCTGGTTATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGTTTT
 ATCATCTTCCTCTTCATCTGCTGCTATGCCTCATCTTCTTGTGGTTCTTCTGGACTAT
 CAAGGTATGTTGCCCCTTGTCTCTAATTCCAGGATCTTCAACTACCAGCACGGGACCA
 TGCAGAACCTGCACGACTCCTGCTCAAGGAACCTCTATGTATCCCTCCTGTTGCTGTACC
 AAACCTTCGGACGGAAATTGCACCTGTATTCCCATCCCATCATCTTGGGCTTTCGGAAAA
 TTCTATGGGAGTGGGCCTCAGCCCGTTTCTCTTGGCTCAGTTTACTAGTGCCATTTGTT
 CAGTGGTTTCGTAGGGCTTTCCTCCACTGTTTGGCTTTCAGTTATATGGATGATGTGGTAT
 TGGGGGCCAAGTCTGTACAGCATCTTGAAGTCCCTTTTTACCGCTGTTACCAATTTCTTT
 TGTCTTTGGGTATACATT

>1

ATGGAGAACATCACATTAGGATTCCCTAGGACCCCTGCTCGCGTTACAGGCGGGGTTTTTC
 TTGTTGACAAGAATCCTCACAATACCGCAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTCAAT

TTTCTAGGGGGAGCTACCGTGTGTCTTGGCCAAAATTCGCAGTCCCCAACCTCCAATCAC
TCACCAACCTCCTGTCCTCCAACCTTGTCTGGTTATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGTTTT
ATCATATTCTCTTCATCCTGCTGCTATGCCTCATCTTCTTGGTTGGTTCTTCTGGACTAT
CAAGGTATGTTGCCCCTTTGTCTCTAATTCCAGGATCTTCAACTACCAGCACGGGACCA
TGCAGAACCTGCACGACTCCTGCTCAAGGAACCTCTATGTATCCCTCCTGTTGCTGTACC
AAACCTTCGGACGGAAATTGCACCTGTATTCCCATCCCATCATCCTGGGCTTTCGGAAAA
TTCCTATGGGAGTGGGCCTCAGCCCGTTTCTCCTGGCTCAGTTTACTAGTGCCATTTGTT
CAGTGGTTTCGTAGGGCTTTCCCCCACTGTTTGGCTTTTAGTTATATGGATGATGTGGTAT
TGGGGGCCAAGTCTGTACAGCATCTTGAGTCactTTacACCGCTGTTACTAATTTCTGT
TGTCTTTGGGCATACATT

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Mert Ahmet	Soyadı	Kuşkucu
Doğ.Yeri	Adana	Doğ.Tar.	02.10.1979
Uyruğu	Türkiye Cumhuriyeti	TC Kim No	
Email	mk@genomed-biotech.com	Tel	0 533 318 37 98

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji ABD	Devam Ediyor
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji ABD	2002
Lisans	İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ABD	2000
Lise	Üsküdar Burhan Felek Lisesi	1996

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok İyi	Çok İyi	Çok İyi		

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
İşletim Sistemleri (Windows Tüm Sürümleri, Mac OS, Unix, Linux)	Çok İyi
Java, JSP	İyi
Visual Basic, C++	Başlangıç
Ofis Programları	Çok İyi
DNA Analiz Programları (Multiple Aligment, Filogenetik Karşılaştırma, Fragman Analizi ve Genotip analiz Programları)	Çok İyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Mert Ahmet Kuşkucu (2002): Kronik hepatit B ile infekte kişilerde X geni, prekor/kor bölgelerindeki mutasyonların araştırılması · · 77 sayfa Master Tezi

Ergün M.A., M.Y. Karaoğuz, A. Biri, E. Pala ve **M. Kuşkucu**, (2006) : “An early prenatal diagnosis of a 69,XXY case using Quantitative Fluorescent PCR (QF-PCR) in uncultured amniocytes”, Korean J. Genet., 28, 71-74 .

G. Yılmaz, K. Midilli, S. Türkoğlu, Z. Bayraktaroğlu, **A. Kuşkucu**, E. Özkan, L. Atasever, S. Çalangu, K. Altaş. (2006): Genetic subtypes of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in Istanbul, Turkey. International Journal of Infectious Diseases, 10(4): 286-290

Güvenç MG, Midilli K, Ozdoğan A, Inci E, Tahamiler R, Enver O, Sirin G, Ergin S, **Kuşkucu M**, Divanoğlu EO, Yılmaz G, Altas K. (2007): Detection of HHV-8 and HPV in laryngeal carcinoma. Auris Nasus Larynx.

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

Balık Tutmak

Kitap Okumak