

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ  
ANABİLİM DALI

**SERUMDA HEPATİT B VİRUS DNA  
KANTİTASYONU İÇİN “REAL-TIME” PCR  
TESTİ GELİŞTİRİLMESİ**

**MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ  
ANABİLİMDALI  
UZMANLIK TEZİ**

**DR. GÜNEŞ ÖZÇOLPAN**

**İZMİR-2009**

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ  
ANABİLİM DALI

**SERUMDA HEPATİT B VİRUS DNA  
KANTİTASYONU İÇİN “REAL-TIME” PCR  
TESTİ GELİŞTİRİLMESİ**

**MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ  
ANABİLİMDALI UZMANLIK TEZİ**

**DR. GÜNEŞ ÖZÇOLPAN**

**DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ**

**PROF. DR. A. ARZU SAYINER**

**İZMİR-2009**

Bu araştırma DEÜ Araştırma Fon Saymanlığı Tarafından 2006.KB.SAG.039 sayı ile desteklenmiştir

## **TEŐEKKÜR**

**Sevgili danıőmanım Arzu Sayınır hocam'a ve yetiőmemde emekleri olan tüm hocalarıma saygılarımı sunuyorum. Aileme ve sevgili arkadaşlarıma destekleri için çok teőekkür ederim.**

## İÇİNDEKİLER

TABLO DİZİNİ.....	i
ŞEKİL DİZİNİ.....	ii
KISALTMALAR.....	iv
1. ÖZET.....	1
2. SUMMARY.....	4
3. GİRİŞ VE AMAÇ.....	7
4. GENEL BİLGİLER.....	8
4.1. Tarihçe.....	8
4.2. Sınıflandırma.....	9
4.3. HBV'nin kanda bulunan partikülleri.....	12
4.4. HBV'nin viriyon yapısı ve genom organizasyonu.....	14
4.5. Replikasyon.....	17
4.5.1. Virüsün hücre içine girmesi .....	17
4.5.2. Çekirdekte çift iplikli DNA'nın tamamlanması.....	19
4.5.3. Pregenomik ve subgenomik RNA'ların sentezi ve enkapsidasyon sinyali.....	19
4.5.4. Viral kapsidin sentezi ve genomun replikasyonu.....	21
4.5.5. Diğer viral proteinlerin sentezi.....	22
4.5.6. Zarfın kazanılması ve hücreden salınma.....	24
4.6. Subtip ve genotipler.....	26
4.7. Mutant viruslar.....	29
4.7.1. Precor bölgesi mutasyonları .....	29
4.7.2. Core promoter bölgesi mutasyonları.....	30
4.7.3. S geni mutasyonları .....	30
4.7.4. P geni mutasyonları.....	31
4.7.5. X geni mutasyonları .....	32
4.8. Virusun dayanıklılığı.....	33
4.9. Epidemiyoloji.....	33
4.9.1. Bulaşma yolları.....	33

4.9.2. Dünyada HBV enfeksiyonu.....	35
4.9.3. Türkiye’de HBV enfeksiyonu.....	37
4.10. Klinik belirti ve bulgular.....	38
4.10.1. HBV enfeksiyonunun seyri.....	38
4.10.2. HBV enfeksiyonunun klinik tabloları.....	39
4.11. Tanı.....	42
4.11.1. Serolojik tanı.....	42
4.11.2. HBV DNA testleri.....	43
5. GEREÇ VE YÖNTEM.....	47
5.1. Gereç.....	47
5.1.1. Ayraçlar.....	47
5.1.1.1. Viral nükleik asit ekstraksiyon kiti.....	47
5.1.1.2. Kullanılan öncül ve problemlerin, dizileri ve hedef bölgeleri..	47
5.1.1.3. Gerçek zamanlı PZT miksi ve cihazı.....	48
5.1.1.4. Klonlamada kullanılan kit ve ayraçlar.....	48
5.1.1.5. Plazmid ekstraksiyon kiti.....	48
5.1.1.6. Ticari kantitatif gerçek zamanlı PZT kiti.....	48
5.1.1.7. Kalite kontrol serum örnekleri.....	48
5.1.1.8. Agaroz jel görüntüleme için kullanılan ayraçlar.....	49
5.2. Yöntem.....	49
5.2.1. İnternal kontrolün belirlenmesi.....	49
5.2.2. “In-house” gerçek zamanlı kantitatif PZT testinin tasarlanması...50	
5.2.2.1. HBV PZT için hedef bölge seçimi.....	50
5.2.2.2. Çalışma programının optimize edilmesi .....	50
5.2.3. Kantitasyon standardının oluşturulması için klonlama çalışması...52	
5.2.3.1. Ligasyon öncesi.....	52
5.2.3.2. Ligasyon.....	53
5.2.3.3. Transformasyon.....	53
5.2.3.4. Seçilen koloniler ile PZT.....	54
5.2.3.5. Plazmid standardın kantitatif değerinin belirlenmesi.....	55
5.2.4. “In-house” testin validasyonu.....	56
5.2.4.1. Testin doğrusallığı (“Linearite”).....	56

5.2.4.2. Testin analitik duyarlılığı (saptama alt sınırı).....	57
5.2.4.3. Testin tekrarlanabilirliği (“precision”).....	57
5.2.4.4. HBV genotiplerinin viral DNA kantitasyonuna etkisi.....	57
5.2.4.5. Testin doğruluğu (“accuracy”).....	58
5.2.4.6. Hasta örnekleri kullanılarak, “in-house” testin standart testle karşılaştırılması.....	58
5.2.4.7. Yalancı pozitifliğin değerlendirilmesi .....	59
5.2.5. Maliyet analizi.....	59
<b>6. BULGULAR.....</b>	<b>60</b>
6.1. Teste girecek internal kontrolün miktarının belirlenmesi.....	60
6.2. Çalışma programının optimize edilmesi.....	60
6.3. Plazmid standartın kantitatif değerinin belirlenmesi.....	61
6.4. “In-house” testin validasyonu.....	62
6.4.1. Doğrusallık (“Linearite”).....	62
6.4.1.1. “OptiQuant HBV DNA Quantification Panel” ile doğrusallık.....	62
6.4.1.2. Plazmid standartları ile doğrusallık.....	63
6.4.1.3. Doğrusallıkta uç noktalarının belirlenmesi .....	63
6.4.2. Analitik duyarlılık (saptama alt sınırı).....	64
6.4.3. Tekrarlanabilirlik (“precision”).....	64
6.4.4. HBV genotiplerinin viral DNA kantitasyonuna olan etkisinin belirlenmesi.....	64
6.4.5. Doğruluk (“accuracy”) .....	69
6.4.6. Hasta örnekleri kullanılarak standart testle yeni testin karşılaştırılması.....	70
6.4.7. Yalancı pozitifliğin değerlendirilmesi.....	71
6.5. Maliyet analizi.....	72
<b>7. TARTIŞMA.....</b>	<b>73</b>
<b>8. KAYNAKLAR.....</b>	<b>78</b>

## TABLO DİZİNİ

<b>Tablo 1: Orthohepadnaviridae ve avihepadnaviridae'nin farklılıkları.....</b>	<b>10</b>
<b>Tablo 2: HBV'nin kodladığı proteinler.....</b>	<b>16</b>
<b>Tablo 3: HBV genotip ve subtiplerinin coğrafi dağılımı.....</b>	<b>28</b>
<b>Tablo 4: Ticari nükleik asit tabanlı testlerin dinamik aralıkları.....</b>	<b>46</b>
<b>Tablo 5: QCMD 2007 genotip paneli üyeleri.....</b>	<b>58</b>
<b>Tablo 6: 2007 HBV DNA dış kalite kontrol paneli üyeleri.....</b>	<b>58</b>
<b>Tablo 7: Probit analizinde kullanılan HBV DNA dilüsyonları ve saptanma sayıları.....</b>	<b>64</b>
<b>Tablo 8: “QCMD 2007 Hepatitis B Virus Genotyping HBVG07 Proficiency Programme” genotip paneli örneklerinde beklenen ve elde edilen sonuçlar.....</b>	<b>65</b>
<b>Tablo 9: Yeni testin primer ve problemlerinin GenBank dizileriyle uyumu.....</b>	<b>66-68</b>
<b>Tablo 10: 2007 HBV DNA dış kontrol paneli (QCMD, İngiltere) kullanılarak yapılan doğruluk çalışması sonuçları.....</b>	<b>69</b>
<b>Tablo 11: Hasta örneklerinin ticari test ve yeni test ile HBV DNA kalitatif sonuçları...71</b>	

## ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1: Orthohepadnavirüslerin tam genom dizilerine göre filogenetik ağacı.....	11
Şekil 2: Avihepadnavirüslerin tam genom dizilerine göre filogenetik ağacı.....	12
Şekil 3: Serumda gözlenen HBV partikülleri.....	13
Şekil 4: Serumda gözlenen HBV partiküllerinin elektron mikroskobu ile elde edilen fotoğrafı .....	13
Şekil 5: HBV'nin transkripsiyonel ve transkripsiyonel genom haritası.....	15
Şekil 6: Şematik olarak HBV'nin yapısı.....	16
Şekil 7: a) HBV yüzey antijenlerinin şematik görünümü b) HBV'nin Pre-S gen bölgesinin şematik görünümü.....	18
Şekil 8: Şematik olarak pg RNA.....	20
Şekil 9: PgrNA enkapsidasyon dizisi.....	20
Şekil 10: pgRNA 5' cap bölgesi.....	21
Şekil 11: pgRNA'dan reverse transkripsiyonla negatif DNA iplikçığının sentezlenmesinin şematik görünümü.....	21
Şekil 12: "a" determinantının şematik görünümü.....	23
Şekil 13: Endoplazmik retikulumdan tomurcuklanmış Dane partikülü.....	25
Şekil 14: HBV replikasyon döngüsü.....	26
Şekil 15: G1896A mutasyonu ve e-dizisi üzerindeki yeri.....	30
Şekil 16: Dünyada HBsAg prevalansı haritası.....	36
Şekil 17: 1989-2004 yılları arasında, Türkiye'nin farklı bölgelerindeki HBsAg prevalansı.....	38
Şekil 18: HBV enfeksiyonu evreleri.....	39
Şekil 19: Akut HBV enfeksiyonu.....	40
Şekil 20: Kronik HBV enfeksiyonu.....	41
Şekil 21: Ticari nükleik asit tabanlı testlerin dinamik aralıklarının karşılaştırılması...45	
Şekil 22: Ön deneme çalışmasında elde edilen amplifikasyon eğrileri.....	60
Şekil 23: Yeni testte "OptiQuant HBV DNA Quantification Panel" dilüsyonları çalışıldığında elde edilen amplifikasyon eğrileri ve standart eğri.....	62
Şekil 24: Doğrusallık uç noktalarının belirlenmesi çalışmasında elde edilen amplifikasyon eğrileri ve standart eğri.....	63



<b>Şekil 25: Doğruluk çalışması lineer regresyon analizi grafiği.....</b>	<b>70</b>
<b>Şekil 26: Yüz yetmiş sekiz örneğin ticari test ve yeni test ile elde edilen HBV DNA kantitatif sonuçlarının lineer regresyon analizi grafiği.....</b>	<b>71</b>

## **KISALTMALAR**

**HBV: Hepatit B virusu**

**PZT: Polimeraz zincir tepkimesi**

**“Real-time” PCR: Gerçek zamanlı PZT**

**HCC: Hepatoselüler karsinom**

**DR: “Direct repeats” tekrarlayan bölgeler**

**pg: Pregenomik**

**KC: Karaciğer**

**ORF: “Open reading frame”, açık okuma çerçevesi, protein kodlayan bölge**

**HepaRG: İnsan hepatoma hücre hattı**

**PHH: Primer insan hepatosit hücre hattı**

**PTH: Primer tupaia hepatosit hücre hattı**

## 1. ÖZET

### **Serumda Hepatit B virus DNA Kantitasyonu için “real-time” PCR Testi Geliştirilmesi**

**Dr. Güneş Özçolpan**

**Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi**

**Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji A.D.**

**İnciraltı/İzmir**

**Anahtar sözcükler: Hepatit B virusu, “real-time PCR”, hepatit B virus tanısı, hepatit B virus DNA.**

Hepatit B virusu, dünyada iki milyar kişinin karşılaştığı, bunların 400 milyonunda kronik enfeksiyona yol açmış önemli bir enfeksiyon etkenidir. Ülkemiz, ortalama %5’lik (bölgelere göre %1 - 14,3 arasında değişmektedir) HBsAg pozitifliği ile orta endemisite ülkeleri arasında yer almaktadır.

HBV enfeksiyonunun virolojik tanısı ve izlenmesi, özgül antikörlerin, antijenlerin ve nükleik asidin saptanması ve nükleik asitin kantitasyonu ile yapılmaktadır. HBV DNA’nın kanda gösterilmesi aktif HBV enfeksiyonunun güvenilir bir göstergesidir ve enfeksiyon tanısında, evrelendirilmesinde, tedaviye karar vermede ve tedavi başarısının izlenmesinde önemli rol oynamaktadır. HBV DNA, HBsAg’dan 3-5 hafta önce kanda saptanabildiği için erken tanıda önemli bir parametredir ve kan bankacılığında, donör taramasında kullanımı gündeme gelmiştir.

Günümüzde HBV DNA saptamada, sıklıkla, nükleik asit amplifikasyon testlerinden olan PZT esaslı testler kullanılmaktadır. Kalitatif konvansiyonel PZT testlerine bakıldığında, duyarlılıklarının yüksek olması, tekrarlanabilirliklerinin düşük olması, “carryover” kontaminasyon oranlarının yüksek olması gibi nedenlerle kullanımları sınırlıdır. Gerçek zamanlı PZT yönteminde amplifikasyon sırasında saptama yapıldığından kontaminasyon riski, klasik PZT yöntemine göre daha azdır. Ayrıca amplifikasyon sırasında her döngüde prob sinyali ölçülerek, eşik değeri aşan döngüye (ct) göre kantitatif değer belirlendiğinden, gerçek zamanlı PZT yöntemiyle, klasik PZT yöntemine göre daha doğru kantitatif sonuçlar

elde edilebilmektedir. Dinamik aralığının geniş olması da gerçek zamanlı PZT yönteminin avantajlı yönlerindedir. Böylece kanda geniş bir aralıkta saptanabilen HBV DNA'nın (> 9 logaritma) takibi yapılabilmektedir.

Bu çalışmada, rutin hasta hizmetinde kullanılabilecek, maliyeti ticari testlerden daha düşük, gerçek zamanlı PZT yöntemiyle HBV DNA kantitasyonu yapabilen, internal kontrol içeren, tüm HBV genotiplerini saptayabilen ve ticari kitlerin performansına sahip bir test geliştirilmesi hedeflenmiştir.

Çalışmamızda internal kontrol olarak, insanlarda enfeksiyon yapmayan, zarflı bir DNA virusu olan, hücre kültüründe üretilmiş bovin herpes virus tip 1 (BHV-1) kullanılmış ve örneğe ekstraksiyondan önce eklenmiştir. Böylece yalancı negatifliğe yol açabilecek ekstraksiyon ve amplifikasyon basamaklarındaki sorunlar izlenebilmiştir.

Standart olarak kullanılmak üzere, tez primerleriyle elde edilen ürünü taşıyan plazmid oluşturulmuş ve *Escherichiae coli*' de çoğaltılmıştır. Absolü kantitasyon yöntemi kullanılan testte, her çalışmaya alınan beş adet plazmid dilüsyonu ile elde edilen standart eğri kullanılmıştır.

Yeni testin dinamik aralığı  $5 \times 10^1$  -  $5 \times 10^{10}$  IU/ml ve en düşük saptama sınırı 48 IU/ml (32 – 129) olarak saptanmıştır. Bu parametreler, HBV enfeksiyonu tanısı ve izlemi için uygun bulunmuştur.

Testin tekrarlanabilirliği sonuçların güvenilirliği ve hasta izleminde anlam ifade edecek değişiklik miktarının belirlenmesinde önemlidir. Ct değerleri üzerinden yapılan değerlendirmede, yeni testte % CV değerleri, test içi değerlendirmede % 0,7 - % 4,1; testler arası değerlendirmede % 0,3 - % 1,9 olarak saptanmıştır. Bu değerler ticari testlerle karşılaştırıldığında kabul edilebilir sınırlar içindedir.

A, B, C, D, E, G genotiplerini içeren genotip panelindeki tüm örnekler yeni testle saptanmıştır. Ancak genotip B ve C içeren panel üyelerinde beklenen değer yaklaşık iki logaritma altında kantitatif sonuçlar elde edilmiştir. Bu sorunun nedeni tez süresi sonlandığından aydınlatılamamıştır. Ülkemizdeki çalışmalarda sadece genotip D saptanmaktadır. Bu nedenle yeni testin genotip B ve C'deki kısmi kantitasyon sorununun rutin hizmette soruna yol açmayacağı varsayılabilir.

Doğruluk çalışmasında 2007 HBV DNA dış kalite kontrol panelinin (QCMD, İngiltere) yeni testle çalışılması ile elde edilen sonuçlar, beklenen değerlerle uyumlu olarak saptanmıştır ( $R^2 = 0.92$ ).

Ticari testle HBV DNA pozitif saptanan 180 adet, HBV DNA negatif saptanan 80 adet plazma örneği yeni testle de çalışılmıştır ve her iki test arasındaki uyum değerlendirilmiştir. Kalitatif değerlendirmede, ticari test altın standart olarak alındığında yeni testin duyarlılığı % 99, özđüllüđü % 94 olarak saptanmıştır. Her iki testle de HBV DNA pozitif saptanan örneklere iki testin uyumu lineer regresyon analizi ile değerlendirilmiş, aralarında güçlü ve anlamlı bir korelasyon olduğu saptanmıştır ( $r= 0.86$ ,  $p=0.000$ ,  $R^2=0.74$ ).

Yalancı pozitiflik olasılığını değerlendirmek için HCV RNA pozitif, HBsAg negatif 26 örneğ yeni test ile çalışılmıştır. Tümü HBV DNA negatif saptanmıştır.

Maliyet analizine göre yeni test, ticari teste göre, test başına 45 TL daha ucuzdur. Laboratuvarımızda yılda yaklaşık 1500 HBV DNA testi yapıldığı göz önüne alındığında, yeni testin rutinde kullanılması durumunda elde edilecek yararın yaklaşık 67500 TL/yıl olacağı hesaplanmıştır.

Sonuç olarak, gerçek zamanlı PZT yöntemini kullanan, internal kontrol içeren kantitatif bir HBV DNA testi geliştirilmiştir. Testin duyarlılık, özđüllük, tekrarlanabilirlik ve doğruluk çalışmalarında elde edilen başarılı sonuçlar ve taşıdığı maliyet avantajı, rutinde kullanıma uygun olduğunu göstermiştir.

## **2. SUMMARY**

### **Developing a Real-Time PCR Assay to Determine the Hepatitis B Virus DNA in Serum**

**Dr. Güneş Özçolpan**

**Dokuz Eylul University Faculty of Medicine**

**Microbiology and Clinical Microbiology Department**

**İnciraltı/İzmir**

**Keywords: Hepatitis B virus, “real-time PCR”, hepatitis B virus diagnosis, hepatitis B virus DNA, hepatitis B virus replication**

Hepatitis B virus is an important infectious agent, infected two billion people worldwide and caused chronic infection in 400 millions. Turkey is one of the moderately endemic countries with an average HBsAg positivity rate of 5% (differs between 1 and 14,3 % according to the region).

Virologic diagnosis and follow-up of HBV infection is made by the detection of specific antigens, antibodies and HBV DNA. Presence of HBV DNA in blood is a reliable indicator for active HBV infection and is an important marker for staging and managing the infection and following the success of the treatment. HBV DNA can be determined 3-5 weeks earlier than HBsAg in blood, therefore is useful for the early diagnosis and currently in use for screening of the donors in blood banks.

Nucleic acid amplification assays using PCR method are frequently used for HBV DNA determination. There are some limitations of conventional qualitative PCR assays, such as high sensitivity, low reproducibility and high carryover contamination rates. Real-time PCR method has a lower contamination risk compared to classical PCR since the detection is performed during amplification. In addition, quantitative results of real time PCR is more accurate, because the quantification is made according to the number of the cycle in which the signal crosses the threshold (cycle threshold, ct) by measuring the probe signal in every cycle during amplification. Therefore, real-time PCR has a wider dynamic range of quantification. These advantages make the real-time PCR method ideal tool for HBV DNA

monitoring which fluctates over a wide dynamic range ( $> 9$  logarithma).

The aim of this study was to develop a quantitative real-time PCR assay for HBV DNA that can be used for routine patient management, with a performance similar to commercial assay but with a lower cost. The new assay is expected to have an internal control and to detect all six genotypes of HBV.

An enveloped, cell cultured DNA virus, bovine herpes virus type 1 (BHV-1), which does not infect human, used as an internal control. Internal control added to the patient sample before the extraction in order to monitor the problems of both extraction and amplification steps.

Plasmid standart carrying the amplicon was generated and transfected into *Escherichiae coli*. Absolute quantitation method was used by drawing a standart curve with five plasmid diluents in each run.

Dynamic range of the developed HBV DNA assay was between  $5 \times 10^1$  and  $5 \times 10^{10}$  IU/ml and the limit of detection was 48 IU/ml (between 32 and 129 IU/ml). These parameters were suitable for diagnosis and monitoring of the HBV infection.

Reproducibility of the assay is important in order to determine the reliable differences in HBV DNA levels during the follow-up of the patients. Intra- and interassay CV% values of the developed assay were 0.7- 4.1% and 0.3 - 1.9%, respectively. These values were comparable to commercial assays.

The developed assay was able to detect all the samples of a HBV genotyping panel, containing genotype A, B, C, D and G. However, quantitative results of the samples containing genotype B and C were approximately  $2 \log_{10}$  below the expected value. The cause of this variation could not be determined since primers and probes were designed to detect all the genotypes. It is unlikely that this quantitation problem of the developed assay will cause a major problem in the routine patient service, since D is the only genotype detected in Turkey to date.

The accuracy of the new assay was tested with the QCMD - 2007 HBV DNA proficiency panel. Results were correlated with expected results ( $r^2=0.92$ ).

The correlation of the developed assay and the commercial test used in the routine laboratory was evaluated by 180 HBV DNA positive and 80 HBV DNA negative plasma samples. The sensitivity and specificity were 99% and 94%, respectively, when the commercial assay was accepted as the gold standart. Quantitative results of the samples

detected by two assays (178 samples) showed a strong and significant correlation ( $r=0.86$ ,  $p=0.000$ ,  $R^2=0.74$ ).

No false positivity was detected by the new assay, when 26 HCV-RNA positive, HBsAg-negative samples were tested.

Cost analysis showed that the new assay was 45 TL/test cheaper than the commercial assay. If the annual HBV DNA test number (approximately 1500) taken into account, the benefit would be 67500 TL/year, if the developed assay is used for the routine diagnostics.

As a result, we developed a quantitative real-time PCR assay for HBV DNA. Sensitivity, specificity, reproducibility and accuracy of test results and cost benefit showed that it is convenient for routine use.



### 3. GİRİŞ VE AMAÇ

HBV enfeksiyonu dünyada ve Türkiye’de önemli bir sağlık sorunudur. Dünya nüfusunun üçte biri (iki milyar insan) bu virüsle karşılaşmıştır, yaklaşık 400 milyonu HBV taşıyıcısıdır. Her yıl bir milyondan fazla insan HBV ile ilgili kronik karaciğer hastalıklarından (siroz ve hepatoselüler karsinoma) ölmektedir (3, 52).

HBV enfeksiyonunun virolojik tanısı ve izlenmesi, özgül antikorların, antijenlerin ve nükleik asidin saptanması ve kantitasyonu ile yapılmaktadır. HBV DNA’nın kanda gösterilmesi aktif HBV enfeksiyonunun güvenilir bir göstergesi olup, enfeksiyon tanısında, evrelendirilmesinde, tedaviye karar vermede ve tedavi başarısının izlenmesinde önemli rol oynamaktadır.

HBV DNA saptanması ve kantitasyonunda nükleik asit amplifikasyon yöntemlerinden olan gerçek zamanlı PZT yöntemi sık kullanılmaktadır. Bu yöntem, ışına özelliğine sahip moleküller kullanarak, PZT’yi ampikon oluşurken izleme ve miktar belirleme (kantitasyon) yöntemidir. Klasik PZT’ye üstünlükleri:

- 1) Dinamik aralık, klasik PCR’a göre oldukça geniştir (en az 6 logaritma).
- 2) Hesaplanan viral yük gerçeğe daha yakındır ve tekrarlanabilirliği yüksektir.
- 3) PCR sonrası ürünün saptanması için ek işlem gerekmez. Kontaminasyon riski daha azdır (40).

Çalışmamızda rutin hasta hizmetinde kullanılabilecek, maliyeti ticari testlerden daha düşük, gerçek zamanlı PZT yöntemiyle HBV DNA kantitasyonu yapabilen, tüm HBV genotiplerini saptayabilen ve ticari kitlerin performansına sahip bir test geliştirilmesi hedeflenmiştir.

## 4. GENEL BİLGİLER

### 4.1. Tarihçe

Uzun kuluçka süreli hepatit, serum hepatiti, MS-2 hepatiti ve viral hepatit B olarak isimlendirilen hepatitin etkeni hepatit B virüsü (HBV)'dir.

İlk serum hepatiti olguları, 1833 yılında Bremen'deki tersane işçilerine çiçek aşısı yapılmasının ardından görülmüştür.

19. yy ortalarında kızamık ve kabakulak immunprofilaksisi amacıyla plazma verilen kişilerde, insan serumu içeren sarı humma aşısı yapılanlarda, kontamine iğnelerin kullanıldığı cinsel yolla bulaşan hastalık kliniklerinde tedavi gören hastalarda HBV enfeksiyonu, yaygın olarak saptanmıştır. II. Dünya savaşı sırasında kan transfüzyonu yapılan askerlerde de görülmüştür (59).

1930'larda mahkumlar üzerinde yapılan çalışmalar, "enfeksiyöz/bulaşıcı hepatit" ve "serum hepatiti" etkenleri ile gelişen enfeksiyonların klinik özelliklerinin ayırdedilmesini sağlamıştır.

1943 yılında ABD'de bulaşıcı hepatit "enfeksiyöz hepatit" olarak isimlendirilmiş; aynı yıl İngiltere'de kan, serum ve plazma naklinden sonra gelişen sarılıklar 'homolog serum sarılığı' olarak tanımlanmıştır.

1947 yılında MacCallum, enfeksiyöz hepatit için "hepatit A", serum hepatiti için "hepatit B" deyimlerini kullanmıştır (30).

1960'ların başlarında Krugman ve arkadaşları tarafından özürlü çocuklar üzerinde yürütülen çalışmalar sonucunda epidemiyolojik, klinik ve immunolojik olarak birbirinden farklı iki ayrı hepatit virüsünün varlığı doğrulanmıştır (30).

1965 yılında Blumberg ve arkadaşları tarafından Avustralyalı bir yerlinin serumunda, çok kez transfüzyon yapılmış bir hastanın serumuyla presipitasyon veren bir antijen saptanmıştır ve bu proteine "Avustralya antijeni – Au ag" adı verilmiştir (30). Daha sonra "Avustralya antijeni" , akut hepatit B geçiren bir hastada gösterilmiş ve enfeksiyon için spesifik bir test olduğu bildirilmiştir (52).

1970'de Dane ve arkadaşları tarafından; HBV içeren, kısmen saflaştırılmış örneklerde elektron mikroskopunda üç farklı partikül gözlenmiştir (30). Bunlardan 42 nm çapında ve enfeksiyöz olan partiküllere "Dane partikülü" adı verilmiştir. Dane partikülü yanı sıra, 22 nm

çapında “sferik” ve 22 x 100-200 nm boyutlarında “filamentöz partiküller” de elektron mikroskopunda tanımlanmıştır. Dane partiküllerinin “Avustralya antijeni” serumu ile presipite oldukları saptanmıştır. Dane partikülünün yüzeyinde “Avustralya antijeni” olarak daha önceden tanımlanmış yüzey antijeni ve bir çekirdek antijeni içerdiği gösterilmiştir. Dane partikülünün HBV olduğu anlaşılmıştır (72).

1971 yılında, ısı ile inaktive edilen HBV yüzey antijeni pozitif serumların immunojenik olduğu ve aşı olarak kullanılabileceği Krugman tarafından gösterilmiştir.

1972’de Magnius ve Espmark tarafından HBV “e antijeni” (HBeAg) tanımlanmıştır.

1979’da Pasek ve arkadaşları tarafından, virüsün DNA’sı *Escherichia coli*’ye klonlanarak tam nükleotid dizisi çıkarılmıştır. Ayrıca *Escherichia coli*’den eksprese ettirilen HBcAg, tavşana enjekte edilerek ve antikor yanıtı oluştuğu ve oluşan antikorların insan kaynaklı antijenlerle presipite olduğu gözlenmiştir (56).

Son kırk yıl içinde HBV’nin moleküler biyolojisi, epidemiyolojisi, patogenezi, tanı ve tedavisi ve korunma yolları konularında önemli bilgilere ulaşılmıştır. (52).

#### **4.2. Sınıflandırma**

HBV’nin bulunmasının ardından bazı memeli hayvanlar ve kuşlarda hepatite neden olan farklı yeni virüsler saptanmıştır.

1978 yılında kronik aktif hepatit ve hepatomalı dağ sıçanı otopsilerinde (Marmota monax) sık rastlanan “Woodchuck hepatitis virus” (WHV) adı verilen yeni bir virüs bulunmuştur. Morfolojik olarak insan HBV’sine çok benzeyen WHV’nin, daha sonra yapılan nükleik asit dizi analizlerinde, HBV ile % 60 benzerlik gösterdiği saptanmıştır.

1980 yılında Kuzey California’daki vahşi yer sincaplarından (*Spermophilus beecheyi*) “ground squirrel hepatitis virus” (GSHV) izole edilmiştir. GSHV ve HBV arasında nükleik asit dizi analizine göre % 55 oranında benzerlik saptanmıştır (65).

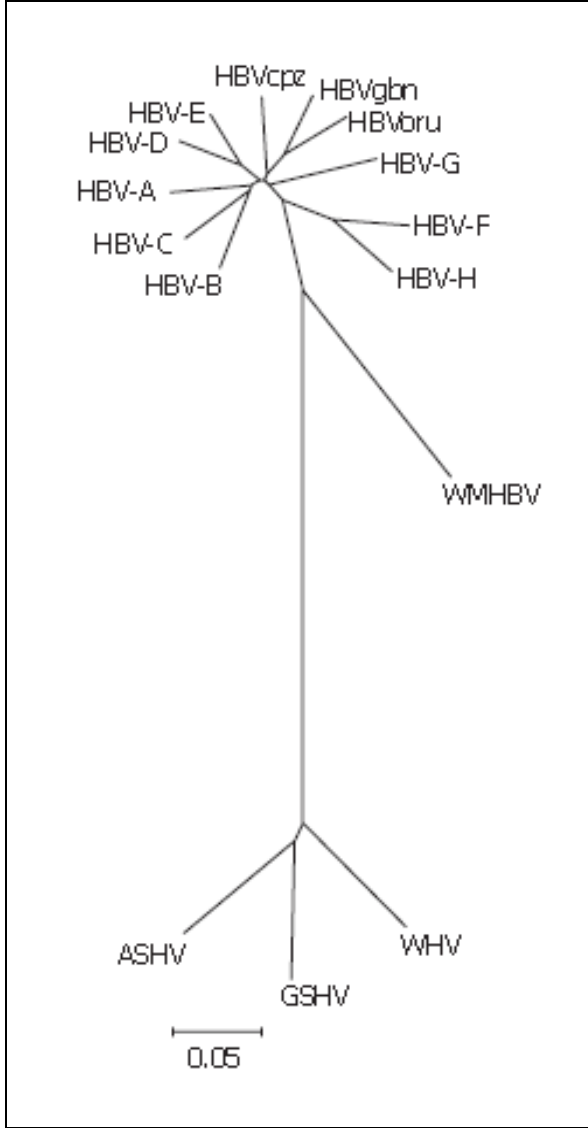
Sonraki yıllarda ABD’de HCC’li Pekin ördeklerinde (*Anas domestica*) “Duck hepatitis B virus” (DHBV)’ un varlığı saptanmış, Virginia, California, İllionis eyaletlerindeki ticari ördek sürülerinde de bu virüse rastlanmıştır. DHBV deneysel olarak evcil kazlara nakledilebilmiştir. Bu virüsler ortak özellikleri nedeniyle hepadnaviridae ailesi olarak aynı çatı altında toplanmışlardır. Hepadnaviridae ailesi:

a) Viriyon büyüklükleri ve morfolojilerinde benzerlikler vardır.

- b) Viriyon DNA büyüklüğü, yapısı ve genetik organizasyonlarında benzerlikler vardır.
- c) Genom replikasyonunda revers transkripsiyon gereklidir.
- d) Pankreas, dalak, böbrek, kemik iliği, kan beyaz küre hücrelerinde viral replikasyon bildirilmiştir ancak bu viruslar karaciğere tropizm gösterirler ve yaşam döngüleri benzerdir.
- e) Kısıtlı konak spektrumuna sahiptirler. Örneğin HBV, insan ve şempanzelerde enfeksiyona yol açar.
- f) Persistan enfeksiyon oluşturabilirler ve hepatosellüler kanser (HCC) ile ilişkilidirler. WHV genellikle, GSHV seyrek olarak kronik hepatit ve HCC'ye neden olurlar.
- g) Enfekte hepatositlerde enfeksiyöz viriyonlarla birlikte kanda yüksek konsantrasyonlarda saptanabilen non-efektif kılıf antijeni içeren partiküller üretirler (30).
- Hepadnaviridae ailesinde bulunan viruslar; konak farklılığı, viriyon yapısı, polipeptid büyüklüğü, gen sayısı, genom nükleotid dizi benzerliği ve antijenik çapraz reaksiyonlar dikkate alındığında, memeli hayvan viruslarının bulunduğu orthohepadnavirus (HBV, WHV, GSHV) ve kanatlı hayvan viruslarının bulunduğu avihepadnavirus (DHBV) olmak üzere iki cins altında sınıflandırılmaktadır.

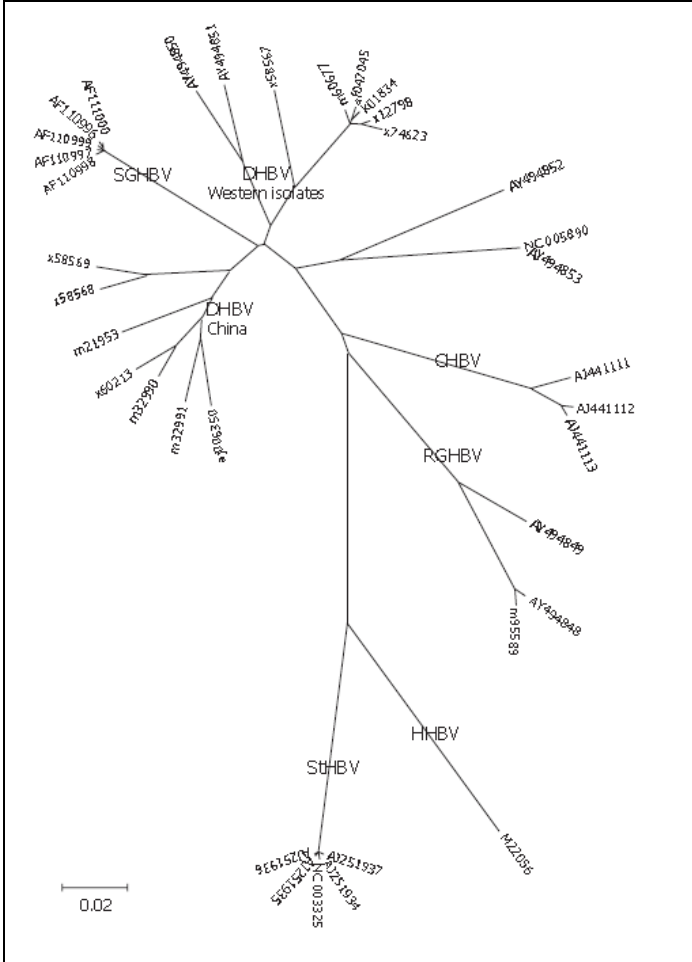
**Tablo 1:** Orthohepadnaviridae ve avihepadnaviridae'nin farklılıkları (30)

<b>Özellik</b>	<b>Orthohepadnavirus (HBV, WHV, GSHV)</b>	<b>Avihepadnavirus (DHBV)</b>
<b>Büyükklük</b>	40 – 42 nm	46 – 48 nm
<b>Genom</b>	3,2 – 3,3 kb	3,0 kb
<b>Genler</b>	S, C, P, X	S, C, P
<b>DNA</b>	Kısmi çift sarmallı	Tamamı çift sarmallı
<b>Konak</b>	Memeli hayvanlar ve insan	Kanatlı hayvanlar



- HBV à Hepatitis B virus
- HBV-A à HBV genotip A
- HBV-B à HBV genotip B
- HBV-C à HBV genotip C
- HBV-D à HBV genotip D
- HBV-E à HBV genotip E
- HBV-F à HBV genotip F
- HBV-G à HBV genotip G
- HBV-H à HBV genotip H
- HBVcpz à Chimpanzee hepatitis B virus
- HBVoru à Orangutan hepatitis B virus
- HBVgbn à Gibbon hepatitis B virus
- WMHBV à Wolly monkey hepatitis B virus
- GSHV à Ground squirrel hepatitis virus
- ASHV à Arctic squirrel hepatitis virus
- WHV à Woodchuck hepatitis virus

**Şekil 1:** Orthohepadnavirüslerin tam genom dizilerine göre filogenetik ağacı (64).



DHBV- Duck hepatitis B virüs  
 GTHBV – Grey Teal hepatitis B virus  
 HHBV – Heron hepatitis B virus  
 MDHBV – Maned Duck hepatitis B virus  
 RGHV – Ross Goose hepatitis virus  
 SGHBV – Snow Goose hepatitis B virus  
 STHBV – Stork hepatitis B virus  
 CHBV – Crane hepatitis B virus

**Şekil 2:** Avihepadnavirüslerin tam genom dizilerine göre filogenetik ağacı (64).

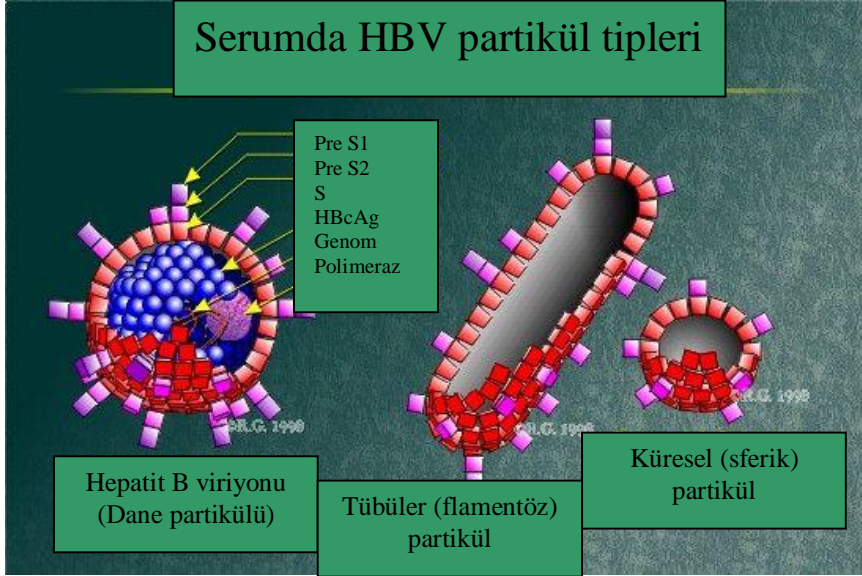
### Hepadnaviridae ailesinde HBV'nin yeri

HBV; Hepadnaviridae ailesinin Orthohepadnavirus cinsinde yer alan, hepatotropik, zarflı, kısmi çift sarmallı çembersel DNA'ya sahip olan bir virüsdür. Genomu 3020-3220 nükleotidden oluşur. Bilinen hayvan virüsleri arasında genom yapısı en küçük olanı HBV'dir. HBV, Hepadnaviridae ailesinde insanlarda enfeksiyon oluşturan tek türdür.

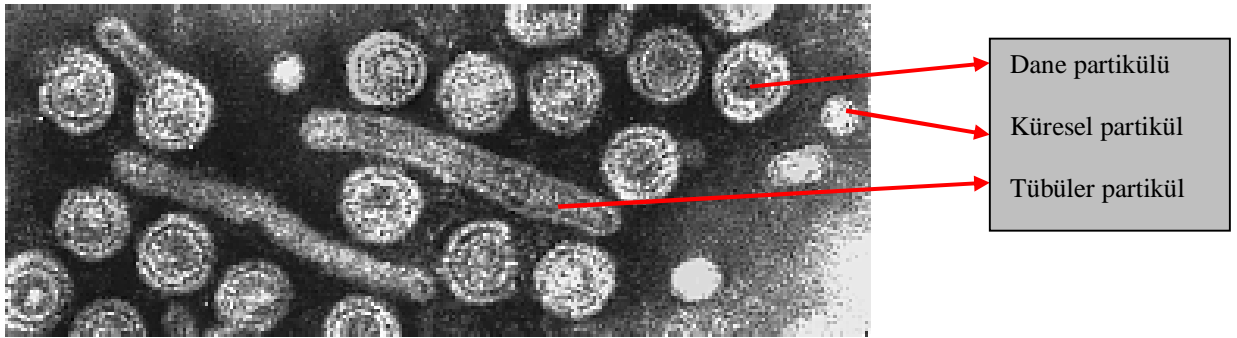
### 4.3. HBV'nin kanda bulunan partikülleri

HBV içeren serumdan hazırlanan preparatlar elektron mikroskopunda incelendiğinde, üç farklı tip partikül gözlenmiştir (25, 60):

- a) Serumda ortalama 42 nm (40-48 nm) çapında, küresel formdaki Dane partikülleri saptanmıştır. Tam bir viriyon yapısında olan Dane partikülleri, enfeksiyözdür. Dane partikülünde:
- Bir adet sirküler, kısmi çift sarmallı DNA, DNA polimeraz ve Rnase H aktiviteli enzim,
  - İkozahedral yapıda, tek bir fosfoprotein (HBcAg) kopyalarından oluşan kapsid,
  - Virüsün kodladığı üç adet protein (HBsAg) ve hücreden kazanılan lipidlerden oluşan zarf bulunur.



Şekil 3: Serumda gözlenen HBV partikülleri (şematik) (<http://biology.kenyon.edu>)



Şekil 4: Serumda gözlenen HBV partiküllerinin elektron mikroskopu ile elde edilen fotoğrafı (<http://web.uct.ac.za>)

- b) Serumda yaklaşık 22 nm (16-25 nm) çapında, içinde nükleik asit bulunmayan, küresel (sferik) partiküller saptanmıştır. Küresel partiküllerin enfeksiyöz olmadıkları bildirilmiştir.
- c) Serumda yaklaşık 22 nm çapında ve 200 nm uzunluğunda, nükleik asit içermeyen, tübüler (filamentöz) partiküller saptanmıştır. Tübüler partiküllerin enfeksiyöz olmadıkları bildirilmiştir.

Her üç partikül de HBsAg adı verilen ve enfekte konak serumunda 100-500 µg/ml düzeylerinde saptanabilen yüzey antijenine sahiptir. Bu partiküller immunojeniktirler ve anti-HBs antikoları ile reaksiyon verirler. Enfeksiyöz olmayan partiküller daha fazla miktarda üretilirler. Serumda Dane partiküllerinin sayısı  $10^4 - 10^{10}$  partikül/ml arasında saptanırken, enfeksiyöz olmayan tübüler partiküller yaklaşık  $10^{11}$  partikül/ml, enfeksiyöz olmayan ve kanda en fazla bulunan küresel partiküller ise  $10^{13}$  partikül/ml veya daha fazla miktarda saptanmaktadır (25, 30, 60).

#### **4.4. HBV'nin viriyon yapısı ve genom organizasyonu**

HBV DNA'nın molekül ağırlığı  $2,3 \times 10^6$  dalton, G+C oranı ise %49'dur. Yaklaşık 3200 nükleotid taşıyan uzun (L veya negatif) ve boyu değişkenlik gösteren (1800 – 2700 nükleotid) kısa (S veya pozitif) iplik olmak üzere iki iplikten meydana gelmiştir. Bu iplikler kısmen çift (yaklaşık %70), kısmen tek (yaklaşık %30) iplikli çembersel genomu oluşturmaktadır. İpliklerde 3' ve 5' uçlar birleşik değildir bu nedenle iplikler aslında lineer moleküllerdir. İki iplik arasında değişen uzunlukta tek iplikli bir bölge vardır.

Viral DNA'nın yapısal bütünlüğü her iki ipliğin 5' uçlarında bulunan koheziv bölgelerden birbirlerine tutunmalarıyla sağlanır. Bu bölgeler 10 – 12 nükleotidlik tekrarlanan dizilerden meydana gelmiş sabit bölgelerdir ve “direct repeats” (DR) olarak adlandırılırlar. HBV genomunda iki adet DR bölgesi vardır: Uzun ipliğin 5' ucu 1826. nükleotidde DR1 içinde, kısa ipliğin 5' ucu 1592. nükleotidde DR2 içinde yer alır.

Negatif ipliğin 5' ucunda, sentez sırasında öncül olarak görev yapan terminal bir protein ; pozitif ipliğin 5' ucunda öncül olarak görev yapan bir RNA oligomeri yer alır. Negatif



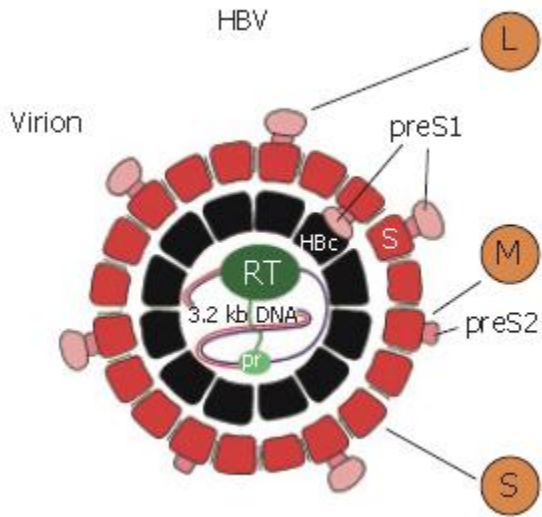


HBV, bilinen hayvan virüsleri içinde en küçük, ancak kendini kodlama kapasitesi en fazla olan virustur çünkü HBV’de protein kodlayan genler üst üste binişik durumdadırlar. En büyük gen olan P geni, S geni ile tamamen, X ve C genleri ile kısmen binişik durumdadır.

S geni, yüzey proteinlerini; C geni, kapsid proteinlerini; P geni, DNA polimerazı; X geni de X proteinini kodlar. S geninde üç (Pre-S1, Pre-S2, S), C geninde iki (Pre-C, C) farklı başlangıç kodonu bulunmaktadır. Bu farklı başlangıç kodonlarından başlanarak sentezlenen proteinler de farklı olmaktadır bu nedenle HBV’ nin dört ORF bölgesi, yedi protein kodlamaktadır (30).

**Tablo 2:** HBV’nin kodladığı proteinler (30)

Gen bölgesi	Nükleotid yerleşimi	Protein	Aminoasit sayısı
Pre-S1	2850-3174	LHBs	389
Pre-S2	3174-157	MHBs	281
S	157-833	SHBs	226
Pre-C	1816-2452	HBeAg	212
C	1903-2452	HBcAg	183
P	2309-1623	DNA pol	832
X	1376-1838	HBxAg	154



**Şekil 6:** Şematik olarak HBV’nin yapısı (21)

## 4.5. Replikasyon

HBV ile enfekte hücreden günde  $10^{11}$ - $10^{13}$  virüs salınır (64). Virüsün plazma yarı ömrünün 4,4 saat olduğu ve hepatosite girdikten sonra replikasyonun 17 saat – 1,5 gün kadar sürdüğü saptanmıştır (45). Vücuttaki virus yükünün yaklaşık %50'si her gün yenilenmektedir (49).

HBV replikasyonu sitopatik olmadığından hücrede belirgin morfolojik değişiklik oluşturmamaktadır (21). HBV ile enfekte hücrelerin yaşam süreleri 10 – 100 gün olduğu belirtilmiştir. Bu değişkenlik virusun hepatoksik olmayıp hücre hasarının immun sistem kaynaklı olmasına bağlanmaktadır (49). HBV'nin tek kanıtlanmış replikasyon bölgesi hepatositlerdir. DHBV ile enfekte ördeklerde yapılan çalışmalarda safra kanalı epitelyum hücreleri, böbrek proksimal tubuler epitelyum hücreleri, pankreasın endokrin adacıkları ve lenfoid doku da enfeksiyon hedefi olabilir ancak hepatosit dışı replikasyon bölgelerinin viral patogeneizde rolü olmadığı düşünülmektedir. Lenfositlerde de virus DNA'sı saptanabilmektedir. Bu durumun fagositoz nedeniyle mi yoksa lenfositlerin virusun replikasyonunda rezervuar olması nedeniyle mi olduğu netlik kazanmamıştır (66).

HBV replikasyonu in-vitro olarak primer tupaia hepatosit (PTH), primer insan hepatosit (PHH) ve insan hepatoma (HepaRG) hücre hatlarında incelenebilmektedir (21).

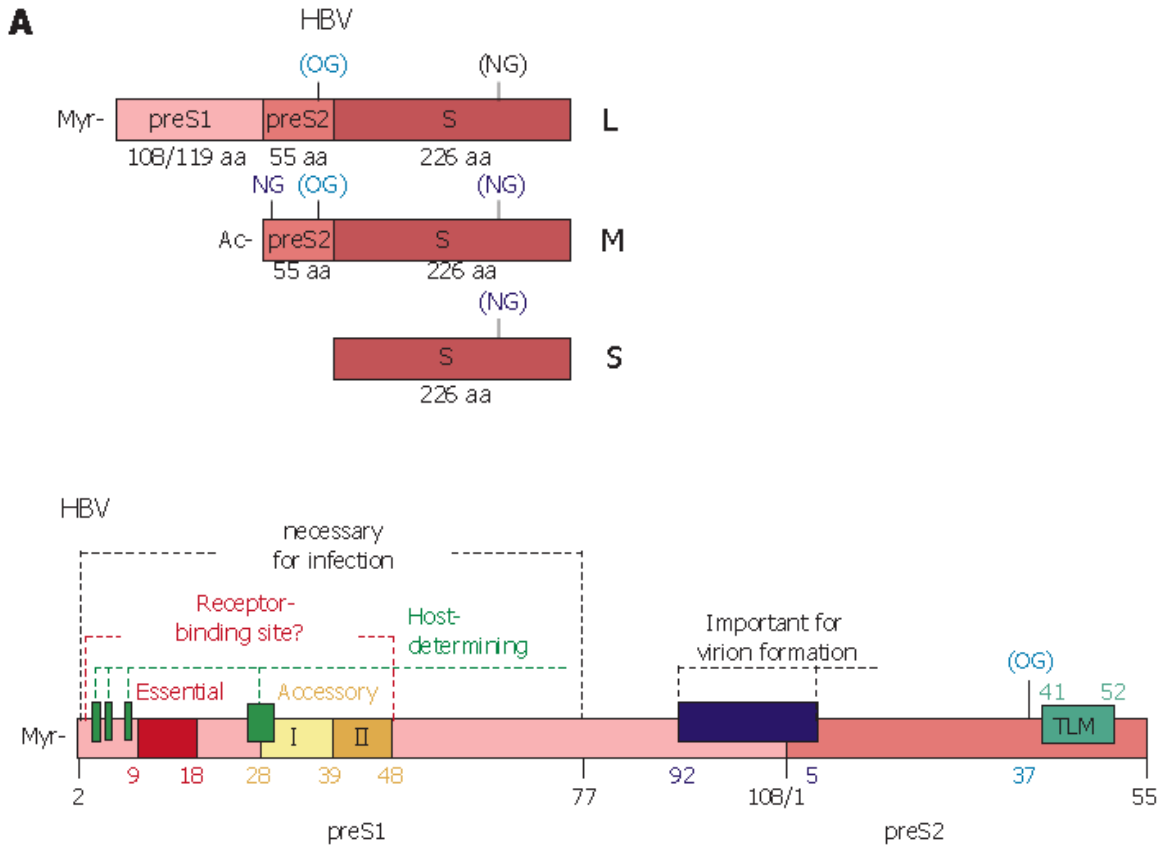
### HBV replikasyonu basamakları:

#### 4.5.1. Virüsün hücre içine girmesi

LHBs Ag ve diğer HBV zarf proteinlerini bağlayan çeşitli hücresele ligantlar tanımlanmıştır. Hücreye tutunmada en etkin işlevi olan viral tutunma ve hücre içine girişte rol alan hepatosit reseptörü henüz bilinmemektedir.

L-HBsAg'nin amino terminalinde bulunan pre-S1 proteini, genotiplere göre değişen 108 ya da 119 aminoasit büyüklüğündedir ve hedef hücreye tutunmada önemli işlevi olan epitopları içerdiği saptanmıştır. Pre-S1 bölgesinde 21-47. aminoasitlerin tutunmada etkin olduğu ve bu bölgenin virüsün HepG2 hücrelerine tutunması için gerekli ve yeterli olduğu saptanmıştır. Bu epitop içerisinde yer alan ve hücreye tutunmada önemli rolü olan QLDPAF dizisi tanımlanmıştır. QLDPAF dizisi birçok viral, bakteriyel ve hücresele proteinlerde bulunan bir bölgedir bu ve benzeri dizileri taşıyan proteinler hücreye tutunma ve membran füzyonu olaylarında görev almaktadır. Bu durum hedef hücrelere bağlanmak için birçok

mikroorganizmanın benzer molekülleri kullandığını düşündürmektedir. HBV'nin organ ve doku özgüllüğünün belirlenmesinde QLDPAF dizisi dışında yer alan pre-S1 kısımlarının da etkili olduğu saptanmıştır. Özellikle Pre-S1 proteininde 9-18. aminoasitlerin virusun hepatosite bağlanması ve enfektivitesinde etkili olduğu gösterilmiştir. L-HBsAg ve M-HBsAg'de bulunan Pre-S2 proteini, 55 aminoasitten oluşur ve serum albuminine bağlanarak hepatosite bağlanmada albumini aracı olarak kullanır. Tüm HBV yüzey antijenlerinde bulunan S proteini 226 aminoasitten oluşur. S proteininin hücreye tutunmada etkili epitoplara içerdiği ancak bu epitoplara hepatosite özgü olmadığı düşünülmektedir (15, 21, 67, 68).



**Şekil 7: A)** HBV yüzey antijenlerinin şematik görünümü

(OG: O-glikozilasyon bölgesi, NG: N-glikozilasyon bölgesi,

Ac: Asetillenme, TLM: Translokasyon motifi)

**B)** HBV'nin Pre-S gen bölgesinin şematik görünümü (66)

#### **4.5.2. Çekirdekte çift iplikli DNA'nın tamamlanması**

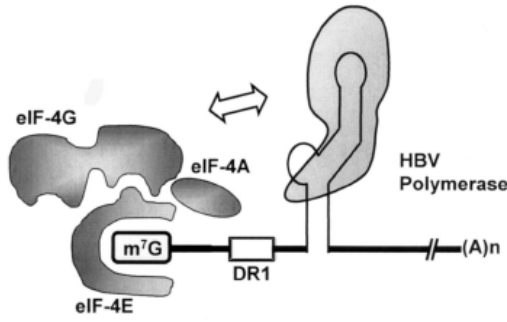
Viral tutunmayı takiben membran füzyonu ile nükleokapsid sitoplazmaya girmektedir. Nükleokapsidin pasif difüzyon veya tübüler taşınım ile çekirdeğe taşındığı düşünülmektedir ancak bu konu tam olarak aydınlanmamıştır (46). Nükleer pora ulaşan nükleokapsidin içindeki gevşek sirküler DNA (relaxed circular DNA = rcDNA) nüklusa geçer. Nükleusta, pozitif iplikçik, 5' ucuna tutunmuş olan kısa RNA dizisinden başlanarak viral polimeraz enzimi tarafından tamamlanır ve polimeraz, oligonükleotid RNA, ve negatif iplikçikteki 8 nükleotidlik fazla diziler molekülden ayrılır. Bu ayrılmaların mekanizmaları tam aydınlanmamıştır (5). Her iki iplikçik 3' ve 5' uçlarından birbirine bağlanır ve kovalan bağlı sirküler DNA (covalently closed circular DNA = cccDNA) yapısı oluşur. cccDNA'dan hücresel RNA polimeraz II enzimi aracılığıyla viral pregenomik RNA ve mRNA'lar oluşturulur. Bu mRNA'lar virus proteinlerinin sentezinde kullanılır. Virüs alımından 24 saat sonra karaciğerde cccDNA varlığı gösterilmiştir. cccDNA oldukça stabil bir yapıdır. Hepatosit içinde DNA giraz ve topoizomerazların etkisiyle süpersarmal oluşturur ve bir mini kromozom halinde kalır. Enfekte hepatositlerde yaklaşık 10 - 100 kopya bulunan cccDNA'nın yarı ömrü 14-50 gün kadardır (52). DHBV ile nefekte edilen PDH (primer duck hepatosit) hücre hattında % 90 hücrede 1-17 adet cccDNA olduğu, kalan % 10' luk hücre grubunda >17 adet cccDNA olduğu saptanmıştır (5). Hepatosit çekirdeğinde oluşturulan cccDNA rezervuarı, HBV enfeksiyonunun persistansında en önemli faktördür (52).

#### **4.5.3. Pregenomik ve subgenomik RNA'ların sentezi ve enkapsidasyon sinyali**

Çekirdekte, cccDNA'nın negatif iplikçiğinden hücresel RNA polimeraz II enzimi kullanılarak mRNA'lar sentezlenmektedir. HBV'nin mRNA sentezi dört promoter bölgesi tarafından yönetilmektedir bunlar preC/C, pre-S1, S, X promoter'larıdır. Bu promoter bölgeleri farklı başlangıç kodonlarını kullanarak yedi farklı proteinin sentezlenmesini sağlarlar. Bu bölgelerin aktivitesi, genomdaki enhancer (Enh I ve Enh II) olarak adlandırılan bölgeler tarafından düzenlenmektedir. Hepatositlerde bulunan bazı moleküller, bu bölgelerin güçlü aktivasyonunu sağladığından HBV'nin hepatositlerde daha güçlü replike olduğu düşünülmektedir (52).

Core promoter bölgesi 3,5 kb'lık en büyük RNA olan pregenomik RNA'yı (pgRNA) sentezletir.



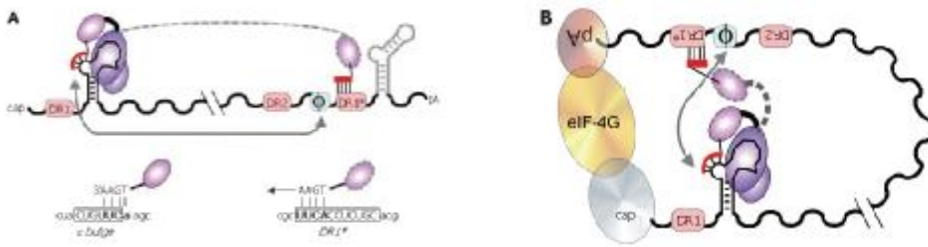


**Şekil 10:** pgRNA 5' cap bölgesi (27)

#### 4.5.4. Viral kapsidin sentezi ve genomun replikasyonu

HBcAg ikişerli olarak bir araya gelerek, disülfid bağları ile stabilize olur. Bu birimlerden 180-240 tanesi bir araya gelerek ikozahedral kapsidi oluşturur. E - dizisi ve çekirdek proteinin C-terminali etkileşir ve pgRNA kapsid içine yerleşir. pgRNA'dan revers transkripsiyon ile negatif DNA iplikçığının sentezi, hücre sitoplazmasında, viral kapsid içinde gerçekleşir. E - dizisinin, çekirdek içine bir kopya pgRNA yerleşmesini sağlama görevi yanında viral DNA sentezini başlatmada da görevi vardır (52).

Negatif iplikçığın sentezi için pgRNA'nın 5' ucundaki e - sinyaline tutunan polimeraz enzimi, sinyal dizisi içindeki 5' UUC dizisinden 3 nükleotidlik bir sentez yapar. Polimeraz enzimi, sentezlenen 5' GAA dizisi ile beraber 3' ucundaki DR1 dizisine taşınır ve revers transkripsiyonla negatif iplikçik sentezi buradan devam eder.



**Şekil 11:** pgRNA'dan reverse transkripsiyonla negatif DNA iplikçığının sentezlenmesinin şematik görünümü (5)

Sentez sırasında enzimin C-terminalinde bulunan RNazH bölgesi, pgRNA yıkımını da gerçekleştirir. Ancak enzimin revers transkriptaz ve RNazH aktiviteleri gösteren katalitik bölgeleri arasındaki 18 nükleotidlik mesafe nedeniyle pgRNA'nın 5' ucundaki 18 baz

yıkılmaz ve sentezlenen negatif iplikçiğe bağlı olarak kalır. DR1 dizisi ve üzerindeki bu oligonükleotid RNA, pozitif iplikçik sentezi için öncül olarak kullanılır. Pozitif iplikçik sentezi, kapsid içine yerleştikten sonra çekirdek proteinleri ve polimeraz proteininin etkileşimi ile başlar (52). Negatif iplikçiğin 5' ucundaki DR1 bölgesindeki öncül ve polimeraz enzimi, iplikçiğin katlanmasıyla 3' ucundaki DR2 bölgesine taşınır ve pozitif iplikçik sentezi buradan başlar.

Pozitif iplikçiğin sentezi tamamlanmaz ve eksik olarak kalır. Pozitif iplikçiğin boyu değişkendir ve kapsidin zarflanma zamanı ile ilişkilidir. Zarf yapısı dNTP geçişine izin vermediğinden kapsid içindeki dNTP miktarı pozitif iplikçiğin boyunu belirler (5). Her iki iplikçik 5' uçlarından kovalan bağlarla bağlanır ve rcDNA sentezi tamamlanmış olur (52).

HBV'nin viral polimerazı, aminoasit dizilimi ve fonksiyon açısından retroviral revers transkriptaz enzimine benzemektedir. Her iki enzim de viral çekirdek içinde aktivite gösterir. Hepadnavirus revers transkriptazı DNA sentezi için, kendisini bir protein primeri olarak kullanır. Bu özellik hepadnavirüslere özgü bir durumdur (5, 16, 52).

HBV integraz içermemektedir; genomu çekirdekte cccDNA formunda, epizomal olarak bulunur. HBV'nin replikasyonu için mutlaka revers transkripsiyon gereklidir. Hücre içinde otonom bir epizom olarak bulunan cccDNA, konak hücre enzimlerini kullanarak replikasyonu başlatabilmektedir. Kronik HBV enfeksiyonunda viral DNA'nın konak genomuna entegre olduğu da gösterilmiştir. Bu entegrasyonun karsinogenezde önemli olduğu fakat halkasal biçimini kaybeden genomun replikasyon potansiyelinin azaldığı bildirilmiştir (52).

#### **4.5.5. Diğer viral proteinlerin sentezi**

##### **Yüzey (zarf) proteinleri (HBsAg):**

2,1 kb ve 2,4 kb'lik subgenomik mRNA'lardan üç farklı yüzey proteini sentezlenmektedir. Bunlar: büyük (L-HBsAg), orta (M-HBsAg) ve küçük (S-HBsAg), yüzey proteinleri olarak adlandırılmaktadırlar. Yüzey proteinleri nükleokapsidin zarf kazanması için gereklidir. Her üç yüzey proteini de glikozillenmiştir.

Dane partikülünde üç tip yüzey proteini de yer almaktadır. L-HBsAg ve M-HBsAg Dane partikülünde eşit miktarda bulunurlar ve toplamda %30'luk kısmı oluştururlar. S-HBsAg, Dane partikülünde en fazla bulunan yüzey partikülüdür.

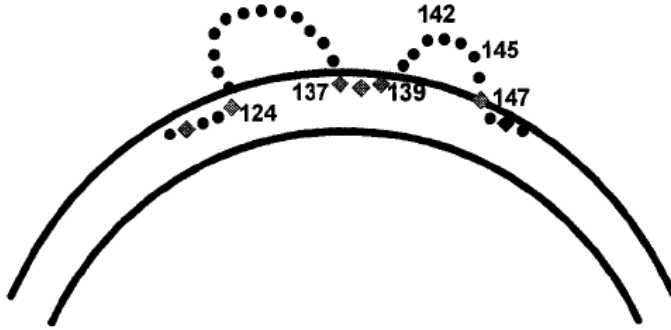
S-HBsAg, virion için gerekenden 100 kat fazla sentezlenmektedir ve enfekte hücreden salınmaktadır. S-HBsAg, M-HBsAg ile birlikte filamentöz partikülleri, yalnız başına ise sferik



partikülleri oluşturmaktadır. Enfekte kişilerde fazla miktarda kana salınan sferik ve filamentöz partiküller antikorlarla kompleks oluşturarak ve immun kompleks sendromlarına neden olabilmektedirler (52).

L-HBsAg, çekirdek proteini ile etkileşerek pgRNA ve polimeraz enziminin paketlenmesini ve sitozol membranından tomurcuklanmayı sağlamaktadır. Hücreden dışarı salınamayan L-HBsAg, fazla miktarda sentezlendiğinde birikerek, patolojik kesitlerde buzlu cam görüntüsüne yol açmaktadır. Buzlu cam hücrelerinde endoplazmik retikulum içinde filamentöz formda L-HBsAg birikimi olduğu gösterilmiştir (52). HBV replikasyonu sırasında L-HBsAg endoplazmik retikulum zarına transmembranöz olarak yerleşmektedir. İç kısımda kalan LHBsAg dizileri nükleokapsidin zarf kazanmasını sağlamakta, dış tarafa yerleşen dizileri hepatosit reseptörü olarak görev almaktadır (68).

HBV enfeksiyonu sırasında S-HBsAg'ye karşı oluşan antikorlar enfeksiyonu önlemede yeterli olmaktadır. S-HBsAg proteininin 120-147. aminoasitleri arası "a determinantı" olarak tanımlanır. Bu bölgenin virüs yüzeyinde iki ilmik oluşturduğu tahmin edilmektedir. Nötralizan antikorlar için majör determinantlar ikinci ilmik üzerinde yer almaktadır (139-147. aminoasitler)(41).



**Şekil 12:** a determinantının şematik görünümü (41)

#### Enfektivite proteini (HBeAg):

3.5 kb'lık pregenomik RNA'dan sentezlenmektedir. HBeAg, HBcAg başlangıç kodonunun öncesinde yer alan preC başlangıç kodonundan başlayarak sentezlenmektedir. Pre core bölgesi, HBeAg'yi endoplazmik retikuluma yönlendiren sinyali içermektedir. PreC başlangıç kodonundan başlanarak serntezenen protein, taşıdığı yönlenme sinyali ile endoplazmik retikuluma gider. Endoplazmik retikulumda, konak proteazları, proteinin

karboksi terminalini ayırır ve HBeAg oluşur. HBeAg'nin tam fonksiyonu bilinmemektedir. HBcAg sadece karaciğerde saptanırken HBeAg hücreden dışarı salınır (44). Replikasyon için gerekli olmadığı, konak immun yanıtını virüsle enfekte hücrelerden uzak tutma görevini üstlendiği düşünülmektedir. Konakta immun tolerans gelişimine neden olarak ve kronikleşmeye zemin hazırladığı düşünülmektedir. HBeAg sentezleyemeyen mutant viruslarla olan enfeksiyonlarda daha ağır hepatik hasar görülmesi bu hipotezi desteklemektedir (44). HBeAg, viral DNA sentezi için kalıp olarak kullanılan pgRNA'dan sentezlendiği için HBeAg'nin yüksek miktarda olması dolaylı olarak fazla miktarda pgRNA sentezlendiğini de gösterebilmektedir. Bu nedenle HBeAg aktif replikasyonu göstermekte önemli bir gösterge olarak kullanılmıştır (52).

#### X proteini (HBx):

0.7 kb'lık subgenomik mRNA'dan sentezlenmektedir. Doğal enfeksiyondaki yeri tam bilinmemektedir. İn vitro olarak AP-1, NF- $\kappa$ B gibi sinyal yollarını aktive ettiği ve p53'e bağlandığı bilinmektedir. P53, HBV core promoter'ı transkripsiyonel olarak inhibe ederek, hepatositi HBV'den koruyucu bir görev üstlenmektedir. X proteini p53'e bağlanarak bu etkiyi ortadan kaldırmaktadır. İntrahepatik pürin ve pirimidin metabolizmasını güçlendirerek HBV'nin replikasyonuna katkıda bulunduğu bildirilmiştir (79). Viral genleri ve MHC genlerini aktive ettiği gösterilmiştir. Viral genom transkripsiyonu için X proteinine ihtiyaç duyulmaktadır. HBx birçok promoter bölgeyi aktive etmekte, viral RNA'nın stabilitesini sağlamaktadır. Sitoplazmada mitojenik sinyal yolunu aktive etmekte, çekirdekte transkripsiyon faktörlerini etkileyerek hepatokarsinogenezi desteklemektedir (52).

#### **4.5.6. Zarfın kazanılması ve hücreden salınma**

İçinde DNA sentezi devam eden viral kapsid, endoplazmik retikulumdan geçerken yüzey proteinlerini taşıyan zarfla kaplanmaktadır.

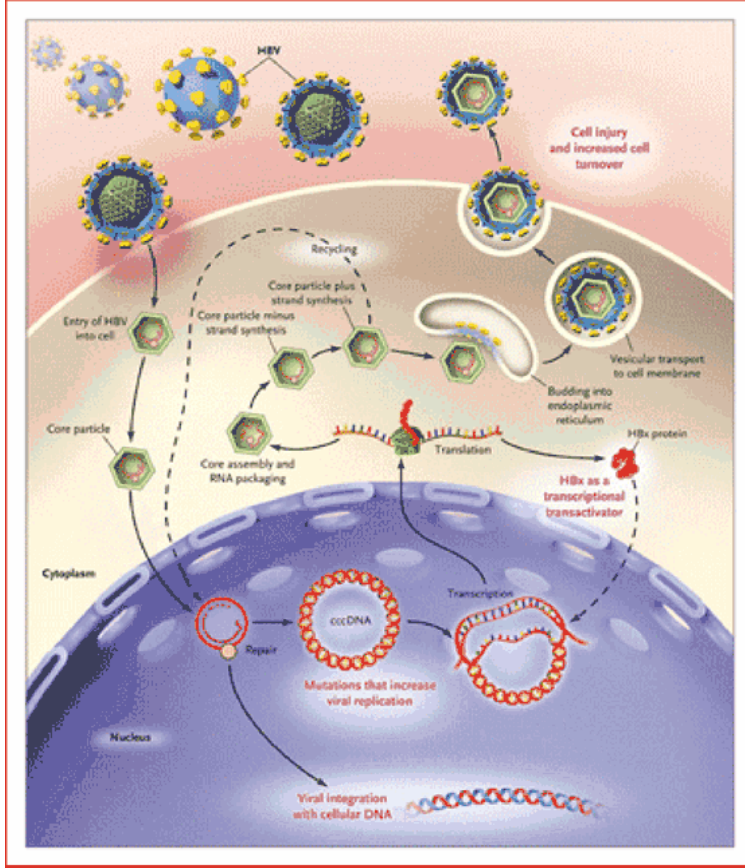


**Şekil 13:** Endoplazmik retikulumdan tomurcuklanmış Dane partikülü (bar: 50 nm) (36)

Zarfin kazanılması için L-HBsAg gereklidir. L-HBsAg endoplazmik retikulum zarına yerleşmektedir, zarın iç kısmında kalan bölümleri çekirdek proteinleri ile bağlanarak virüsün tomurcuklanmasını sağlamaktadır (11).

Her üç yüzey proteinini de içeren zarflı virüsler golgi aygıtına taşınırlar. Burada S-HBsAg'nin bir asparajin rezidüsü glikozillenir ve olgun viriyonlar veziküler transport ile hücre yüzeyine taşınarak salınırlar. Sadece olgun virionlar salınabilmektedir (52, 66).

M-HBsAg ve S-HBsAg, zarf yapısına katılmanın dışında, post endoplazmik retikulum – pre golgi membranından intraselüler ortama ve oradan hücre dışına salınırlar. Oktahedral simetride dizilerek enfeksiyöz olmayan partikülleri oluştururlar. L-HBsAg tek başına eksprese olduğunda hücreden salınamaz ve birikir. S-HBsAg ile birlikte eksprese olduğunda ise doza bağımlı olarak, HBsAg salınımını inhibe eder (11).



Şekil 14: HBV replikasyon döngüsü (76)

#### 4.6. Subtip ve genotipler

HBV, S - HBsAg antijenik determinantlarına göre subtiplere ayrılır. S-HBsAg'nin tüm HBV kökenlerinde ortak olan "a" determinantından başka üç determinanı daha tanımlanmıştır. Bu determinantlar: 122. aminoasitteki "d" (lizin) ya da "y" (arjinin) özgüllüğündeki determinant ve 160. aminoasitteki "w" (lizin) ya da "r" (arjinin) özgüllüğündeki determinant ve "q" determinantlarıdır. "w" determinantının 127. pozisyondaki aminoasite göre dört ayrı tipi bulunmaktadır. Bu determinantların çeşitli kombinasyonlarına toplamda dokuz adet HBV antijenik subtipi tanımlanmıştır. Bunlar: ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adw2, adw4, adrq+, adrq- olarak isimlendirilmişlerdir (52, 41). S geninde olan mutasyonlar, subtip değişikliklerine neden olabilmektedir. Serolojik subtiplerin saptanması enfeksiyon kaynağının belirlenmesinde yardımcıdır. Farklı subtiplerle koenfeksiyon, tüm HBV subtiplerinde ortak olan "a" determinantı nedeniyle nadir olarak görülmektedir (41, 52, 25).

Tüm genom dizisi incelendiğinde; HBV'nin birbirlerinden %8 farklılık gösteren sekiz genotipi tanımlanmıştır. Bunlar: A, B, C, D, E, F, G, H olarak adlandırılmışlardır (64). Antijenik subtipler bir veya daha fazla genotipte olabilir (52).

Serolojik subtiplerin coğrafi dağılımı farklıdır ancak genotipler coğrafi dağılımda subtiplere göre daha belirleyicidir.

Ülkemizde yapılan çalışmalarda genotip D ve subtip ayw2 saptanmıştır (8, 34, 62, 71 ).

Prototip HBV genomu olarak kabul edilen B, C, F ve H genotipleri 3215 bp uzunluğundadır. Diğer genotiplerde delesyon ve insersiyonlar vardır. Örneğin genotip D'de preS1 bölgesinde 33 bp'lik delesyon ile 3182 bp uzunluğundadır. HBV genotip E'de genom, polimeraz geninde 3 nükleotidlik bir delesyon nedeniyle 3212 bp uzunluğundadır. HBV genotip A'da polimeraz geninin terminal proteini kodlayan bölgesinde altı nükleotidlik bir insersiyon nedeniyle genom 3221 bp uzunluğundadır (77).

HBV genotipleri de subgenotiplere ayrılır. Subgenotiplerin genetik dizileri arasında %4'ten fazla farklılık bulunur. Genotip A, B, C, D'de beşer, genotip F'de ise dört subgenotip bildirilmiştir. Birden fazla genotiple oluşan enfeksiyonlar ve bu genotiplerin rekombinasyonları da bildirilmiştir (64).

HBV genotiplerinin coğrafi dağılım farkları dışında klinik seyir ve virülans farkları olduğu düşünülmektedir. Batı Avrupa'da yaygın olan A ve D genotiplerinin araştırıldığı bir çalışmada A genotipine bağlı enfeksiyonlarda, kronikleşme oranının, B genotipine göre daha yüksek olduğu ve A genotipinin daha ağır KC hasarına yol açtığı gözlenmiştir (43). Tayvanda yapılan bir çalışmada B genotipinin 50 yaş altında HCC gelişimi ile, C genotipinin daha ağır karaciğer (KC) hastalığı ile ilişkisi bildirilmiştir (29).

Farklı genotiplerde virusun replikasyon kapasitesitesi de değişebilmektedir. Örneğin anti-HBe pozitif olan HBV genotip B ile enfekte hastalarda, genotip C ile enfekte olan hastalara göre daha düşük viral replikasyon kapasitesi olduğu belirtilmiştir (62).

**Tablo 3:** HBV genotip ve subtiplerinin coğrafi dağılımı  
(\* : nadir görülen serolojik subtip)

<b>Genotip</b>	<b>Subtip</b>	<b>Coğrafi dağılım</b>
<b>A</b>	<b>adw2</b>	Kuzeybatı Avrupa, ABD, Sahara-altı Afrika, Doğu Afrika, Japonya, Filipinler
	<b>ayw1*</b>	Orta Afrika, Kenya
	<b>ayw2</b>	Güney Afrika, Malawi
	<b>adw4</b>	Venezuela
<b>B</b>	<b>adw2</b>	Endonezya, Çin, Japonya
	<b>ayw1</b>	Güneydoğu Asya, Vietnam, Endonezya, Brezilya, Filipinler
	<b>adr*</b>	Venezuela
<b>C</b>	<b>adrq<sup>+</sup></b>	Kore, Çin, Japonya
	<b>adrq<sup>-</sup></b>	Polinezya
	<b>ayr</b>	Vietnam
	<b>adw</b>	Tibet
	<b>adw2</b>	Doğu Asya, Japonya, Filipinler
	<b>ayw2</b>	Tibet
	<b>ayw3</b>	Avustralya (Aborjinler)
	<b>aywr</b>	Japonya
<b>D</b>	<b>ayw2</b>	Afrika, Akdeniz Bölgesi, Hindistan, Tunus, Doğu Avrupa
	<b>ayw3</b>	Akdeniz Bölgesi, Doğu Avrupa
	<b>ayw4*</b>	Orta ve Batı Afrika, ABD
	<b>adw3*</b>	Orta Amerika
<b>E</b>	<b>ayw4</b>	Orta ve Batı Afrika, Nijerya
<b>F</b>	<b>adw4</b>	Fransa, Alaska, Brezilya, Kolombiya, Venezuela
	<b>adw4q<sup>-</sup></b>	Amerika yerlileri, Polinezya
	<b>adw2*</b>	Venezuela
	<b>ayw4*</b>	Venezuela, Orta Amerika
<b>G</b>	<b>adw2</b>	Fransa, ABD
<b>H</b>	<b>adw4</b>	Latin Amerika'nın kuzey kısmı, Orta Amerika ve Meksika

#### **4.7. Mutant viruslar**

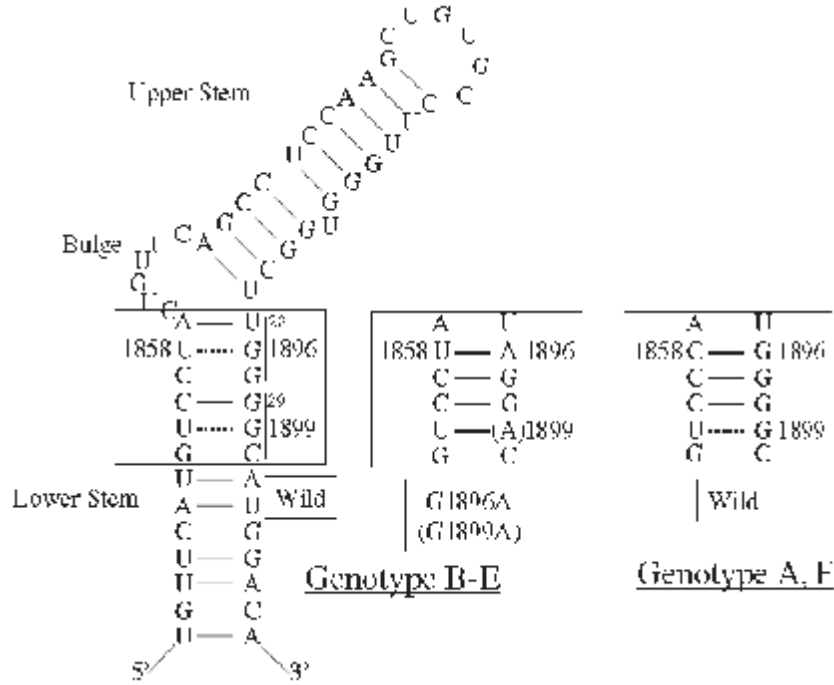
HBV ile enfekte kişilerde enfeksiyon yaşı büyüdükçe, viral popülasyonda mutant virüslerin ortaya çıkmaktadır. HBV'nin mutasyon hızı, her yıl, 10 000 bp için bir nükleotid olarak hesaplanmıştır. Bu mutasyon hızı diğer DNA virüslerinden 10-100 kat fazladır. Bu durum HBV'nin RNA aracısı kullanarak revers transkripsiyonla replike olmasına bağlanmaktadır (52).

Kronik HBV enfeksiyonunda viral replikasyon hızının ve revers transkriptaz enzimi hata oranının yüksek olması, popülasyon içinde mutant kökenlerin zamanla artışına neden olmaktadır. Replikasyon üstünlüğü olan mutant virüsler antiviral tedavi verilmesi durumunda seçilerek yeni koşullara uyum sağlayabilmektedir ve "wild type" virus yerine mutant virus popülasyonu virus havuzunda hakim hale gelebilmektedir (52).

##### **4.7.1. Precor bölgesi mutasyonları**

HBeAg negatif olup ağır KC hastalığı ve aktif viremi olan hastalarda yapılan çalışmalarda bu hastaların bazılarında precore/core geninde 1896. nükleotidin mutasyonu (TGG/TAG) ile stop kodon oluştuğu ve HBeAg sentezinin engellendiği saptanmıştır. HBcAg sentezi bu kodondan sonra başladığı için mutasyondan etkilenmemektedir. "HBeAg negatif" olarak adlandırılan bu varyant virüslerin, fulminan hepatit ve ağır kronik KC hastalarında daha sık saptanmıştır (1, 19, 50, 52).

G1896A mutasyonu aynı zamanda e-dizisini de etkilemektedir. Genotip B, D, E, G ve bazı C genotiplerinde 1858. pozisyonda timin vardır. G1896A mutasyonu olduğunda; mutant nükleotid, 1858. nt ile baz eşleşmesi yaparak e-dizilerinin sekonder yapısını stabil halde tutulabilmekte ve böylece replikasyon etkilenmemektedir. Ancak A, F ve bazı C genotiplerinde 1858. pozisyonda sitozin olduğundan G1896A mutasyonunda baz eşleşmesi olamamaktadır. Replikasyon olabilmesi için bu genotiplerde ikinci bir mutasyonla (C1858T) e-dizileri stabil hale getirilmesi gerekmektedir (69, 79).



**Şekil 15:** G1896A mutasyonu ve e-dizisi üzerindeki yeri (79)

#### 4.7.2. Core promoter bölgesi mutasyonları

HBcAg, pgRNA'dan transkripte edilir (69). A1762T ve G1764A ikili mutasyonunda precore mRNA transkripsiyonu baskılanmakta ve HBeAg salınımı %70 oranında azalmaktadır (69, 79). Bu mutasyonlar aynı zamanda Enh II bölgesinin 3' ucunu da etkilemektedir (4). Bu bölgede daha az sıklıkta C1653T ve T1753V (C/A/G) mutasyonları da görülmektedir (79).

Genotip C'de görülen bazal core promoter bölgesinde 8 bp'lik delesyonlar da viral replikasyonu zayıflatmaktadır (69). Precore mutasyonları, tek başına viral replikasyonu fazla etkilememektedir ancak lamuvidine dirençli mutantlarda ise replikasyon kapasitesinin onarımına katkıda bulunabilmektedir (69).

#### 4.7.3. S geni mutasyonları

S-HBsAg'nin 100 – 169. nükleotidleri arasında kalan bölgesi, major hidrofilik bölge (MHR) olarak bilinmektedir. Bu bölgenin konformasyonel yapısı korunmuş sistein rezidüleri arasındaki disülfid köprüleri aracılığıyla sağlanır. Daha önce de bahsedilen HBV subtiplerinin ayırımında önemli olan nükleotidler de bu bölgede yer alırlar (s122, s127, s160). MHR bölgesi en az beş antijenik bölgeye ayrılmıştır. Bunlar: HBs1 (upstream of aa120), HBs2 (aa 12-123), HBs3 (aa 124-137), HBs4 (aa139-147), HBs5 (aa148-169) (62). HBV'ye karşı nötralizan



antikor yanıtına neden olan “124-147. aminoasitler arası bölgeye a” determinantı denmektedir. Bu bölge tüm subtiplerde oldukça korunmuş bir bölgedir. 145. pozisyonda bulunan glisin, arjinine değişmesiyle sonuçlanan mutasyon (sG145R) viruste büyük antijenik değişikliğe neden olur. HBsAg'nin üç boyutlu yapısı değişerek anti-HBs'nin nötralizan etkisi ortadan kalkar. Rekombinant HBsAg içeren aşı uygulanmış kişilerde HBsAg ve anti-HBs birlikteliği ile görülen bu mutant virüsler, aşı ile indüklendiği için “aşı kaçak mutantları” olarak tanımlanamaktadır. Karaciğer transplantları sonrasında HBV reenfeksiyonu önlemek için uygulanan hepatit B hiperimmunglobulini kullanımı sırasında da 12 ay içinde hastaların %20'sinde “a mutantları” seçilmektedir (52). Antikor etkisinden kaçan bu virüsler “immün kaçak mutantlar” olarak tanımlanmaktadır. “a mutantları”, antijenik yapılarındaki değişiklik nedeniyle HBsAg tanısında kullanılan testlerle yakalanamamaları nedeniyle “tanısal kaçak mutantlar” olarak ta adlandırılmaktadırlar (4, 63).

P ve S genleri üst üste binişik olduklarından; S geninde oluşan mutasyonlar, P genini de etkiler. Aşı veya immün globulin uygulaması ile seçilen “a” mutasyonlarından sG145R ve sP120T, polimeraz enziminde rtT128N ve rtW153Q mutasyonlarına karşılık gelir. Lamuvidine dirençli HBV'nin azalmış in-vitro replikasyon kapasitesi bu mutasyonlarla parsiyel olarak artmaktadır (69).

#### **4.7.4. P geni mutasyonları**

P geni, genomun %80'ini kapsamaktadır ve diğer üç genle ortak olan bölgeleri bulunmaktadır. Kodladığı 90 kDa'luk polimeraz proteini pgRNA'dan sentezletilir. Polimeraz proteininin terminal protein, spacer bölge, revers transkriptaz-DNA polimeraz ve RNazH aktivitelere sahip bölümleri bulunmaktadır (69).

Enzimin revers transkriptaz aktivitesi gösteren C katlantısında yer alan tirozin (Y), metionin (M), aspartat (D), aspartat (D) aminoasitlerinden oluşan bölümü (YMDD motifi) nükleotid bağlayan katalitik bölgesidir.

Revers transkriptaz inhibitörü olan nükleotid/nükleozid analogu ilaçların kullanımından sonra P geni mutasyonları görülmeye başlanmıştır.

Lamuvidin kullanımı ile bu bölgedeki metioninin izolösün veya valine değişmesi (rtM204I veya rtM204V) virüsün replikasyon kapasitesini düşürmektedir. rtM204I mutasyonu olduğunda virusun replikasyon kapasitesi rtM204V mutasyonuna göre daha az etkilenmektedir (69). Lamuvidin ile tedaviye devam edildiğinde rtL80V/I, rtL82M, rtF166L, rtV173L, rtA200V, rtV207I gibi virusun replikasyon kapasitesini arttıran kompensatuvar

mutasyonlar da gelişir (4, 69, 79). En sık saptanan profil, rtL180M + rtM204V; ikinci sıklıkta ise rtL180M + rtM204V + rtV173L mutasyonları birlikteliğidir.

YMDD motifi, tüm rerevers transkriptaz enzimlerinde benzer ve korunmuş olan bir yapıdır. YMDD motifinde metioninin valin veya izolösine değişmesi hem HIV, hem de HBV'de gösterilmiştir (52).

Adefovir, lamuvidine dirençli HBV kökenlerine de etkili olabilmektedir. Adefovir kullanımında direnç, lamuvidin'e oranla daha zor gelişmektedir. Doksan altı hafta kullanımdan sonra %2 direnç oranı bildirilmiştir. Direnci sağlayan; D katlantısında rtN236T, rtI233V, rtR217R; B katlantısında rtA181T/V; A katlantısında rtV84M, rtS85A mutasyonları tanımlanmıştır (69).

Lamuvidin ve adefovirin yanı sıra farklı ilaçlar da HBV enfeksiyonunu tedavide kullanıma başlanmıştır. Bu ilaçların direnç oranları ve direnç profilleri ile ilgili çalışmalar devam etmektedir. Dirence yol açabilecek yeni mutasyonların varlığı araştırılmaktadır (9).

YMDD bölgesindeki mutasyonlar, tamamen üst üste binişik olduklarından S genini de etkiler. Lamuvidin direncine neden olan rtA181T mutasyonunda, HBsAg'de sW172stop değişikliği oluşur ve bu mutasyon nedeniyle HBsAg sekresyonunun ve virusun replikasyon kapasitesinin azaldığı bildirilmiştir. Ancak lamuvidin varlığında virüsün replikasyon kapasitesi onarılmaktadır (78). Antiviral tedavi altında rtM204I mutasyonu ile sW194stop, ve rtV207I mutasyonu ile sW199stop değişiklikleri olduğu bildirilmiştir(69).

#### **4.7.5. X geni mutasyonları**

X geninde olan mutasyonlar transkripsiyonun kontrolünü ve HBx fonksiyonunu etkilemektedir. HBx, serin proteazı inhibe ederek viral transkripsiyonu artırır. Hücre içinde p53 proteinine bağlanır, birçok sinyal yolunu, pürin ve primidin metabolizmasını aktive eder. P53 geninin HBV üzerindeki baskılayıcı etkisini kaldırır (79).

Doğal olarak X geninde mutasyonları olan, fakat replike olabilen virüsler saptanmıştır. X geninin 3' ucunda bulunan Cp/ENII lokusunda 8-20 nt. delesyon olan HBV varyantlarında pre-C promoter aktivitesinin belirgin olarak düştüğü ve HBsAg, HBcAg, HBeAg sekresyonlarında belirgin azalma olduğu saptanmıştır(47).

C promoterda olan ikili mutasyon, nükleotidler çakıştığı için X geninde de nt değişikliğine yol açmaktadır, ancak bunun anlamı henüz anlaşılamamıştır. Bazal core promoter bölgesindeki delesyonların hemen tümünde eksik/kısa HBx sentezine yol açar. Bu

eksik HBx proteinlerinde p53 bağımlı transkripsiyonel baskılama bölgesi kaybolmaktadır. Bu durum HCC oluşum riskini arttırmaktadır (79).

#### **4.8. Virusun dayanıklılığı**

HBV, zarflı bir virus olmasına rağmen düşük PH, ısı, dondurma ve çözmeye dayanıklıdır. Bu özelliği virüsün kişiden kişiye bulaşımını kolaylaşmaktadır.

HBV, 30 - 32°C' de en az altı ay, -20°C' da ise 15 yıl enfektivitesini korumaktadır. Virüs yükü az olduğunda, eter ve asit (PH 2,4) etkisinde altı saatte, 98°C' da bir dakikada veya 60°C' da 10 saatte virus enfektivitesini yitirmektedir. Serum içerisindeki virüsün enfektivitesi, doğrudan kaynatmakla iki dakikada, 121°C'da ve 0,5 atm basınç altında 20 dakikada, 160°C'da kuru sıcak hava ile bir saatte kaybolmaktadır (52). HBV'nin 500 ppm klor solüsyonunda 10 dk.da, % 0,1 - 2 aköz gluteralehid, %70 izopropil alkol, %80 etil alkolde iki dakikada inaktive olduğu gösterilmiştir (25). HBsAg, %2,5 sodyum hipoklorit varlığında üç dakikada antijenitesini ve enfektivitesini yitirmektedir (52).

#### **4.9. Epidemiyoloji**

##### **4.9.1. Bulaşma yolları**

HBV; temel olarak parenteral yolla, enfekte kan ve sıvılarla perkutan ve mukozal temasla, enfekte kişiyle cinsel ilişki ve perinatal yolla bulaşmaktadır (52). Kronik enfekte bireyler bulaştırıcılık açısından etkili gruptur.

##### Parenteral yol:

Enfekte kan ve kan ürünleri uygulamaları, damar içi uyuşturucu kullananlarda ortak kullanılan enjektör ve diğer kesici ve delici aletler aracılığı ile bulaşma, HBV'nin en önemli bulaşma yoludur.

Kan bankalarında vericilerden, HBsAg taranmasına başlandıktan sonra bu yolla bulaşma azalmıştır ancak HBsAg negatif, anti-HBc pozitif kan ve dokuların aktarımı ile de virüsün bulaşabildiği gösterilmiştir (52). Ülkemizde olduğu gibi HBV prevalansının görece yüksek olduğu ülkelerde anti-HBc taranması kan dönörü belirlenmesinde uygun değildir. Kan bankacılığında bulaşın en az düzeye çekilebilmesi amacıyla nükleik asit testlerinin (NAT) kullanımı gündemdedir ancak bu konu üzerinde farklı görüşler mevcuttur. NAT'nin serolojik

testlere oranla daha pahalı oluşu, donanımlı personel ve laboratuvar gerektirmesi gibi nedenler bu testlerin kan bankacılığında kullanımını sınırlamaktadır.

ABD’de 1990’larda yapılan çalışmalarda damar içi uyuşturucu kullananların % 70’inin beş yıl içinde HBV ile enfekte olduğu saptanmıştır. Bu gruptaki bulaşta, en az enjektör ve vb paylaşımı kadar toplumdaki kronik hepatit B prevalansının da etkili bir faktör olduğu belirtilmektedir. Döğme ve akpunktur gibi uygulamalar sonucunda da HBV salgınları bildirilmiştir (70).

#### Cinsel yolla bulaşma:

HBV, cinsel salgılarda bulunmaktadır ve esasen cinsel ilişki ile mukozal giriş kapılarından girerek bulaşmaktadır. Travmatik ilişkilerde ve başka bir cinsel hastalığın bulunması durumlarında HBV bulaşma riski daha da artmaktadır (32).

Yapılan çalışmalarda kronik enfeksiyonlu kişilerle, cinsel ilişkisi olanlarda ev içi cinsel ilişki dışı temaslı bireylere göre daha fazla bulaş oranları bildirilmiştir. Heteroseksüel partner sayısı arttıkça HBV prevalansı da artmaktadır. Homoseksüel ilişkisi olan erkeklerde genel popülasyona göre daha yüksek HBV seroprevalansı bildirilmiştir (70).

#### Anneden bebeğe bulaşma:

Transplasental (anne karnında), perinatal (doğum sırasında) veya postnatal (bebek bakımı veya anne sütü aracılığıyla) bulaş olabilmektedir. Transplasental bulaşma, anneden bebeğe olan bulaşmaların %2’sini oluşturmaktadır (70). Anneden fetusa transplasental olarak sadece HBeAg’nin geçebildiği bilinmektedir. HBsAg genelde plasentadan geçememektedir. Transplasental olarak fetusa geçen HBeAg’nin, fetusta, HBV’ye karşı immuntolerans gelişimine yol açtığı düşünülmektedir (75).

En sık enfekte kan ve sıvılarla doğum sırasında bulaşma olmaktadır. Bebeğe HBV bulaşması, HBeAg pozitif anneden %70-95, HBeAg negatif anneden ise %5-20 oranındadır (70, 75). Bulaşı engellemek amacıyla yenidoğana aşı uygulamasında, koruyuculuk HBeAg negatif annelerin bebeklerinde %100, HBeAg pozitif annelerin bebeklerinde %87 olarak bildirilmiştir (75).

#### Diğer bulaşma yolları:

Aynı evde, yakın yaşama koşullarında da HBV bulaşmaktadır. Özellikle HBV taşıyıcılarının aile bireylerinde saptanan ve diğer bulaşma yollarını söz konusu olmadığı olgularda ortak yaşam koşullarının bulaşmaya neden olduğu düşünülmektedir (14, 52). Bu horizontal bulaşma yolu özellikle, 7-14 yaş grubunda görülen seroprevalans artışından

sorumlu tutulmaktadır (52). Bulaşmada, HBV ile enfekte kişilerin deri hasarı veya lezyonlarının ya da tükürük ve idrarının neden olduğu düşünülmektedir (70). Virusun yüzeylerde yedi gün kadar canlılığını ve enfektivitesini koruması da aseksüel bulaşta kolaylaştırıcı bir faktör olmaktadır. Yapılan bir çalışmada HBeAg pozitif olgularda idrarda HBV DNA pozitifliği %91, anti-HBe pozitif olanlarda %24 oranında bulunmuş ve idrar aracılığıyla bulaşma yoluna dikkat çekilmiştir (31).

#### Sağlık merkezleri aracılı bulaş:

Sağlık personelinde hastaya, hastadan sağlık personeline, hastadan hastaya bulaş olabilmektedir.

Sağlık çalışanlarına aşı uygulamasına başlanmadan önce, ABD’ de her yıl 12.000 sağlık çalışanına hastadan HBV bulaşı olduğu bildirilmiştir (70). Sağlık çalışanına hastadan HBV bulaş riski maruz kalınan virüs miktarının artışı ile doğru orantılıdır. Örneğin HBeAg pozitif hastadan iğne batması ile bulaş riski % 30 iken, HBeAg negatif hastadan bulaş riski % 6 olarak bildirilmiştir (6).

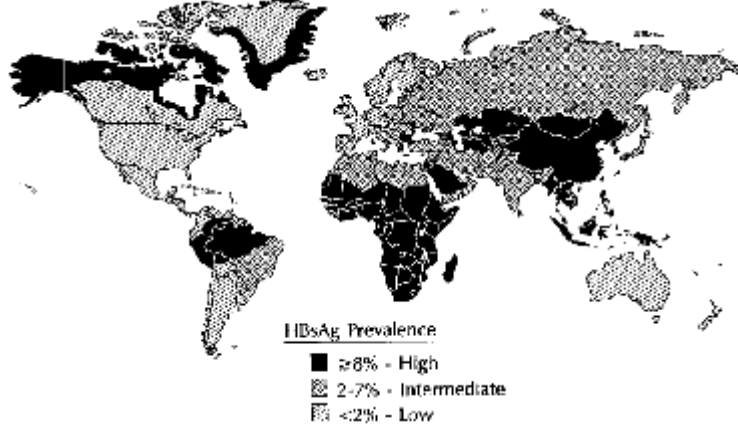
Özellikle gelişmekte olan ülkelerde hastadan hastaya bulaş, önemli bulaş yolları arasına girmektedir. Kontamine ekipmanla hastanın mukozal teması bulaşmada önemlidir. Enfeksiyon kontrol önlemlerindeki eksiklikler, sterilizasyon ekipman eksiklikleri, ekonomik olarak tek kullanımlık ekipman kullanımının yerine çok kullanımlık enjektör ve benzeri ekipman kullanımı gibi nedenler hastadan hastaya bulaşa yol açabilmektedir (70). Birçok ülkenin verilerinin araştırıldığı bir çalışmada dünyada 2000 yılında kontamine enjektörler nedeniyle 21 milyon HBV enfeksiyonu olduğu ve bu rakamın tüm yeni HBV enfeksiyonlarının % 32’sini oluşturduğu bildirilmiştir (23).

Sağlık çalışanından hastaya bulaş nadirdir. Bu yolla bulaşların çoğunun aşı uygulamalarına başlanmadan önceki ve uluslararası enfeksiyon kontrol önlemlerinin uygulanmadığı dönemde, invaziv işlem uygulamaları sırasında olduğu saptanmıştır (48, 70).

#### **4.9.2. Dünyada HBV enfeksiyonu**

Dünyada iki milyar kişi HBV ile karşılaşmış olduğu ve bunların arasından 400 milyon kişinin kronik HBV enfeksiyonu olduğu bildirilmektedir. Her yıl yaklaşık bir milyon kişi siroz ve HCC gibi HBV ilişkili nedenlerle ölmektedirler. Dünyadaki HCC enfeksiyonlarının %60-80’i HBV ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (52).

HBV enfeksiyonunun görülme sıklığı ve esas bulaşma yolu, dünyanın farklı bölgelerinde değişiklik göstermektedir. Ülkeler, HBsAg prevalansına göre üç gruba ayrılmıştır (52).



**Şekil 16:** Dünyada HBsAg prevalansı haritası (41)

### 1) Yüksek endemisite bölgeleri:

HBsAg pozitifliği %8 ve üzerinde olduğu bölgelerdir. Dünya nüfusunun % 45 kadarı bu ülkelerde yaşamaktadır. Çin, Endonezya, Nijerya ve diğer birçok Asya ülkesi, Amazon bölgesi, Pasifik adaları, Avustralya, Afrika ülkeleri, Yeni Zelanda yerlileri ve Alaska bu grupta bulunmaktadır (41).

Yüksek endemisite ülkelerinde, erişkinlerde HBV ile karşılaşma oranı % 70-90 olarak bildirilmektedir (70). Enfeksiyon sıklıkla kronikleşme riskinin yüksek olduğu yenidoğan ve erken çocukluk döneminde kazanılmaktadır. Bu dönemde asemptomatik enfeksiyon geçirilmesi nedeniyle akut hastalık az görülür, kronik KC hastalığı ve HCC riski yüksektir. Bebekler, HBV taşıyıcısı annelerinden doğum sırasında enfekte olmamışsa erken çocukluk döneminde yakın temas ile enfekte olmaktadır (41, 52).

### 2) Orta endemisite bölgeleri:

HBsAg pozitifliği %2-7 arasında olduğu bölgelerdir. Dünya nüfusunun % 43'ü bu ülkelerde yaşamaktadır.

Bu ülkelerde erişkinlerde HBV ile karşılaşma %20-60 olarak bildirilmektedir. HBV ile tüm yaş gruplarında sıklıkla adolesan ve genç erişkin dönemde karşılaşmakta ve bu nedenle akut enfeksiyon görülmektedir. Kronik KC hastalığı sıklığı da yüksektir. Kuzey Afrika ülkeleri, Ortadoğu ülkeleri, Türkiye'nin de yer aldığı Akdeniz havzası, Doğu Avrupa ve Rusya orta endemisite ülkeleri arasında yer almaktadır (41, 52).

### 3) Düşük endemisite bölgeleri:

HBsAg pozitifliği %2'nin altında olduğu bölgelerdir. Dünya nüfusunun %12'si bu ülkelerde yaşamaktadır. ABD, Kuzey ve Batı Avrupa ülkeleri, Avustralya düşük endemisite görülen ülkeler arasındadır.

Bu ülkelerde erişkinlerde HBV ile karşılaşma oranı %20'den az olarak bildirilmektedir. Enfeksiyonların çoğu erişkinlerde ve risk gruplarında görülür. HBV enfeksiyonu için risk grupları, damar içi uyuşturucu kullanıcıları, homoseksüel erkekler, çok eşli heteroseksüeller, hemofili hastaları, hemodiyaliz hastaları, kronik hastalığı olan ve sık invaziv girişime maruz kalanlar, sık kan ve kan ürünleri transfüzyonu yapılanlar, HBV prevalansının yüksek olduğu ülkelere seyahat edenler, sağlık çalışanları ve benzer şekilde mesleki temas riski olanlar, HBV taşıyıcısı kişilerin cinsel eşleri ve aile bireyleri, HBV taşıyıcısı anneden doğan bebekler, ve bakımevlerinde yaşayanlar olarak saptanmıştır (41, 52).

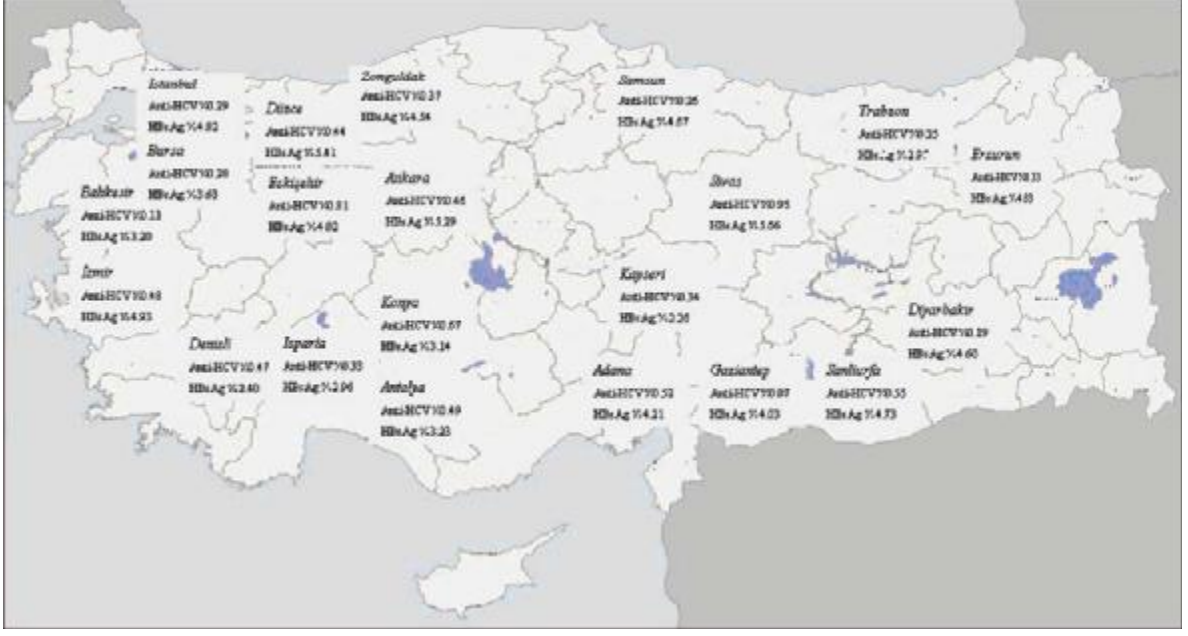
#### 4.9.3. Türkiye'de HBV enfeksiyonu

Ülkemiz orta endemisite ülkeleri arasındadır. Ülkemizde HBsAg pozitifliğinin %1-14,3 arasında değişmekte olduğu gözlenmiştir. İstanbul, İzmir gibi batı illerinde %2 - 4,5 gibi daha düşük oranda HBsAg pozitifliği bildirilmektedir; Diyarbakır, Van, Elazığ gibi Güneydoğu ve Doğu Anadolu illerinde % 8-14,3 oranında HBsAg pozitifliği bildirilmiştir (52).

2005 yılında yayınlanan ve ülkemizin sekiz ayrı bölgesinden, 30 yaş altı 2683 kişide yapılan bir çalışmada; HBsAg %5,4; anti-HBc IgG %17 oranında pozitif bulunmuştur. Güney ve doğu bölgelerde daha yüksek oranlar bildirilmiştir (28).

Trakya bölgesinde yapılan bir çalışmada 0-19 yaş grubunda 717 kişide HBsAg pozitifliği %1,7 bulunmuştur. Bu grupta 10 yaşından sonra HBV enfeksiyon oranının arttığı bildirilmiştir (51).

1989-2004 yılları arasında kan donörlerinde yapılan bir çalışmada, 22 ayrı Kızılay kan merkezinden gelen veriler incelendiğinde; ortalama HBsAg pozitifliği oranı % 4,19 olarak bulunmuştur (22).



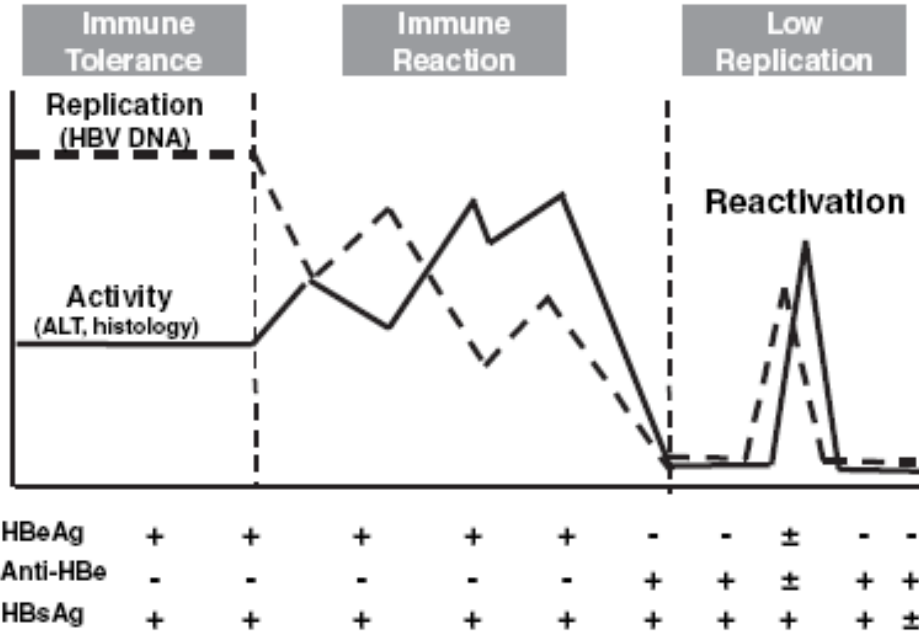
**Şekil 17:** 1989-2004 yılları arasında, Türkiye'nin farklı bölgelerindeki HBsAg prevalansı (22)

#### 4.10. Klinik belirti ve bulgular

##### 4.10.1. HBV enfeksiyonunun seyri dört döneme ayrılmıştır:

1. Yenidoğanlarda görülen **immun tolerans dönemi**: 10-30 yıl sürebilmektedir. Karaciğer fonksiyon testleri normaldir ve klinik belirti yoktur. Virüs replikasyonu yüksektir.
2. **İmmunolojik cevap dönemi**: İnflamatuvar yanıt ile hücre harabiyeti gelişmektedir. Sağlıklı erişkinde akut hepatit tablosu görülür. HBV DNA seviyesi düşer. Bu dönem kronik hastalarda 10 yıl veya daha uzun sürebilir.
3. **Viral replikasyonun baskılandığı dönemi**: Konak immun yanıtı ile viral replikasyon sonlanır, HBeAg kaybolur ve anti-HBe ortaya çıkar. Karaciğer fonksiyon testleri normal düzeye iner. HBV bu dönemde hepatosit DNA'sına entegre olur. HBsAg halen pozitifdir.
4. **HBsAg'nin negatifleşip, anti-HBs'nin saptandığı dönem**: İmmun dönem olarak adlandırılmaktadır (35, 52).





Source: J Viral Hepat © 2005 Blackwell Publishing

Şekil 18: HBV enfeksiyonu evreleri

#### 4.10.2. HBV enfeksiyonunun klinik tabloları

HBV'de klinik tablo, asemptomatik enfeksiyondan fulminan hepatit ve hepatoselüler karsinoma kadar uzanabilmektedir. Klinik tablonun oluşumunda konak ve virusa ait faktörler beraberce rol almaktadırlar.

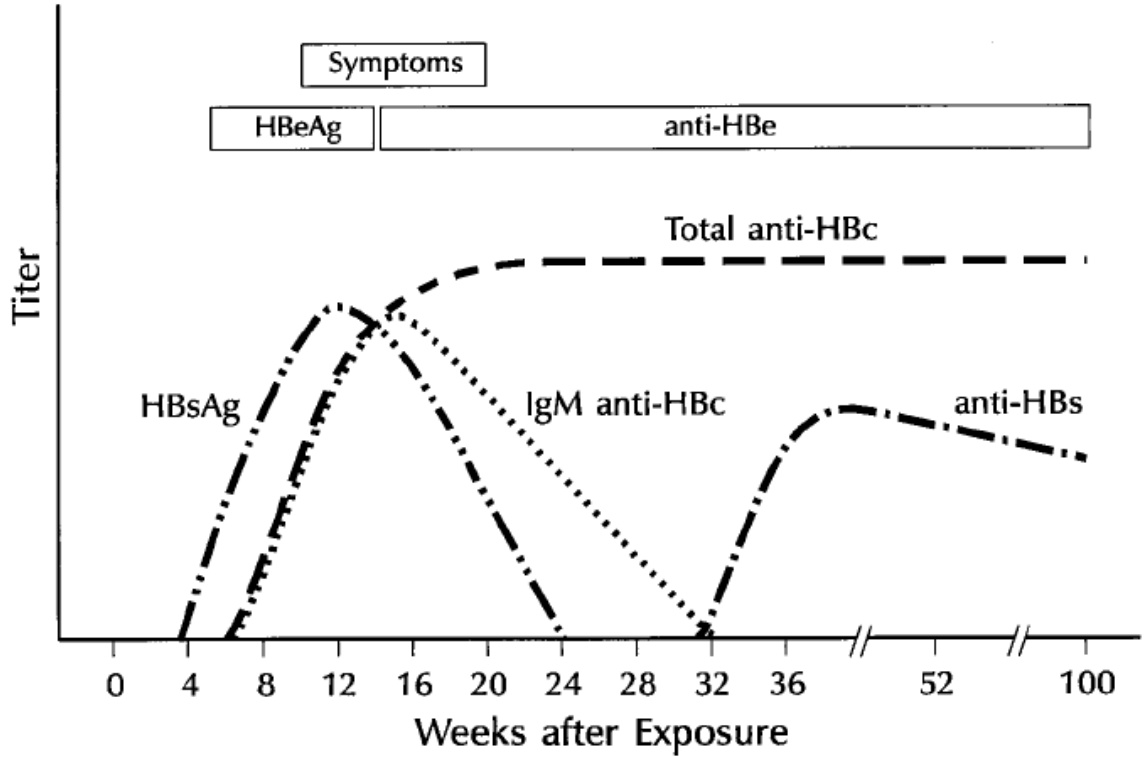
##### Akut enfeksiyon:

İnkübasyon dönemi, alınan virüs miktarına ve kişinin immunité durumuna bağı olarak 45-120 gün arasında değışmektedir. Akut enfeksiyon, asemptomatik enfeksiyon, sarılıklı kolestatik hepatit ve nadiren fulminan hepatit şeklinde görülebilir.

Virüsün alınmasından altı hafta sonra HBsAg ve diğer aktif viral replikasyon göstergeleri pozitifleşir, karaciğer fonksiyon testlerinde bozulma ve klinik belirtiler ortaya çıkar. Semptomların görülmesi yaş ile ilişkilidir. Okul öncesi çocuklarda genellikle asemptomatik enfeksiyon görülmektedir. Erişkinlerde ise % 25 oranında yorgunluk, iştahsızlık, kas ağrıları, hafif ateş, kokulardan rahatsız olma, bulantı ve/veya sarılık, hepatomegali gibi hepatik fonksiyon bozukluğuna bağı semptomlar görülür. Sarılıkla seyreden olgularda idrar renginde koyulaşma, skleralarda ve ciltte sararma gibi hiperbilirubinemi bulguları görülebilmektedir. Nadiren fulminan seyreden olgularda hepatik

ensefalopati, hepatorenal sendrom ve kanama diyatezi ile akut karaciğer yetmezliği gelişmektedir. Fulminan hepatitte mortalite %75'in üzerindedir ve yaşla birlikte artmaktadır. Akut HBV enfeksiyonu geçirenlerin %10-20'sinde antijen-antikor komplekslerine bağlı olarak ekstrahepatik belirtiler görülebilmektedir. Bunlar, serum hastalığı benzeri sendrom, poliarteritis nodosa, membranoproliferatif glomerülonefrit ve çocuklarda papüler akrodermatit şeklindedir. Birçok olguda yeterli immun yanıt ile virüs karaciğerden temizlenir ve oluşan anti-HBs ile kişi yeni bir HBV enfeksiyonundan korunur.

Anti-HBs ve anti-HBc pozitif olan (geçirilmiş enfeksiyon profili) bazı hastalarda karaciğerde cccDNA saptanabilmektedir (42). Bu durum özellikle anti-HBc pozitif donörlerden alınan karaciğer ile yapılan transplantasyonda sorun oluşturmaktadır (74).

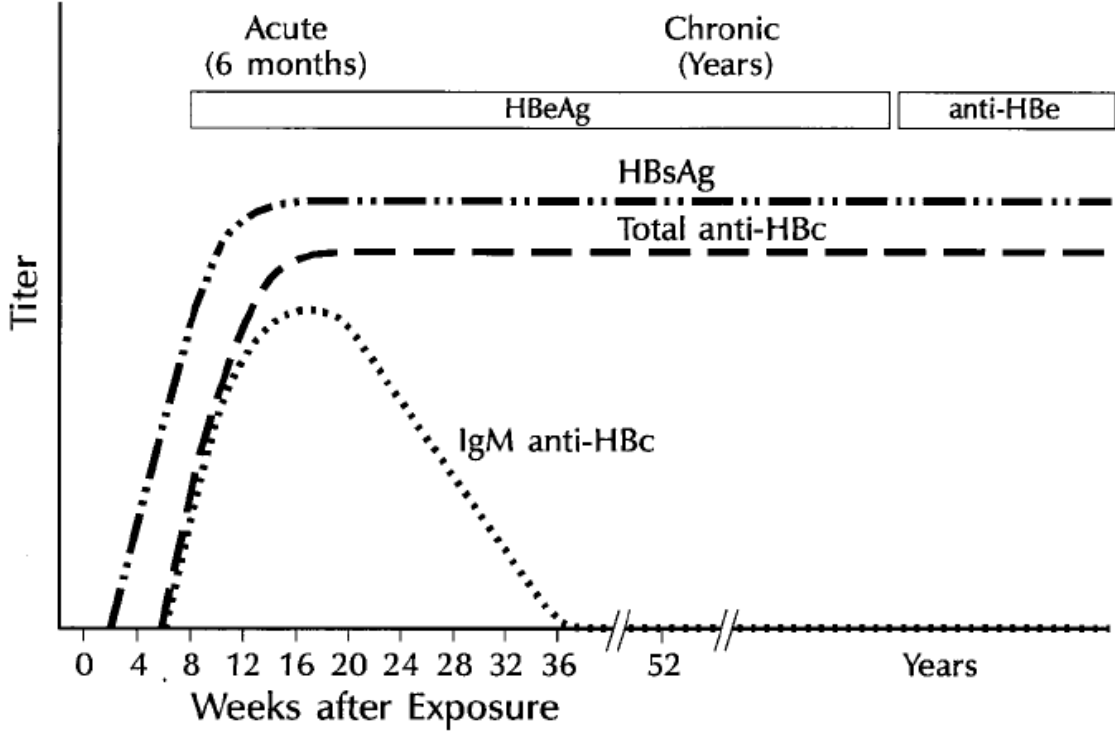


Şekil 19: Akut HBV enfeksiyonu (41)

#### Kronik enfeksiyon:

Olguların bir kısmında akut enfeksiyondan sonra HBV'nin karaciğerden temizlenmesi başarılı olamaz. Hastalarda HBsAg pozitifliğinin altı ayı aşması, kronik enfeksiyon olarak

kabul edilmektedir. Anti-HBs saptanamaz. Enfeksiyonun kronikleşmesinde yaş ve immun sistemin durumu özellikle etkili faktörlerdir.



Şekil 20: Kronik HBV enfeksiyonu (41)

#### Hepatoselüler karsinom (HCC):

Tüm dünyada her yıl 500 000 kişi HCC'den ölmektedir. HCC gelişmesinde HBV enfeksiyonu en önemli risk faktörü olarak kabul edilmektedir. HBV ile kronik enfekte olgularda, yaşam boyu HCC gelişme riski %10-25'tir ve enfeksiyonun başlamasından 30-50 yıl sonra gelişmektedir. Hastada siroz gelişmişse HCC riski daha da artmaktadır (52, 66).

Türkiye'de farklı bölgelerde yaşayan HCC hastalarında yapılan bir araştırmada 207 HCC'li hastanın 116'sında (%56) HBV etiyolojik neden olarak saptanmıştır (73).

Tayvan'da HBV enfeksiyonundan sonra HCC gelişme riski, diğer ülkelere göre 200 kat fazla olarak bildirilmektedir. Enfeksiyonun perinatal kazanılmış olması, riski arttıran genetik faktörler ve karsinojenlerin bu duruma neden olabileceği düşünülmektedir.

HBV enfeksiyonu sırasında viral genomun hepatosit DNA'sına entegrasyonu onkogenleri aktive edebilmektedir ayrıca kronik enfeksiyonda artan hepatosit yenilenme hızı, HBV'nin bazı viral proteinleri (X proteini) HCC'ye zemin oluşturmaktadır (52, 66).

## 4.11. Tanı

### 4.11.1. Serolojik tanı

HBV'ye ait antijen ve antikorların hasta serumunda saptanması, tanıda yaygın olarak kullanılmaktadır. Virüse ait antijen (HBsAg ve HBeAg) ve antikor (anti-HBc IgM, total anti-HBc veya anti-HBc IgG, anti-HBs, anti-HBe) saptanması, HBV enfeksiyonunun akut ve kronik dönemlerinin ayrılmasında, enfektivitenin değerlendirilmesinde, immunitenin araştırılmasında, kan ve organ vericilerinin taranmasında rutin olarak kullanılmaktadır (52).

#### HBsAg:

HBsAg, akut enfeksiyonda semptomların başlamasından 3-5 hafta önce kanda saptanabilir düzeye ulaşmaktadır. HBsAg'nin varlığı HBV enfeksiyonunu gösterir. Altı aydan daha uzun süre kanda HBsAg saptanması kronik enfeksiyonu gösterir.

Kantitatif HBsAg testleri ile yapılan çalışmalarda HBsAg düzeyinin HBV DNA düzeyi ile korele olduğu bildirilmektedir (12). Ancak lamuvidin tedavisi alanlarda HBsAg miktarındaki azalmanın HBV DNA düzeyindeki azalmaya göre daha geç olduğu belirtilmektedir (33). Kantitatif HBsAg testlerinin, direnç belirlemede HBV DNA ile beraber kullanımının mümkün olabileceği yönünde çalışmalar da vardır (17, 32).

#### HBeAg:

HBeAg, akut enfeksiyonda HBsAg'den hemen sonra pozitifleşmektedir ve genellikle HBsAg'den önce kaybolmaktadır. HBeAg'nin pozitifleşmesi kanda virüsün  $10^5$  kopya/ml'nin üzerinde olduğunu ve aktif viral replikasyonu göstermektedir. Ancak pre-core mutantları varlığında HBeAg sentezlenememektedir ancak viral replikasyon sürmektedir. Akut enfeksiyonda HBeAg pozitifliğinin 8-10 haftadan daha uzun sürmesi hastalığın kronikleştiğini göstermektedir. Kronik enfeksiyonda HBeAg pozitifliğinin devam etmesi, ağır karaciğer hastalığı gelişme riskini arttırmaktadır. Enfeksiyon eskidikçe hastaların %50'sinde aktif viral replikasyon azalmakta ve HBeAg kaybolup, anti-HBe saptanmaya başlamaktadır (52).

#### Anti-HBe:

HBeAg'nin kaybolmasının hemen ardından veya 1-2 hafta sonra HBeAg'ye karşı olan antikorlar ortaya çıkar. Akut enfeksiyonda anti-HBe'nin saptanması, viral replikasyonun azaldığının ve iyileşmeye gidişin göstergesidir.

Anti-HBe antikorları hastaların üçte birinde 6 ayda saptanamayacak düzeylere iner, diğerlerinde ise 4-6 yıl saptanabilir.

Kronik HBV enfeksiyonunda anti-HBe oluşması, enfektivitenin ve viral replikasyonun azaldığının göstergesidir (52).

#### Anti-HBcIgM:

Akut HBV enfeksiyonu göstergesidir. Akut enfeksiyonda hastalık belirtileriyle beraber pozitifleşir, 3-12 haftada azalarak saptanamayacak düzeye iner.

Anti-HBcIgM, HBsAg pozitifliğinden 1-4 hafta sonra saptanır. Pencere döneminde HBsAg ve HBeAg kaybolmuş, ancak bunlara karşı oluşan antikolar henüz saptanabilir düzeye ulaşmamıştır. Bu dönemde akut HBV enfeksiyonunun tek göstergesi anti-HBcIgM'dir. Pencere dönemi ortalama 2-8 hafta kadar sürer. Pencere dönemini uzadığı durumlarda anti-HBcIgM'nin kaybolarak, sadece anti-HBcIgG antikoları saptanabilmektedir (52).

#### Anti-HBcIgG :

Akut HBV enfeksiyonunda anti-HBcIgG, anti-HBcIgM'yi izleyerek pozitifleşir ve hayat boyu saptanabilir düzeyde kalır. Akut enfeksiyon döneminde pozitifleştiği ve hayat boyu saptanabilir düzeyde kaldığı için, akut, kronik veya önceden geçirilmiş enfeksiyonun göstergesidir.

#### Anti-HBs:

İyileşmeyle sonlanan akut enfeksiyonda HBsAg kaybolmakta ve anti-HBs saptanabilir düzeye ulaşmaktadır. Bir IU anti-HBs, 0,9 µg HBsAg nötralize eder (20, 52).

Anti-HBs antikolarının oluşması hastalığın iyileşme ile sonlandığını ve bağışıklığı gösterir. Anti-HBc antikolarıyla birlikte genelde hayat boyunca saptanabilir düzeyde kalır. %15 olguda altı yıl içinde kaybolduğunu gösteren yayınlar da vardır (52).

Anti-HBs antikoları, HBV aşısı sonrası da gelişir. 10 IU/L ve üzeri düzeyde olan antiHBs titreleri koruyucudur (25).

#### **4.11.2. HBV DNA testleri**

HBV DNA, HBsAg'den 3-5 hafta önce saptanabilmektedir ve tepe noktasına ulaştıktan sonra giderek azalmakta ve enfeksiyonun spontan olarak sonlanmasıyla kaybolmaktadır. Kronik HBV enfeksiyonu gelişen hastalarda enfeksiyonun dönemine bağlı olarak kan HBV

DNA düzeyinde oynamalar saptanmakta, karaciğer dokusunda ise HBV DNA olumluluğu kalıcı olmaktadır.

Serolojik göstergelerin yetersiz kaldığı gizli HBV enfeksiyonu, mutant virus enfeksiyonları, atipik serolojik profillerin saptanmasında viral replikasyonun gösterilmesi için HBV DNA araştırılmaktadır.

İlk nükleik asit testlerinin kalitatif olması nedeniyle, virüsün dinamik döngüsünü anlamada yetersiz kalmıştır. Kantitatif yöntemlerin geliştirilmesi ile viral yük miktarı belirlenerek virusun replikasyon aktivitesi hakkında bilgi edinilmesini sağlamıştır.

### **HBV DNA'nın serum / plazmada saptanmasının ve kantitasyonunun kullanım alanları (57).**

#### **1) Erken tanı:**

Kanda, HBV DNA HBsAg'den 3-5 hafta önce pozitifleşmektedir. Bu durum özellikle kan bankacılığında önem kazanmaktadır.

#### **2) Tedaviye karar verilmesi:**

Hepatit B'nin evrelendirilmesinde kullanılan parametrelerden biridir. HBV DNA miktarı, kanda  $\geq 10^{4-5}$  kopya/ml ve ALT yüksekliği ile birlikte ise kronik hepatit B, HBV DNA  $<10^{4-5}$  kopya/ml ve ALT normal sınırlarda ise inaktif HBsAg taşıyıcılığı olarak tanımlanmaktadır. Viral yükün  $10^{4-5}$  kopya/ml' nin üzerinde olması, tedaviye başlama kriterlerinden biri olarak alınmaktadır (3).

#### **3) Tedaviye yanıtın izlenmesi :**

Tedavi başladıktan sonra, tedavi öncesindeki viral yüke oranla, en az bir logaritma azalma beklenmektedir.

#### **4) Tedaviye dirençli suş gelişiminin saptanması :**

Tedavi devam ederken HBV DNA düzeyinde; bir ay arayla iki kez bir logaritma artış olması, kullanılan antiviral tedaviye direnç geliştiğini düşündürür.

#### **5) Hastanın bulaştırıcılık düzeyinin tahmin edilmesi:**

Viral bulaştırıcılık, viral yük ile doğru orantılıdır (7).

HBV DNA'nın saptanması ve kantitasyonu için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Yöntemlerin duyarlılık sınırları ve kantitasyon yapabildikleri aralık (dinamik aralık), kullanılan tekniğe bağlıdır.

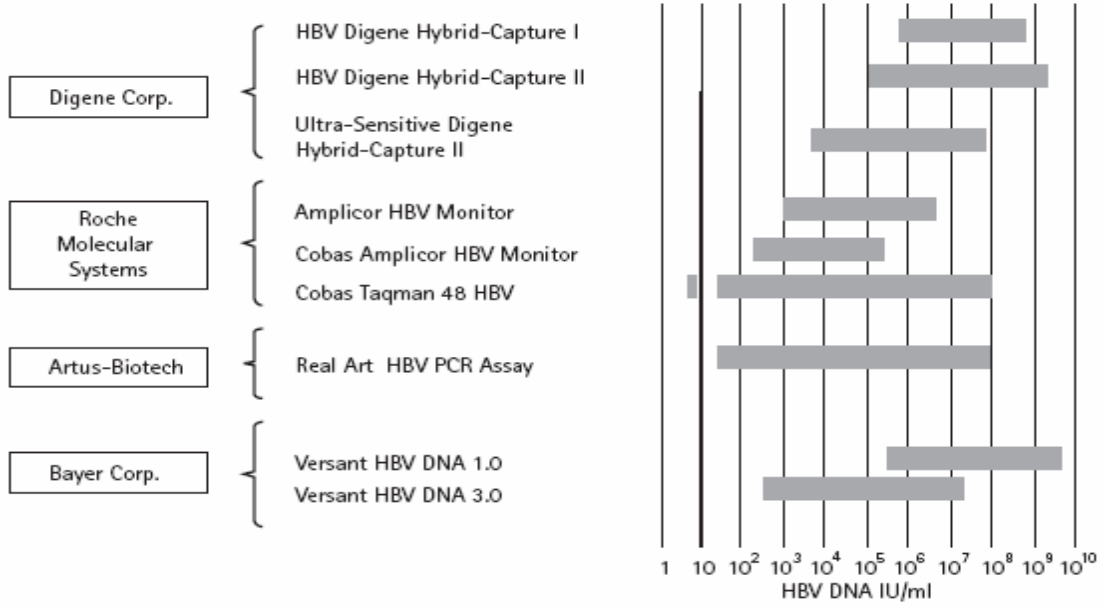
**Temelde iki tip nükleik asit tabanlı test (NAT) vardır:**

a) Hibridizasyon temelli testler.

b) Nükleik asit amplifikasyon temelli testler: Sıklıkla PZT esaslı testler kullanılmaktadır. Bunlardan biri olan gerçek zamanlı PZT, ışına özelliğine sahip moleküller kullanarak, PZT'yi amplicon oluşurken izleme ve miktar belirleme (kantitasyon) yöntemidir.

**Gerçek zamanlı PZT'nin klasik PZT'ye üstünlükleri:**

- 1) Dinamik aralık, klasik PZT'ye göre oldukça geniştir (en az 6 logaritma).
- 2) Hesaplanan viral yük gerçeğe daha yakındır ve tekrarlanabilirliği yüksektir.
- 3) PZT sonrası ürünün saptanması için ek işlem gerekmez. Kontaminasyon riski daha azdır (40).



**Şekil 21:** Ticari nükleik asit tabanlı testlerin dinamik aralıklarının karşılaştırılması (Doç. Dr. Cafer Eroğlu' nun "Kronik Hepatitlerde Virolojik Tanı ve Tanı Sorunları" başlıklı sunumundan alınmıştır.)

**Table 4:** Ticari nükleik asit tabanlı testlerin dinamik aralıkları (57)

Available HBV DNA detection and quantification assays <sup>a</sup>			
Manufacturer	Assay	Method	Dynamic range of quantification
Digene Corp., Gaithersburg, MD, USA	HBV Digene Hybrid-Capture™ I	Hybrid capture signal amplification in tubes	300,000–99,900,000 copies/ml
	HBV Digene Hybrid-Capture™ II	Hybrid capture signal amplification in microplates	100,000–1,000,000,000 copies/ml
	Ultra sensitive HBV Digene Hybrid-Capture™ II	Hybrid capture signal amplification in microplates after centrifugation	100–10,000,000 copies/ml
Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA, USA	Amplicor HBV Monitor™	Manual quantitative RT-PCR	1000–4,000,000 copies/ml
	Cobas Amplicor HBV Monitor™	Semi-automated quantitative RT-PCR	200–200,000 copies/ml
Bayer Corporation, Tarrytown, NY, USA	Versant™ HBV DNA 1.0 Assay	Manual branched DNA signal amplification	200,000–5,000,000,000 genome equivalents
	Versant™ HBV DNA 3.0 Assay	Semi-automated branched DNA signal amplification	2000–100,000,000 copies/ml or 10 <sup>3</sup> –10 <sup>8</sup> IU/ml

<sup>a</sup> The dynamic ranges of quantification are given in non-standardized units. Conversion factors to IU/ml as already being calculated.



## 5. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada, kanda, HBV DNA'nın geniş dinamik aralıkta kantitasyonunu yapabilen, analitik duyarlılığı en az 100 IU/ml olan, internal kontrol içeren ve bu sayede ekstraksiyon ve amplifikasyon basamakları izlenebilen, tekrarlanabilirliği yüksek olan "in-house" gerçek zamanlı PZT testi geliştirilmesi amaçlanmıştır. Testin optimizasyon çalışmalarının ardından, yöntem, ticari gerçek zamanlı PZT testi ile karşılaştırılmıştır (RealArt HBV RG PCR Kit, QIAGEN, Almanya).

### 5.1. GEREÇ

#### 5.1.1. Ayraçlar

##### 5.1.1.1. Viral nükleik asit ekstraksiyon kiti

Örneklerin ekstraksiyonu EZ 1 Virus Mini Kit v2.0 (QIAGEN, Almanya) ile EZ-1 cihazında yapılmıştır. Ekstraksiyona 400 µl örnek girmiştir, 60 µl elüsyon hacmi ile çıkılmıştır.

##### 5.1.1.2. Kullanılan öncül ve problemler, dizileri ve hedef bölgeler

<u>Öncül adı</u>	<u>Tip</u>	<u>Dizi</u>
<b>HBV için (54, 55):</b>		
HBV-F	Ön öncül	5'-GGA CCC CTG CTC GTG TTA CA-3'
HBV-R	Ters öncül	5'-GAG AGA AGT CCA CCM CGA GTC TAG A-3'
HBV-1	Prob-1	5'-FAM-TGT TGA CAA RAA TCC TCA CAA TAC CRC AGA-BHQ-1-3'
HBV-2	Prob-2	5'-FAM-CGT TGA CAA RAA TCC TCA CAA TAC CRC AGA-BHQ-1-3'

##### **Bovine herpes virus tip 1 (internal kontrol) için (39):**

BHV-F	Ön öncül	5'-ATG TTA GCG CTC TGG AAC C-3'
BHV-R	Ters öncül	5'-CTT TAC GGT CGA CGA CTC C-3'
BHV-P	Prob	5'- <b>ROX</b> -ACG GAC GTG CGC GAA AAG A-BHQ-2-3'

### **Hedef bölgeler:**

HBV Pre-S bölgesinde 184 – 273. nükleotidler arasındaki 89 bp bölge ve bovine herpes virus 1 (BHV-1) gC geninde 445 – 567. nükleotidler arasındaki 122 bp'lik bölgenin gerçek zamanlı PZT yöntemiyle çoğaltılması hedeflenmiştir.

#### **5.1.1.3. Gerçek zamanlı PZT miksi ve cihaz**

“QIAGEN no-rox multipleks PCR” miksi (QIAGEN, Almanya) kullanılmıştır. Tüm gerçek zamanlı PZT reaksiyonları Rotor Gene 6000 cihazında (Corbett Life Science, Avustralya) gerçekleştirilmiştir.

#### **5.1.1.4. Klonlamada kullanılan kit ve araçlar**

- a. Klonlama kiti: “pGEM T Easy Vector System II“ (Promega, ABD)
- b. S.O.C. Medium liquid (Invitrogen, ABD)
- c. LB broth (SIGMA-ALDRICH, ABD )
- d. IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside) (Fermentas, Litvanya)
- e. X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) (AppliChem, Almanya)

#### **5.1.1.5. Plazmid ekstraksiyon kiti**

NükleoSpin Plazmid kit (MACHEREY-NAGEL, Almanya)

#### **5.1.1.6. Ticari kantitatif gerçek zamanlı PZT kiti**

RealArt HBV RG PCR Kit (QIAGEN, Almanya)

#### **5.1.1.7. Kalite kontrol serum örnekleri**

- a. “OptiQuant HBV DNA Quantification Panel” (ACROMETRIX, ABD)
- b. “QCMD 2007 Hepatitis B Virus Genotyping HBVG07 Proficiency Programme” (QCMD, İngiltere)
- c. “Working Standart-HBV DNA Working Reagent for Nucleic Acid Amplification Techniques” (NIBSC, İngiltere)
- d. 2007 QCMD HBV DNA dış kalite kontrol paneli (QCMD, İngiltere)
- e. 2008 QCMD HBV DNA dış kalite kontrol paneli (QCMD, İngiltere)

### **5.1.1.8. Agaroz jel görüntülemeye kullanılan ayraçlar**

#### **5.1.1.8.1. EDTA (Ethylenediaminetetraacetate) (Sigma-Aldrich, ABD)**

0.5 M

Na<sub>2</sub>EDTA 18.6 g

Distile su 100 ml

EDTA pH= 8'de erimektedir. pH'ı ayarlamak için NaOH pelleti kullanılmıştır. Daha sonra otoklavlanmıştır.

#### **5.1.1.8.2. Tris-Borik asit-EDTA (TBE 10X)**

Tris base (Sigma-Aldrich, ABD) 108 gr

Borik asit (Sigma-Aldrich, ABD) 55 gr

0.5 M EDTA 20 ml

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Gerektiğinde distile su ile, 1/10 dilüe edilerek 1X TBE elde edilmiştir.

#### **5.1.1.8.3. Agaroz (Sigma-Aldrich, ABD)**

#### **5.1.1.8.4. Etidyum bromid (1000X, 5mg/ml) (Sigma-Aldrich, ABD)**

Etidyum bromid 0.5 gr

Distile su 100 ml

İşıktan korumak için alüminyum folyo ile kaplanmıştır.

#### **5.1.1.8.5. DNA büyüklüğü belirleyicisi**

“50 bp StepLadder” (Sigma-Aldrich, ABD)

#### **5.1.1.8.6. Yükleme boyası (“Loading dye”)**

6X Orange Loading Dye Solution (Fermantas, Litvanya)

## **5.2. YÖNTEM**

### **5.2.1. İnternal kontrolün belirlenmesi**

İnternal kontrol (İK) olarak bovine herpes virüs tip 1 (BHV-1) kullanıldı. BHV-1, sığırlarda ciddi solunum yolu enfeksiyonu, konjunktivit, vulvovajinit, balanopostit, düşük ve neonetal dönemde sistemik enfeksiyonlara neden olmakta ve insanlarda enfeksiyon yapmamaktadır (39).

İnsanlarda enfeksiyon yapmayan bir virus olması, gen bankasında bulunan HBV dizileriyle karşılaştırıldığında benzer nükleotidler içermemesi nedenleriyle internal kontrol

olarak BHV-1 seçilmiştir. BHV-1 hücre kültürü ana stoğu, Ankara Veterinerlik Enstitüsü'nden sağlanmıştır.

BHV-1 DNA'nın saptanması, literatürde tanımlanmış (39) primerler ve prob kullanılarak BHV-1 gC geninde 122 kb'lık bölge çoğaltılarak sağlanmıştır.

## **5.2.2. "In-house" gerçek zamanlı kantitatif PZT testinin tasarlanması**

### **5.2.2.1. HBV PZT için hedef bölge seçimi**

Pas S.D. ve arkadaşlarının çalışmasında kullanılan, HBV Pre-S bölgesinde 184 – 273 nükleotidleri arasındaki 89 bp bölgeyi çoğaltan primerler ve işaretli problar kullanılmıştır (54, 55). Primer ve prob dizileri, GenBank'tan indirilen farklı genotiplere ait 56 adet tam HBV genom dizisi üzerinde yeniden değerlendirilerek kullanımlarının uygun olacağına karar verilmiştir. İncelenen GenBank dizileri: NC003977, AF297621-A, AF297623-A, AF297624-A, AF297625-A, U87742-A, AB033554-B, AB033555-B, EU306684-B, EU306704-B, EU350409-B, AF282917-B, AF282918-B, AB368295, AB033551-C, AB033552-C, AB195947-C, AB195948-C, AB195949-C, AB195950-C, AB195951-C, AB195952-C, AB195953-C, AB195954-C, AB195955-C, AB195956-C, AB195957-C, AB202071-C, AB202072-C, AB368296-C, AY066028-C, AB368297-C, AF411412-C, AF458664-C, AF458665-C, EU306727-C, EU306728-C, EU306729-C, AJ344116-D, AJ344117-D, AB056515-D, AM422939-D, AF280817-D, AY721605-D, AY721606-D, AY721607-D, X75657-E, X75664-E, AY090456-F, X75658-F, AY090458-F, AY7090459-F, AF405756-G, AY090460-H, AY090454-H, AY090457-H.

### **5.2.2.2. Çalışma programının optimize edilmesi**

1) Rutinde  $10^9$  kopya/ml HBV DNA içerdiği saptanan hasta plazmasının, HBV DNA negatif plazma ile 1/10 katlı dilüsyonları yapılmıştır.

2)  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  kopya/ml HBV DNA içeren dilüsyonlardan DNA ekstraksiyonu yapılmıştır. Ekstraktlar, gerçek zamanlı PZT yöntemiyle çoğaltılarak, ön denemeler yapılmıştır.

PZT reaksiyonu içeriği (Toplam hacim 25µl) :

No-rox multipleks PZT miksi à 12,5 µl

Primer HBV-F (10 pmol) à 1 µl

Primer HBV-R (10 pmol) à 1 µl

Prob HBV-1 (10 pmol) à 0,5 µl

Prob HBV-2 (10 pmol) à 0,5 µl

9,5 µl DNA

Isı döngüsü:

• 95 °C à 15 dk (n denatürasyon)

• İki basamaklı toplam 40 döngü:

94 °C à 60 sn

60 °C à 60 sn

3) İK eklenmesiyle sonuçların değişip değişmediğinin araştırılması amacıyla aynı örnekler ( $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  kopya/ml HBV DNA içeren dilüsyonlar) İK ile alışılmıştır. DNA ekstraksiyonu rnelere İK eklendikten sonra yapılmış ve ekstraktlar gerçek zamanlı PZT yöntemiyle alışılmıştır.

Multipleks PZT reaksiyonu içeriği (toplam hacim 25 µl):

No-rox multipleks PZT miksi à 12,5 µl

Primer HBV-F (20 pmol) à 0,5 µl

Primer HBV-R (20 pmol) à 0,5 µl

Prob HBV-1 (20 pmol) à 0,25 µl

Prob HBV-2 (20 pmol) à 0,25 µl

Primer BHV-F (20 pmol) à 0,5 µl

Primer BHV-R (20 pmol) à 0,5 µl

Prob BHV (20 pmol) à 0,5 µl

9,5 µl DNA

Isı döngüsü:

• 95 °C à 15 dk (n denatürasyon)

• İki basamaklı 40 döngü:

94 °C à 60 sn

60 °C à 60 sn

4) Reaksiyona girecek primer - prob konsantrasyonlarının belirlenmesi amacıyla 10, 20 ve 50 pmol prob ve primer konsantrasyonlarının kombinasyonları satranç tahtası yöntemiyle denenmiştir. Ürünler % 2'lik agaroz jel elektroforezi ile, özgül olmayan bantlar ve primer-dimer oluşumu açısından değerlendirilmiştir.

### 5.2.3. Kantitasyon standardının oluşturulması için klonlama çalışması

Mutlak kantitasyona dayalı bir test tasarlanmıştır. Kantitasyon standardı olarak, klonlanmış plazmid kullanılmıştır. Bu amaçla, 89 bp uzunluğundaki HBV DNA PZT ürünü plazmide aktarılmış ve *Escherichiae coli*'de çoğaltılmıştır.

#### “pGEM T Easy Vector System II” (Promega, ABD) klonlama kiti içeriği

- 1.2 µg/ml pGEM T-Easy Vector (50 ng/µl)
- 100 ünite T4 DNA Ligase
- 200 µl 2X Rapid Ligation buffer, T4 DNA Ligase
- 1.2 ml JM109 Competent Cells, High Efficiency (6X200 µl)

Klonlama, üretici firmanın önerilerine uyularak yapılmıştır.

#### 5.2.3.1. Ligasyon öncesi

- 1)  $10^6$  kopya/ml HBV DNA içeren örnekten EZ1 cihazı ile DNA ekstraksiyonu yapılmıştır ve tez primerleri ile klasik PZT gerçekleştirilmiştir.
- 2) PZT ürünü %2'lik agaroz jelde görüntülenerek 89 bp'lik ürün saptanmıştır. .
- 3) LB broth ve LB agar hazırlanmıştır.
  - a. LB broth hazırlanması:
    - i. 20 gr toz besiyeri, 1 lt distile su içinde homojenize edilip, 121°C'de 15 dk. otoklavlanmıştır.
    - ii. Besiyeri, yaklaşık 50-60°C ısıya ulaştığında son üründe 100 µg/ml konsantrasyonda antibiyotik olacak şekilde ampisilin eklenmiştir.
    - iii. 15 ml'lik steril falkon tüplere 5'er ml dağıtılmıştır.

b. LB agar hazırlanması:

- i. 20 gr toz besiyeri, 15 gr agar, 1 lt distile su içinde homojenize edilip, 121°C'de 15 dk. otoklavlanmıştır.
- ii. Besiyeri yaklaşık 50-60 °C ısıya ulaştığında, son üründe 100 µg/ml konsantrasyonda antibiyotik olacak şekilde ampisilin eklendikten sonra 9 cm çaplı petri plaklarına dökülerek ve + 4°C'de saklanmıştır.
- iii. Kullanımdan önce plaklar oda ısısına getirildi ve her plağın yüzeyine 20 µl X-Gal (50 mg/ml konsantrasyondaki çözültiden), 100 µl IPTG (100 mM konsantrasyondaki çözültiden) cam çubuk yardımıyla yayılmıştır.
- iv. Plaklar, 30 dk. 37°C'de bekletilerek IPTG ve X-Gal'ın emilimi sağlanmıştır.

### 5.2.3.2. Ligasyon

Ligasyon reaksiyonu içeriği:

2X Rapid ligation buffer à 5 µl

PGEM T-Easy Vector (50 ng/µl) à 1 µl

PZT ürünü à 1 µl / 2 µl (2 farklı konsantrasyonda ligasyon yapılmıştır)

T4 DNA Ligaz à 1 µl

Distile su ile 10 µl'ye tamamlanmıştır.

Yukardaki karışım, 0,5 ml tüplerde, pipetle yavaşça karıştırılarak hazırlanmış ve bir saat oda ısısında ardından bir gece + 4°C'de inkübe edilmiştir.

### 5.2.3.3. Transformasyon

- 1) Isı bloğu 42°C'e ayarlanmıştır.
- 2) LB agar plakları ve SOC besiyeri, + 4°C 'den çıkarılarak oda ısısına gelmeleri sağlanmıştır.
- 3) Buz üzerindeki tüplere, 2 µl ligasyon sıvısından koyulmuştur.
- 4) Kompetan hücreler 5 dk. buzda bekletilerek eritilmiştir. Vorteks yapılmadan nazikçe karıştırılmıştır. 50 µl hücre, ligasyon sıvısı içeren tüplere eklenmiştir.
- 5) Tüpler nazikçe karıştırılarak, 20 dk. buz üzerinde bekletilmiştir.

- 6) Tüpler, 42°C'lık ısı bloğunda 45-50 saniye tutularak ısı şoku yapılmıştır.
- 7) Hızlıca tekrar buza alınarak, 2 dk buzda bekletilmiştir.
- 8) Tüplere 950 ml oda ısısına gelmiş SOC besiyeri eklenmiştir.
- 9) 1,5 saat 37°C'da, karıştırıcı üzerinde (yaklaşık 150 rpm hızda) inkübe edilmiştir.
- 10) IPTG ve X-Gal eklenmiş LB agar plaklarına ekim yapıldı. Örnekler kıvrılmış cam yardımıyla tüm yüzeye eşit olarak yayılmıştır.
  - a. Dört adet transformasyon tüpü elde edilmiştir. Her transformasyon tüpünden, 50µl ve 100 µl alınıp farklı plaklara ekilmiştir. Toplamda sekiz adet ekilmiş plak elde edilmiştir.
- 11) Plaklar 37°C'de 16-24 saat inkübe edilmiştir.
- 12) Plaklar beyaz kolonilerin daha iyi seçilebilmesi amacıyla bir gece + 4°C'de bekletilmiştir.
- 13) Tam olarak beyaz olan koloniler işaretlenmiştir.

#### 5.2.3.4. Seçilen koloniler ile PZT

Belirlenen on adet beyaz ve bir adet mavi koloniden klasik PZT yapılarak insert varlığı araştırılmıştır.

PZT reaksiyonu içeriği: (toplam hacim 50 µl)

10X hot-start buffer à 5 µl

dNTP (4mM) à 2,5 µl

Primer HBV-F (10 pmol) à 1 µl

Primer HBV-R (10 pmol) à 1 µl

MgCl<sub>2</sub> (25mM) à 3 µl (son konsantrasyon 1,5 mM)

Hot start Taq à 0,25 µl

Su à 37,25 µl

Isı döngüsü:

• 95 °C à 5 dk (ön denatürasyon)

• Üç basamaklı 35 döngü:

94 °C à 30 sn

57 °C à 30 sn

72 °C à 30 sn

• 72 °C à 5 dk



- 1) Koloninin bir miktarı PZT miksinde aktarılmış, kalanı 5 ml LB sıvı besiyeri konmuş falkon tüplerinin içine eklenmiştir. Tüpler 37°C'de 48 saat inkübe edildikten sonra; + 4°C'ye kaldırılmıştır.
- 2) PZT ürünü %2'lik agaroz jelde görüntülenmiştir. Tüm beyaz kolonilerde 89 bp'lik beklenen bant gözlenmiştir.
- 3) Altı farklı koloninin, LB sıvı besiyerindeki üremelerinden, plazmid ekstraksiyonu yapılmıştır.

#### **5.2.3.5. Plazmid standardın kantitatif değerinin belirlenmesi**

- 1) Tek bir koloniden elde edilen plazmid ekstraktının, 5 ng/µl poly A içeren distile su içinde dilüsyonları yapılmıştır.
- 2) İçerdiği HBV DNA miktarı bilinen standartlar kullanılarak plazmidin HBV DNA değeri belirlenmiştir. Bu amaçla, 500 IU/ml HBV DNA içeren standart (NIBSC, İngiltere) ve Optiquant HBV DNA kantitasyon panelinden hazırlanan dilüsyonlardan internal kontrol eklenerek, EZ-1 cihazı ile DNA ekstrakte edilmiştir. Standartlar ve plazmidten hazırlanan dilüsyonlar iki farklı çalışmada (her çalışmada ikişerli olarak) çalışılarak karşılaştırılmıştır. Ct değeri kıyaslamalarıyla plazmid standardının değeri belirlenmiştir.

#### **Bu çalışmada kullanılan standartlar:**

##### **a) Optiquant HBV DNA kantitasyon paneli üyeleri:**

- 2X10<sup>7</sup> IU/ml HBV DNA
- 2X10<sup>6</sup> IU/ml HBV DNA
- 2X10<sup>5</sup> IU/ml HBV DNA
- 2X10<sup>4</sup> IU/ml HBV DNA
- 2X10<sup>3</sup> IU/ml HBV DNA
- 2X10<sup>2</sup> IU/ml HBV DNA

##### **b) NIBSC 500 IU/ml HBV DNA içeren çalışma standardıdır.**

PZT reaksiyonu içeriği (Toplam hacim 25 µl):

No-rox multipleks PZT miksi à 12,5 µl

Primer HBV-F (20 pmol) à 0,5 µl  
Primer HBV-R (20 pmol) à 0,5 µl  
Prob HBV-1 (20 pmol) à 0,25 µl  
Prob HBV-2 (20 pmol) à 0,25 µl  
Primer BHV-F (20 pmol) à 0,5 µl  
Primer BHV-R (20 pmol) à 0,5 µl  
Prob BHV (20 pmol) à 0,5 µl  
9,5 µl DNA

Isı döngüsü:

- 95 °C à 15 dk (ön denatürasyon)
- İki basamaklı 40 döngü:
  - 94 °C à 60 sn
  - 60 °C à 60 sn

#### 5.2.4. “In-house” testin validasyonu

##### 5.2.4.1. Testin doğrusallığı (“Linearite”)

a) İki farklı pozitif kontrolün, distile su ile 1/10 katlı dilüsyonları hazırlanmıştır. Her dilüsyon iki farklı günde ve her çalışmada çift olarak çalışılmıştır.

- 1) Birinci pozitif kontrol (“OptiQuant HBV DNA Quantification Panel” ve dilüsyonları:
  - 2 X10<sup>6</sup> IU/ml HBV DNA standardı ve
    - 2 X10<sup>5</sup> IU/ml HBV DNA,
    - 2 X10<sup>4</sup> IU/ml HBV DNA,
    - 2 X10<sup>3</sup> IU/ml HBV DNA,
    - 2 X10<sup>2</sup> IU/ml HBV DNA içeren dilüsyonları
- 2) İkinci pozitif kontrol ve dilüsyonları:
  - 10<sup>-3</sup> plazmid dilüsyonu (5 X10<sup>7</sup> IU/ml HBV DNA içerdiği belirlenmiştir)
  - 10<sup>-4</sup> plazmid dilüsyonu (5 X10<sup>6</sup> IU/ml HBV DNA içerdiği belirlenmiştir)
  - 10<sup>-5</sup> plazmid dilüsyonu (5 X10<sup>5</sup> IU/ml HBV DNA içerdiği belirlenmiştir)
  - 10<sup>-6</sup> plazmid dilüsyonu (5 X10<sup>4</sup> IU/ml HBV DNA içerdiği belirlenmiştir)
  - 10<sup>-7</sup> plazmid dilüsyonu (5 X10<sup>3</sup> IU /ml HBV DNA içerdiği belirlenmiştir)

b) Doğrusallık uç noktalarının belirlenebilmesi için  $5 \times 10^{10}$  ile  $5 \times 10^1$  IU/ml arasında HBV DNA içeren plazmid ekstrakt dilüsyonları kullanılmıştır. Her dilüsyon ikişerli olarak çalışılmıştır. Plazmid standartları ile kantitasyon yapılmıştır.

#### **5.2.4.2. Testin analitik duyarlılığı (saptama alt sınırı)**

2000 IU/ ml HBV DNA içeren “OptiQuant HBV DNA Quantification Panel” örneği İK ile beraber ekstrakte edilmiştir, ve 5 ng/ µl poly A içeren distile su ile ekstrakt dilüsyonları yapılmıştır. Her dilüsyon üç farklı günde, günde üçer kez çalışılmıştır. Çalışılan dilüsyonların içerdiği HBV DNA miktarları:

- 100 IU/ml HBV DNA
- 50 IU/ml HBV DNA
- 25 IU/ml HBV DNA
- 12.5 IU/ml HBV DNA
- 6.25 IU/ml HBV DNA
- 3.125 IU/ml HBV DNA

#### **5.2.4.3. Testin tekrarlanabilirliği (“precision”)**

##### **a) Test içi tekrarlanabilirlik**

- Altı adet pozitif örnek
- Üç adet zayıf pozitif örnek aynı çalışmada, her birinden üçer kez olacak şekilde çalışılmıştır.

##### **b) Testler arası tekrarlanabilirlik**

- İki adet pozitif örnek
- Bir adet zayıf pozitif örnek üç farklı günde birer kez çalışılmıştır.

#### **5.2.4.4. HBV genotiplerinin viral DNA kantitasyonuna etkisinin belirlenmesi**

“QCMD 2007 Hepatitis B Virus Genotyping HBVG07 Proficiency Programme” (QCMD, İngiltere) genotip paneli İK eklenerek ekstrakte edilmiştir. Yeni test protokolüne uygun olarak çalışılmıştır.

**Tablo 5:** QCMD 2007 genotip paneli üyeleri

Örnek	Örnek içeriği	Örnek matriksi	İçerik: (kopya/ml HBV DNA)
HBVG07-01	HBV Genotip E	serum	4X10 <sup>4</sup>
HBVG07-02	HBV Genotip A	serum	4X10 <sup>4</sup>
HBVG07-03	HBV Genotip C	serum	4X10 <sup>4</sup>
HBVG07-04	HBV DNA negatif	serum	----
HBVG07-05	HBV Genotip D	serum	4X10 <sup>4</sup>
HBVG07-06	HBV Genotip B	serum	4X10 <sup>4</sup>
HBVG07-07	HBV Genotip A+G	serum	4X10 <sup>4</sup> + 4X10 <sup>4</sup>
HBVG07-08	HBV Genotip G	serum	4X10 <sup>4</sup>

#### 5.2.4.5. Testin doğruluğu (“accuracy”)

Miktarı belli standart örnekler yeni testle çalışılmıştır ve elde edilen değerlerin beklenen HBV DNA ile uyumu değerlendirilmiştir. Bu amaçla; 2007 HBV DNA dış kalite kontrol paneli (QCMD, İngiltere) kullanılmıştır.

**Tablo 6:** 2007 HBV DNA dış kalite kontrol paneli üyeleri

QCMD07-1	D - 10 000 kopya/ml HBV DNA
QCMD07-2	A - 1000 kopya/ml HBV DNA
QCMD07-3	D - 1000 kopya/ml HBV DNA
QCMD07-4	D - 100 000 kopya/ml HBV DNA
QCMD07-5	A - 100 kopya/ml HBV DNA
QCMD07-6	A - 100 000 kopya/ml HBV DNA
QCMD07-7	Negatif
QCMD07-8	A - 10 000 kopya/ml HBV DNA

#### 5.2.4.6. Hasta örnekleri kullanılarak, “in-house” testin standart testle karşılaştırılması

HBV RG PCR Kit ile çalışılarak HBV DNA pozitif olduğu saptanan 180 adet plazma ve HBV DNA negatif olduğu saptanan 80 adet plazma geliştirilen yeni test ile çalışılmıştır.

Pozitif örnekler, kantitasyon aralığının farklı noktalarını değerlendirebilmek için  $10^7$  ile  $10^2$  kopya/ml arasında değişen miktarlarda HBV DNA içeren plazmalardan seçilmiştir. Ticari test altın standart olarak alınarak, kalitatif sonuçlarla “in-house” testin duyarlılık ve özgüllüğü belirlenmiştir. Her iki testle de pozitiflik saptanan örneklerde testler arası kantitatif sonuçların uyumu lineer regresyon analizi ile değerlendirilmiştir.

#### **5.2.4.7. Yalancı pozitifliğin değerlendirilmesi**

Yirmialtı adet HBsAg ve HBV DNA negatif, HCV RNA pozitif hasta örneği İK eklenerek, EZ-1 cihazında ekstrakte edilmiş ve “in-house” testle çalışılmıştır.

#### **5.2.5. Maliyet analizi**

Rutinde kullanılan ticari HBV RG PCR Kit ve yeni “in-house” testin birim maliyetleri, kullanılan malzeme fiyatlarına göre hesaplanmıştır, personel giderleri hesaplama katılmamıştır.

## 6. BULGULAR

### 6.1. Teste girecek internal kontrolün miktarının belirlenmesi:

1/1000 BHV-1 dilüsyonu gerçek zamanlı PZT yöntemiyle ile çalışıldığında 30. döngüde eşik değeri aşan bir sinyal elde edilmiş ve bu dilüsyon internal kontrol olarak kullanılmıştır.

### 6.2. Çalışma programının optimize edilmesi:

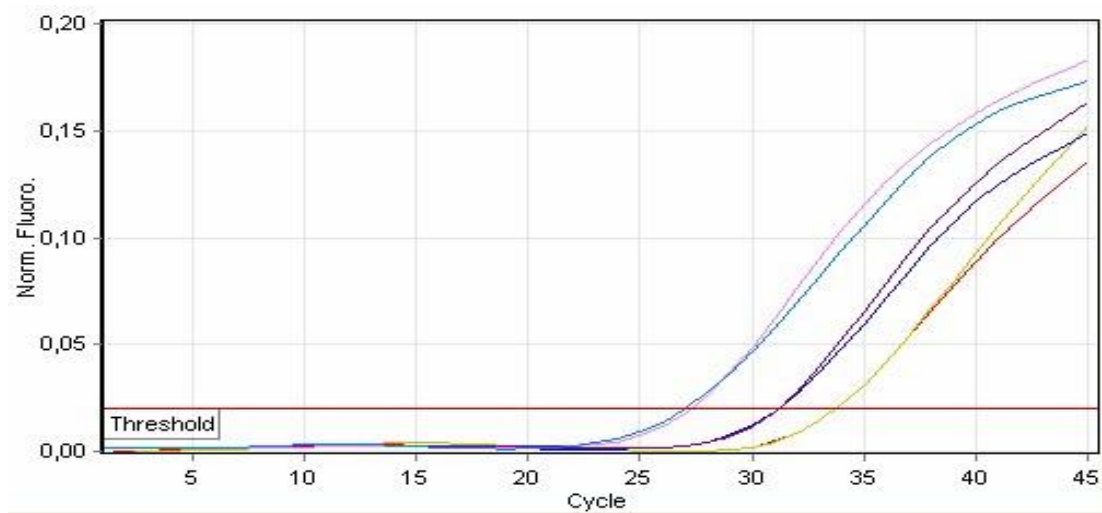
a) HBV RG PCR kit ile  $10^9$  kopya/ml HBV DNA içerdiği saptanan bir hasta plazmasının, HBV DNA negatif plazma ile yapılan sulandırılmalarından  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  kopya/ml HBV DNA içeren dilüsyonları ile optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Dilüsyonlardan elde edilen DNA ekstraktları, ikiyeşerli olarak gerçek zamanlı PZT yöntemiyle çalışılmıştır.

Ön deneme PZT sonuçlarına göre her dilüsyonun ortalama ct değerleri:

§  $10^3$  kopya/ml HBV DNA içeren ekstrakt dilüsyonunun ct ortalaması: 32.26

§  $10^4$  kopya/ml HBV DNA içeren ekstrakt dilüsyonunun ct ortalaması: 29.54

§  $10^5$  kopya/ml HBV DNA içeren ekstrakt dilüsyonunun ct ortalaması: 25.86



Şekil 22: Ön deneme çalışmasında elde edilen amplifikasyon eğrileri

b) İK eklenmesinin ct değerlerine olan etkisinin araştırılması amacıyla aynı örnekler ( $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  kopya/ml HBV DNA içeren hasta plazmaları) internal kontrol (İK) eklenerek

ekstrakte edilmiştir. İK içeren ve içermeyen ekstraktlar, ikişerli olarak, aynı çalışmada birlikte çalışılmıştır. İK içeren ve içermeyen örnekler arasında bir ct'yi aşmayan farklar saptanmıştır.

c) Reaksiyona girecek optimum primer - prob konsantrasyonlarının belirlenmesi amacıyla 10, 20 ve 50 pmol prob ve primer konsantrasyonlarının kombinasyonları satranç tahtası yöntemiyle denenmiştir. Ürünler, % 2'lik agaroz jel elektroforezi ile özgül olmayan bantlar ve primer-dimer oluşumu açısından değerlendirilmiştir.

Primer ve prob konsantrasyonları 10 pmol olduğunda jel görüntülemeye;

- Beklenen büyüklükte bant saptanmıştır.
- Primer dimer oluşumu gözlenmemiştir.
- Nonspesifik bant gözlenmemiştir. Bu nedenlerle 10 pmol konsantrasyonda devam etme kararı alınmıştır.

d) Amplifikasyon sinyalinin amplitüdünün arttırılması ve ct değerlerinin iyileştirilmesi amacıyla aşağıdaki parametrelerde değişiklikler yapılarak sonuçlara olan etkileri değerlendirilmiştir:

a) Reaksiyon hacmi 50 µl'ye çıkarıldı ve PZT tüpüne giren DNA miktarı iki kat arttırılmıştır.

b) Bağlanma ısı olarak 56°C, 60°C, 62 °C ısıları denenmiştir.

c) İki ve üç basamaklı PZT döngüleri karşılaştırılmıştır.

d) Farklı bir ticari PZT miksi denenmiştir (Premix EX Taq(2X), Takara, Japonya).

Bu değişikliklerle amplifikasyon sinyali ve ct değerlerinde ilk deneme testlerine göre bir iyileşme saptanmamıştır ve test prosedürüne değişiklik yapılmadan aynen devam etme kararı alınmıştır.

### **6.3. Plazmid standartın kantitatif değerinin belirlenmesi:**

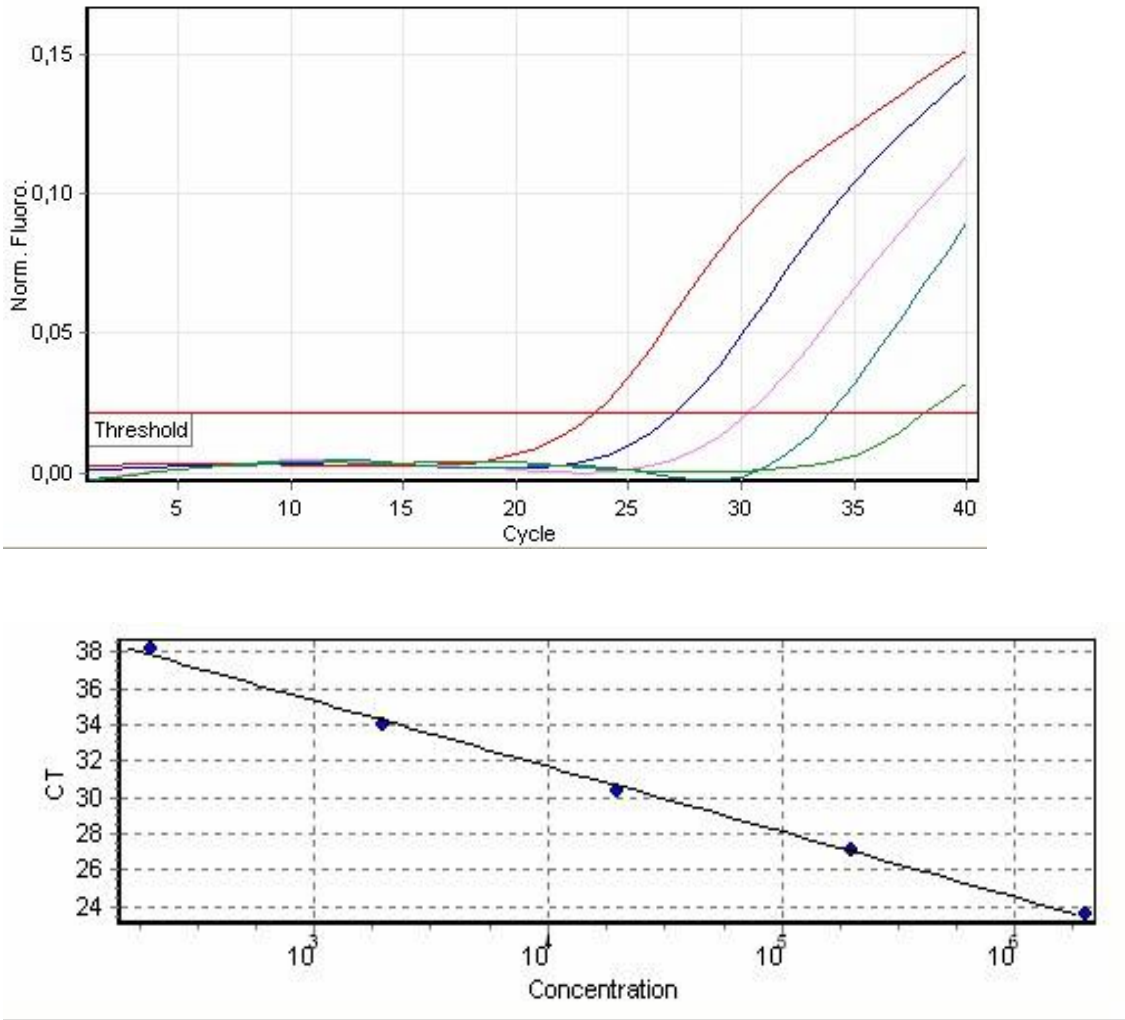
Bilinen miktarda HBV DNA içeren standartlar ile plazmid dilüsyonları birlikte çalışılarak, ct değerleri karşılaştırılmıştır. Bu amaçla iki farklı standart kullanılmıştır: 500 IU/ml HBV DNA içeren standart (NIBSC, İngiltere) ve Optiquant HBV DNA kantitasyon paneli (Acrometrix, ABD).

1/10<sup>7</sup> plazmid ekstrakt dilüsyonunun HBV DNA miktarının, 5000 IU/ml olduğu belirlenmiştir.

#### 6.4. “In-house” testin (yeni test) validasyonu:

##### 6.4.1. Doğrusallık (“Linearite”)

##### 6.4.1.1. “OptiQuant HBV DNA Quantification Panel” ile doğrusallık



**Şekil 23:** Yeni testte “OptiQuant HBV DNA Quantification Panel” dilüsyonları çalışıldığında elde edilen amplifikasyon eğrileri ve standart eğri

“OptiQuant HBV DNA Quantification Panel” dilüsyonları çalışıldığında reaksiyon etkinliği: 0.89 - 1.068 olarak bulunmuştur.



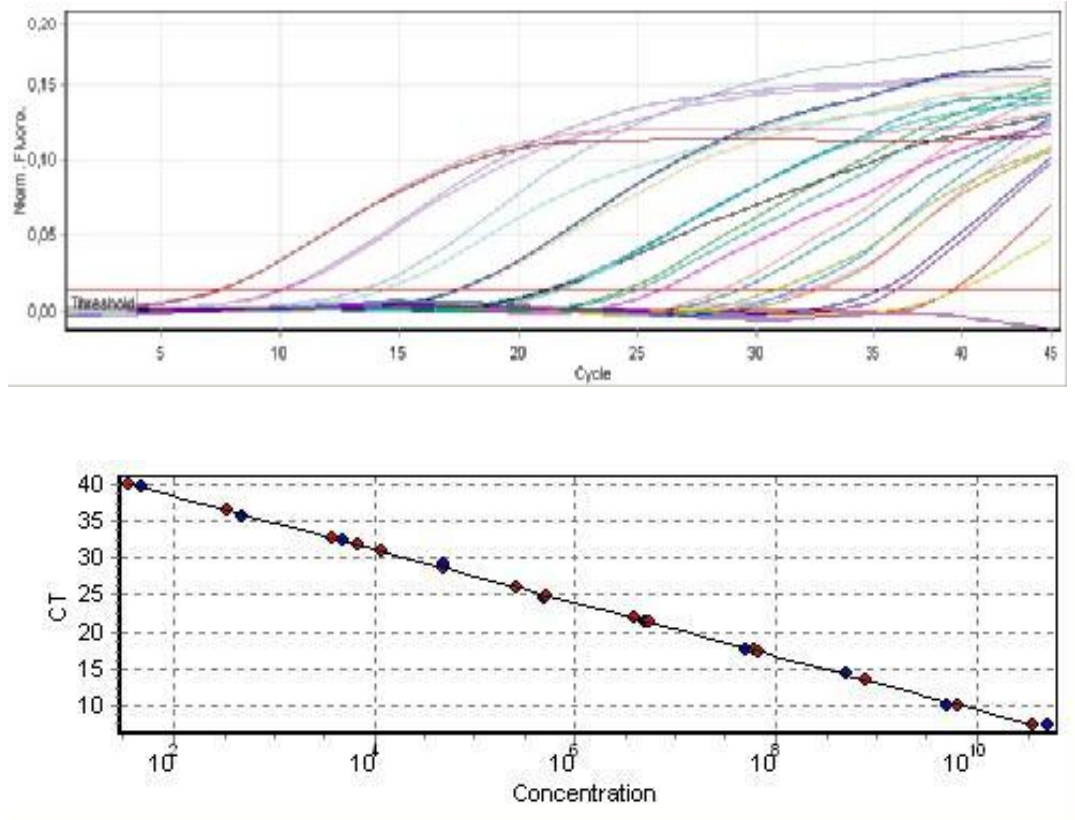
Standart eğrinin  $2 \times 10^2$  ve  $2 \times 10^6$  IU/ml kantitasyon aralığında lineer olduğu saptanmıştır.

#### 6.4.1.2. Plazmid standartları ile doğrusallık

Plazmid standartları ile reaksiyon etkinliği: 0.90 - 0.96 olarak bulunmuştur. Standart eğrinin  $5 \times 10^3$  ve  $5 \times 10^7$  IU/ml aralığında lineer olduğu saptanmıştır.

#### 6.4.1.3. Doğrusallıkta uç noktaların belirlenmesi

Bu çalışmada,  $5 \times 10^1$  ile  $5 \times 10^{10}$  IU/ml arasında HBV DNA içeren onar katlık plazmid dilüsyonları kullanılmıştır. Standart eğrinin, eldeki en düşük ve en yüksek miktarda HBV DNA içeren örneklerle sınırlanan aralıkta lineer olduğu saptanmıştır.



**Şekil 24:** Doğrusallık uç noktalarının belirlenmesi çalışmasında elde edilen amplifikasyon eğrileri ve standart eğri

#### 6.4.2. Analitik duyarlılık (saptama alt sınırı)

Saptama alt sınırını belirlemek amacıyla, 100 IU/ml'den başlayarak azalan miktarlarda HBV DNA içeren altı dilüsyon kullanılarak probit analizi yapılmıştır. Kullanılan dilüsyonlar ve çalışma protokolü tablo 7'de özetlenmiştir.

**Tablo 7:** Probit analizinde kullanılan HBV DNA dilüsyonları ve saptama sayıları

HBV DNA içeriği	Tekrar sayısı	Saptama sayısı
100 IU/ml	9	9
50 IU/ml	9	8
25 IU/ml	9	8
12.5 IU/ml	9	7
6.25 IU/ml	9	4
3.125 IU/ml	9	2

Her bir dilüsyon dokuz kez çalışılmış ve elde edilen saptama sayıları gösterilmiştir.

Probit analizi sonucunda, % 95 oranında pozitif saptanan en düşük konsantrasyon (yeni testin analitik duyarlılığı) 48 IU/ml (32 – 129) olarak saptanmıştır.

#### 6.4.3. Tekrarlanabilirlik (“precision”)

Tekrarlanabilirlik çalışmaları ct değerleri üzerinden yapılmıştır.

- a) Test içi tekrarlanabilirlik: Altı adet pozitif, üç adet zayıf pozitif örnek aynı çalışmada üçer kez çalışılmıştır. En düşük ve en yüksek % CV değerleri % 0,7 ile % 4,1 olarak saptanmıştır.
- b) Testler arası tekrarlanabilirlik: İki adet pozitif, bir adet zayıf pozitif örnek üç farklı günde birer kez çalışılmıştır. En düşük ve en yüksek % CV değerleri % 0,3 ile % 1,9 olarak saptanmıştır.

#### 6.4.4. HBV genotiplerinin, viral DNA kantitasyonuna olan etkisinin belirlenmesi

Bu amaçla, farklı genotiplerde ve bilinen miktarlarda HBV DNA içeren “QCMD 2007 Hepatitis B Virus Genotyping HBVG07 Proficiency Programme” (QCMD, İngiltere) paneli kullanılmıştır. Paneldeki tüm genotipler, yeni test ile saptanmıştır. Ancak genotip B ve C içeren panel üyelerinde beklenen değer altında sonuçlar elde edilmiştir.

**Tablo 8:** “QCMD 2007 Hepatitis B Virus Genotyping HBVG07 Proficiency Programme”  
genotip paneli örneklerinde beklenen ve elde edilen sonuçlar

Örnek numarası	Genotip	Beklenen HBV DNA değeri			Yeni test ile belirlenen HBV DNA değeri	
		kopya/ml	IU/ml	log <sub>10</sub>	IU/ml	log <sub>10</sub>
HBVG07-01	E	40000	5714 - 8000	3.7 – 3.9	5741	3.7
HBVG07-02	A	40000	5714 - 8000	3.7 – 3.9	6552	3.8
HBVG07-03	C	40000	5714 - 8000	3.7 – 3.9	119	2
HBVG07-04	-	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
HBVG07-05	D	40000	5714 - 8000	3.7 – 3.9	4533	3.6
HBVG07-06	B	40000	5714 - 8000	3.7 – 3.9	99	2
HBVG07-07	A+G	80000	11 428 - 16000	4 – 4.2	82 882	4.9
HBVG07-08	G	40000	5714 - 8000	3.7 – 3.9	8432	3.9

Genotip B ve C’de yaşanan bu sorun nedeniyle, yeni testte kullanılan primer ve prob dizilerinin farklı HBV DNA genotipleri ile uyumu yeniden değerlendirilmiştir. Bu amaçla GenBank’den farklı genotiplerdeki 56 adet HBV tüm genom dizisi indirilmiş ve primer ve prob dizileri tekrar incelenmiştir. B ve C genotiplerinde saptama sorununa neden olabilecek düzeyde bir primer – prob bağlanma sorunu olmadığı gözlenmiştir. Prob bölgesindeki genotipe bağlı nükleotid değişiklikleri nedeniyle, problarda dejenere nükleotidler bulunmaktadır.

Yeni testte kullanılan primer ve prob dizilerinin çeşitli HBV genotiplerine ait dizilerle olan ilişkisi aşağıda tablo 9’da gösterilmiştir.

**Tablo 9:** Yeni testin primer ve problemlerinin GenBank dizileriyle uyumu  
***HBV F primeri: 5'- GGACCCCTGCTCGTGTTACA -3'***

	10	20
NC_003977	GGACCCCTGCTCGTGTTACA	
AF297621 A	.....	
AF297623 A-adw2	.....	
AF297624 A-adw2	.....	
AF297625 A-adw2	.....	
U87742 A	.....C.....	
AB033554 B-adw	.....	
AB033555 B-adw	.....	
EU306684 B	.....	
EU306704 B	.....	
EU350409 B	.....	
AF282917 B-B1	.....	
AF282918 B-B2	.....	
AB368295 B-B4	.....C.....	
AB033551 C-adw	.....	
AB033552 C-adw	.....	
AB195947 C	.....	
AB195948 C	.....	
AB195949 C	.....	
AB195950 C	.....	
AB195951 C	.....	
AB195952 C	.....	
AB195953 C	.....	
AB195954 C	.....	
AB195955 C	.....	
AB195956 C	.....	
AB195957 C	.....	
AB202071 C	.....	
AB202072 C	A.....	
AB368296 C-C2	.....	
AY066028 C-adw	.....	
AB368297 C-C2	.....	
AF411412 C-adr	.....	
AF458664 C-adr	.....	
AF458665 C-adr	.....	
EU306727 C	.....	
EU306728 C	.....C.....	
EU306729 C	.....	
AJ344116 D	.....	
AJ344117 D	.....T.....	
AB056515 D	.....	
AM422939 D	.....T.....	
AM422939 D	.....T.....	
AF280817 D-D1	.....	
AY721605 D-ayw	.....	
AY721606 D-ayw	.....	
AY721607 D-ayw	.....	
X75657 E	.....	
X75664 E	.....	
AY090456 F-ayw4	.....	
X75658 F	.....	
AY090458 F-adw4	.....	
AY090459 F-adw4	.....	
AF405706 G	.....	
AY090460 H-adw4	A.....T.....	
AY090454 H-adw4	.....T.....	
AY090457 H-adw4	.....T.....	

**HBV R primeri: 5'- TCTAGACTCG.GGTGGACTTCTCTC -3'**

	10	20
	-----	-----
NC_003977	TCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTC	
AF297621 A	.....	
AF297623 A-adw2	.....	
AF297624 A-adw2	.....	
AF297625 A-adw2	.....	
U87742 A	.....	
AB033554 B-adw	.....	
AB033555 B-adw	.....	
EU306684 B	.....	
EU306704 B	.....	
EU350409 B	.....	
AF282917 B-B1	.....	
AF282918 B-B2	.....	
AB368295 B-B4	.....	
AB033551 C-adw	.....	
AB033552 C-adw	.....	
AB195947 C	.....	
AB195948 C	.....	
AB195949 C	.....	
AB195950 C	.....	
AB195951 C	.....	
AB195952 C	.....	
AB195953 C	.....	
AB195954 C	.....	
AB195955 C	.....	
AB195956 C	.....	
AB195957 C	.....	
AB202071 C	.....	
AB202072 C	.....	
AB368296 C-C2	.....	
AY066028 C-adw	.....	
AB368297 C-C2	.....	
AF411412 C-adr	.....	
AF458664 C-adr	.....	
AF458665 C-adr	.....	
EU306727 C	.....	
EU306728 C	.....	
EU306729 C	.....	
AJ344116 D	.....	
AJ344117 D	.....	
AB056515 D	.....	
AM422939 D	.....	
AM422939 D	.....	
AF280817 D-D1	.....	
AY721605 D-ayw	.....	
AY721606 D-ayw	.....	
AY721607 D-ayw	.....	
X75657 E	.....	
X75664 E	.....	
AY090456 F-ayw4	.....	
X75658 F	.....	
AY090458 F-adw4	.....	
AY090459 F-adw4	.....	
AF405706 G	.....	
AY090460 H-adw4	.....	
AY090454 H-adw4	.....	
AY090457 H-adw4	.....	

**HBV 1 probu: 5'- Fam- TGTTGACAARAATCCTCACAATACCCRCAGA- BHQ-1- 3'**  
**HBV 2 probu: 5'- Fam- CGTTGACAARAATCCTCACAATACCCRCAGA- BHQ-1- 3'**

	10	20	30
NC_003977	TGTTGACAAGAATCCTCACAATACCACAGA		
AF297621 A	.....G.....		
AF297623 A-adw2	.....G.....		
AF297624 A-adw2	.....G.....		
AF297625 A-adw2	.....G.....		
U87742 A	.....G.....		
AB033554 B-adw	C.....	A.....	.....
AB033555 B-adw	.....	A.....	.....
EU306684 B	.....	A.....	.....
EU306704 B	.....	A.....	.....
EU350409 B	.....	A.....	.....
AF282917 B-B1	.....	A.....	.....
AF282918 B-B2	.....	A.....	.....
AB368295 B-B4	.....	A.....	.....
AB033551 C-adw	.....		
AB033552 C-adw	.....		
AB195947 C	.....		
AB195948 C	.....		
AB195949 C	.....		
AB195950 C	.....		
AB195951 C	.....		
AB195952 C	.....		
AB195953 C	.....		
AB195954 C	.....		
AB195955 C	.....		
AB195956 C	.....		
AB195957 C	.....		
AB202071 C	.....		
AB202072 C	.....		
AB368296 C-C2	.....G.....		
AY066028 C-adw	.....		
AB368297 C-C2	.....		
AF411412 C-adr	.....		
AF458664 C-adr	.....		
AF458665 C-adr	.....T.....		
EU306727 C	.....		
EU306728 C	C.....	.....	.....
EU306729 C	.....		
AJ344116 D	.....G.....		
AJ344117 D	.....G.....		
AB056515 D	.....G.....		
AM422939 D	.....G.....		
AM422939 D	.....G.....		
AF280817 D-D1	.....G.....		
AY721605 D-ayw	.....G.....		
AY721606 D-ayw	.....G.....		
AY721607 D-ayw	.....G.....		
X75657 E	.....	A.....	G.....
X75664 E	.....	A.....	G.....
AY090456 F-ayw4	.....	A.....	.....
X75658 F	.....	A.....	.....
AY090458 F-adw4	.....	A.....	.....
AY090459 F-adw4	.....	A.....	.....
AF405706 G	.....		
AY090460 H-adw4	.....	A.....	.....
AY090454 H-adw4	.....	A.....	.....
AY090457 H-adw4	.....	A.....	.....

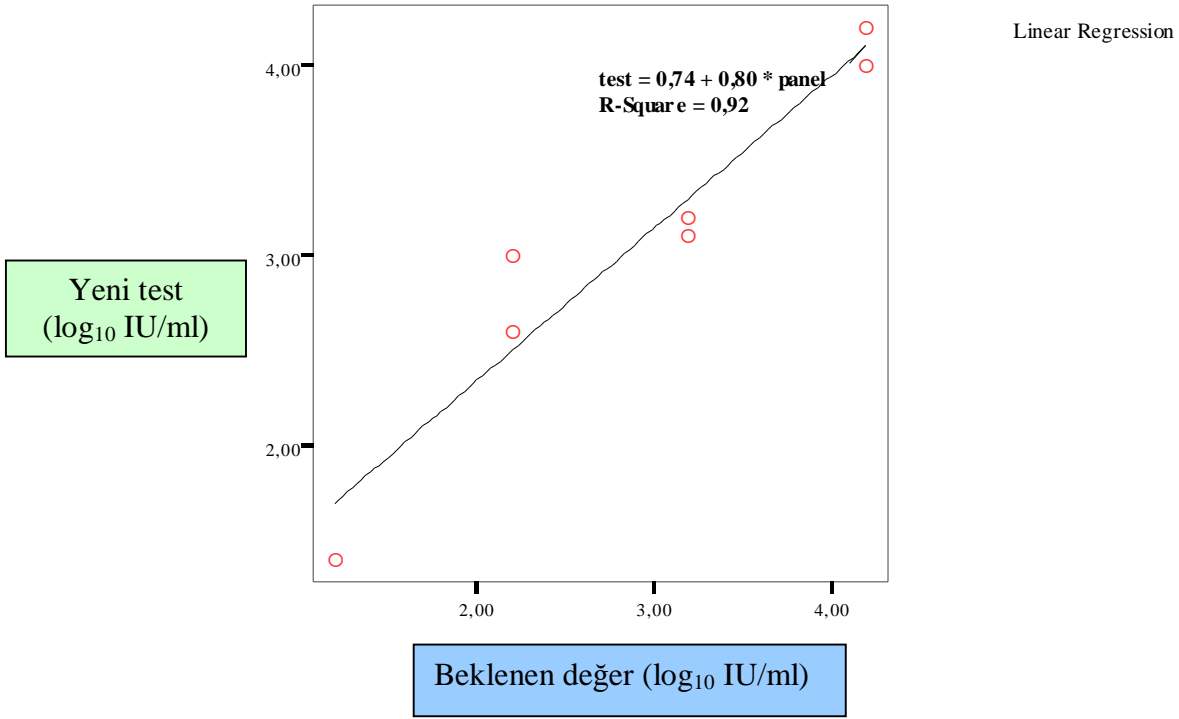
#### 6.4.5. Doğruluk (“accuracy”)

Yeni testle, 2007 HBV DNA dış kontrol paneli (QCMD, İngiltere) çalışılmıştır.

**Tablo 10:** HBV DNA dış kontrol paneli kullanılarak yapılan doğruluk çalışması sonuçları

Örnek ve genotipi	Beklenen değer			Yeni test ile sonuç	
	Kopya/ml	IU/ml	log <sub>10</sub>	IU/ml	log <sub>10</sub>
QCMD07-1 (D)	10 000	1 428 - 2 000	3.1 – 3.3	1 245	3.1
QCMD07-2 (A)	1000	142 - 200	2.1 – 2.3	403	2.6
QCMD07-3 (D)	1000	142 – 200	2.1 – 2.3	1 096	3
QCMD07-4 (D)	100 000	14 285 - 20 000	4.1 – 4.3	10 239	4
QCMD07-5 (A)	100	14 - 20	1.1 – 1.3	31	1.4
QCMD07-6 (A)	100 000	14 285 - 20 000	4.1 – 4.3	15 587	4.2
QCMD07-7	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
QCMD07-8 (A)	10 000	1 428 - 2 000	3.1 - 3.3	1 670	3.2

Dış kalite kontrol panelinin yeni testle çalışılması ile elde edilen sonuçlar, beklenen değerlerle uyumlu olarak saptanmıştır. Lineer regresyon analizinde, R<sup>2</sup> değeri 0.92 olarak saptanmıştır.



Şekil 25: Doğruluk çalışması lineer regresyon analizi grafiği

#### 6.4.6. Hasta örnekleri kullanılarak standart testle yeni testin karşılaştırılması

- a) Ticari testle HBV DNA pozitif olarak saptanan 180 adet hastaya ait plazma örneği ve ticari testle HBV DNA negatif saptanan 80 adet örnek yeni testle çalışılmıştır.
- a. İki testin sonuçlarının kalitatif değerlendirmesi yapılmıştır. Ticari test altın standart olarak alınarak yeni testin duyarlılık ve özgülüğü belirlenmiştir. Ticari testle HBV DNA pozitif olan iki örnek yeni testle HBV DNA negatif olarak saptanmıştır. Ticari testle HBV DNA negatif olan beş örnek yeni testle HBV DNA pozitif olarak saptanmıştır. Test sonuçları uyumsuz olan yedi örnek tekrar çalışılmıştır, ikinci çalışmada da sonuçlar değişmemiştir. Kalitatif sonuçlar aşığıdaki tabloda özetlenmiştir:

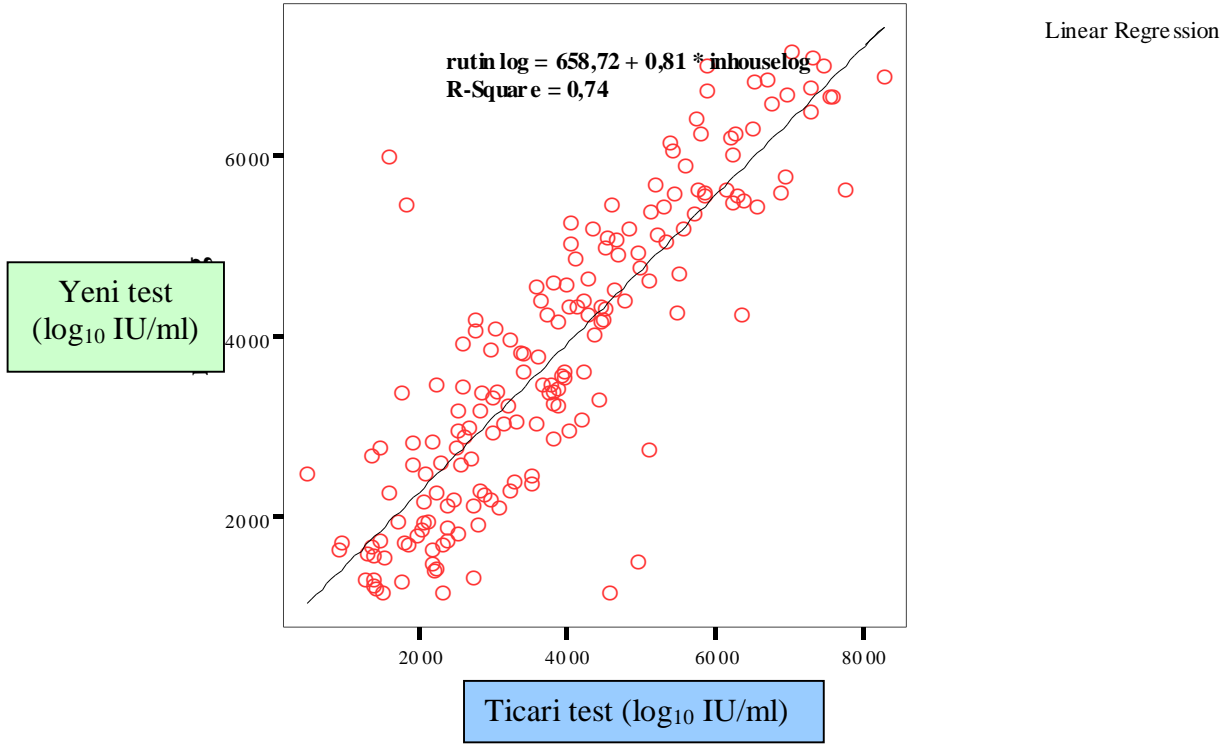


**Tablo 11:** Hasta örneklerinin ticari test ve yeni test ile HBV DNA kalitatif sonuçları

	Ticari test HBV DNA (+)	Ticari test HBV DNA (-)
Yeni test HBV DNA (+)	<b>178</b>	<b>5</b>
Yeni test HBV DNA (-)	<b>2</b>	<b>75</b>

Yeni testin duyarlılığı(178/180) % 99,özgüllüğü(75/80) % 94 olarak saptanmıştır.

- b. Her iki testle pozitif saptanan 178 örneğin kantitatif sonuçlarının arasındaki uyum lineer regresyon analizi ile değerlendirilmiştir. Aralarında güçlü ve anlamlı bir korelasyon olduğu saptanmıştır ( $r= 0.86$ ,  $p=0.000$ ,  $R^2= 0.74$ ).



**Şekil 26:** Yüz yetmiş sekiz örneğin ticari test ve yeni test ile elde edilen HBV DNA kantitatif sonuçlarının lineer regresyon analizi grafiği

#### 6.4.7. Yalancı pozitifliğin değerlendirilmesi

Yalancı pozitiflik olasılığını değerlendirmek için HCV RNA pozitif, HBsAg ve HBV DNA negatif 26 örnek yeni test ile çalışılmıştır. Tümü HBV DNA negatif saptanmıştır.

### **6.5. Maliyet analizi:**

Yeni testin birim maliyeti, kullanılan malzeme fiyatlarına göre hesaplanmış, personel giderleri hesaplama katılmamıştır. Buna göre, yeni test ile örnek başına maliyet 30 TL iken ticari testin 2008 yılı için örnek başına maliyeti 75 TL'dir.

## 7. TARTIŞMA

Dünyada iki milyar kişi (dünya nüfusunun yaklaşık üçte biri) HBV ile karşılaşmıştır ve bunların arasından 400 milyon kişinin kronik HBV enfeksiyonu olduğu bildirilmektedir. Her yıl dünyada yaklaşık 1.000.000 kişi, HBV enfeksiyonu ile ilgili komplikasyonlardan kaybedilmektedir (3, 72). Ülkemizde HBsAg pozitifliğinin %1-14,3 arasında değişmekte olduğu gözlenmiştir, ortalama esas alındığında orta endemisite ülkeleri arasında yer almaktadır (52). HCC gelişmesinde HBV enfeksiyonu en önemli risk faktörü olarak kabul edilmektedir. HBV ile kronik enfekte olgularda, yaşam boyu HCC gelişme riski %10-25'tir ve enfeksiyonun başlamasından 30-50 yıl sonra gelişmektedir. Hastada siroz gelişmişse HCC riski daha da artmaktadır (52, 66). Türkiye'de farklı bölgelerde yaşayan HCC hastalarında yapılan bir araştırmada 207 HCC'li hastanın 116'sında (%56) HBV etiyolojik neden olarak saptanmıştır (73).

Ülkemizde de sık rastlanan bir enfeksiyon etkeni olan HBV'nin erken tanısı ve tedavisi, bulaşmanın kontrolü, korunma ve komplikasyonların önlenmesi açısından önemlidir. HBV enfeksiyonunun virolojik tanısı ve izlenmesi, özgül antikorların, antijenlerin, ve nükleik asidin saptanması ve kantitasyonu ile yapılmaktadır. HBV DNA'nın kanda gösterilmesi aktif HBV enfeksiyonunun güvenilir bir göstergesidir ve enfeksiyon tanısında, evrelendirilmesinde, tedaviye karar vermede ve tedavi başarısının izlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Tipik bir HBV enfeksiyonu sırasında HBV DNA HBsAg'den 3-5 hafta önce saptanabilmektedir. Bu nedenle HBV DNA testleri erken tanı ve kan bankacılığında önem kazanmaktadır (3).

Bu çalışmada, internal kontrol içeren, kantitasyona dayalı bir "in-house" gerçek zamanlı PZT testi geliştirilmiştir ve ticari bir testle (HBV RG PCR kit, QIAGEN) uyumu incelenmiştir. Kantitatif bir PZT testi geliştirilirken testin validasyonu için genel kabul görmüş bir çalışma planı yoktur. Ancak 2007'de yayınlanmış olan bir derlemede (58) "in-house" kantitatif PZT testinin validasyonunda hangi parametrelerin, nasıl çalışılacağına değinilmiştir. Çalışmamız, bu öneriler dikkate alınarak düzenlenmiştir. Geliştirdiğimiz "in-house" test, metinde *yeni test* ifadesiyle tanımlanmaktadır

Günümüzde HBV DNA saptamada, nükleik asit amplifikasyon testlerinden olan PZT esaslı testler en sık kullanılanlardır İlk nükleik asit amplifikasyon testlerinin kalitatif olması nedeniyle, HBV'nin dinamik döngüsünü anlamada yetersiz kalınmıştır. Kalitatif konvansiyonel PZT testlerine bakıldığında, duyarlılıklarının nisbeten yüksek olması,

tekrarlanabilirliklerinin düşük olması, “carryover” kontaminasyon oranlarının yüksek olması gibi nedenlerle kullanımları sınırlanmaktadır. Gerçek zamanlı PZT düşüncesi Saiki ve arkadaşları tarafından 1985’te tanımlanmıştır (61). Holland ve arkadaşları 1991’de gerçek zamanlı PZT yöntemini hayata geçirmişlerdir (24). PZT’nin dönemlerine bakıldığında döngünün sonlarına doğru oluşan ürünün sayısal değerinin örneğin içindeki virus miktarıyla orantılı olmadığı görülür. Bunun en önemli nedenlerinden biri son döngülere gelindiğinde kullanılma nedeniyle miks içeriğinin (enzim, dNTP, primer) azalmasıdır. PZT’nin ilk döngülerinde ise örnekteki virus miktarıyla oluşan ürün miktarı doğru orantılı olarak artmaktadır (10). Gerçek zamanlı PZT yönteminde amplifikasyon sırasında her döngüde prob sinyali ölçülerek, eşik değeri aşan döngüye (ct) göre kantitatif değer belirlendiğinden, bu yöntemle klasik PZT yöntemine göre daha doğru kantitatif sonuçlar elde edilebilmektedir.

Kronik hepatitli hastalarda, plazma HBV DNA düzeyleri çok farklı konsantrasyonlarda bulunabilmektedir. Bazı hastalarda HBV  $>10^9$  kopya/ml düzeylerinde replike olurken, bazı kronik hastalarda (özellikle HBeAg negatif olgularda) düşük HBV DNA düzeyleri saptanabilmektedir. Bu nedenle HBV DNA kantitasyonu yapılan testlerin dinamik aralıklarının geniş olması gerekmektedir. Gerçek zamanlı PZT’nin dinamik aralığı, klasik PZT’ye oranla çok daha geniştir (en az altı  $\log_{10}$ ). Hızlı, doğru ve tekrarlanabilir sonuçlar elde edilebildiği için tanı veya tedavi takibinde gerçek zamanlı PZT yönteminin kullanımı artmıştır (38). Çalışmamızda bu nedenlerle gerçek zamanlı PZT yöntemi tercih edilmiştir.

Çok sayıda HBV DNA saptayan ticari gerçek zamanlı PZT kiti bulunmaktadır. Dünyada olduğu gibi ülkemizde de ticari, kantitatif, gerçek zamanlı PZT testleri HBV’nin tanı ve takibinde sıklıkla kullanılmaktadır. Ülkemizde kullanılan ticari gerçek zamanlı kantitatif HBV DNA testlerinin hemen hepsi yabancı firmaların üretimidir. İontek isimli yerli firmanın ürettiği ticari kit bu durumun tek istisnasıdır ancak yaygın olarak kullanılmamaktadır. Ticari ve “in-house” gerçek zamanlı HBV DNA testleri geliştirilmekte (10, 13, 26, 38, 53) ve “in-house” gerçek zamanlı HBV DNA testleri de rutin olarak kullanıma girmektedir (54). Bu çalışmada rutin olarak hasta tanı ve takibinde kullanılacak bir test geliştirilmesi planlanmıştır. Çalışma, bu yönüyle laboratuvarımız için ilk örnektir. .

PZT testlerinde sonucu etkileyebilecek önemli sorunlardan biri yalancı negatifliktir. Ekzojen bir nükleik asidin örneğe eklenmesi ile analitik dönemde yalancı negatifliğe yol açabilecek faktörlerin kontrolü sağlanabilmektedir. İnternal kontrol olarak nükleik asit ya da

tam virus kullanılabilir. İnternal kontrol ekstraksiyon veya amplifikasyon sırasında eklenebilir. Tam virusun internal kontrol (İK) olarak kullanılması, hedeflenen virusa benzediği için testteki sorunları daha iyi gösterebilmektedir. Bu nedenle çalışmamızda internal kontrol olarak, insanda enfeksiyon yapmayan, zarflı bir DNA virusu olan, hücre kültüründe üretilmiş BHV-1 kullanılmıştır. İnternal kontrolün ekstraksiyondan önce örneğe eklenmesi hem ekstraksiyon hem de amplifikasyon basamaklarını izlemeyi sağlamaktadır. Çalışmamızda İK örneğe ekstraksiyondan önce eklenmiştir. Böylece ekstraksiyon ve amplifikasyon basamaklarındaki sorunlar doğru şekilde izlenebilmiştir.

Kantitasyon standardı olarak, tam virus içeren örneklerin kullanılması idealdir. Standardize edilmiş, içinde bilinen miktarda HBV içeren ticari panellerin maliyeti çok yüksek olduğundan her testte standart olarak kullanılması mümkün değildir. Alternatif olarak HBV pozitif hasta örneğinden hazırlanacak serum/plazma havuzu veya klonlanmış ürünler standart olarak kullanılabilir. Ancak havuz hazırlamada dahil edilecek tüm örneklerin genetik incelemelerinin yapılarak kullanılması ve havuz büyüklüğünün uzun vadeli çalışmalara yetecek şekilde hazırlanması standardizasyonun sağlanmasında önemli parametrelerdir. Bu nedenle çalışmamızda, koşullarımıza daha uygun olan klonlanmış plazmid kullanımı tercih edilmiştir. Paraskevis ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada “home-made” plazmid standartları ile yüksek miktarda HBV içeren hasta serumu havuzundan oluşturulmuş standartlar karşılaştırılmış benzer sonuçlar alındığı bildirilmiştir (53). Absolü kantitasyon yöntemi kullanılan çalışmamızda, plazmid kökenli beş adet kantitasyon standardı, her çalışmaya alınmış ve elde edilen standart eğri kullanılmıştır.

Gerçek zamanlı PZT testlerinin duyarlılıkları ve saptama limitleri, klasik PZT’ye oranla on kat daha iyidir (13). PZT’ye alternatif bir diğer yöntem olan sinyal amplifikasyon temeline dayanan dallı-DNA (bdNA) testleri HBV DNA saptanması için kullanılan, tekrarlanabilirlikleri yüksek testlerdir. Bu grup testleri kullanımlarını sınırlayan en önemli dezavantaj duyarlılıklarının düşük olmasıdır ( $7.5 \times 10^5$  kopya/ml) (13, 26). Gerçek zamanlı HBV DNA PZT testlerinin duyarlılıkları 10 -15 IU/ml, dinamik aralıkları 8-9 log<sub>10</sub> IU/ml olarak bildirilmektedir (18, 37). Kronik HBV hastalarında serumda HBV DNA düzeylerinde oynamalar olabilmektedir (0 ile  $>2 \times 10^6$  IU/ml düzeyleri) (37). Bazı hastalarda HBV DNA kanda  $10^9$  kopya/ml düzeylerini aşabilmektedir (38). Yeni testin dinamik aralığı  $5 \times 10^1$  -  $5 \times 10^{10}$  IU/ml ve en düşük saptama sınırı 48 IU/ml (32 – 129) olarak saptanmıştır. Bu dinamik

aralık ve duyarlılık HBV tanısı, takibi ve tedavi izlemi için rehberlerde önerilen uygun değerlerdir (18, 37).

Testin tekrarlanabilirliği, sonuçların güvenilirliği ve hasta izleminde anlam ifade edecek değişiklik miktarının belirlenmesinde önemlidir. Ct değerleri üzerinden yapılan değerlendirmede, yeni testte % CV değerleri, test içi değerlendirmede % 0,7 - % 4,1; testler arası değerlendirmede % 0,3 - % 1,9 olarak saptanmıştır. Bu değerler ticari testlerle karşılaştırıldığında kabul edilebilir sınırlar içindedir. Örnek olarak çalışmamızda validasyonda kullandığımız ticari testin ct değerleri üzerinden yapılan % CV değerleri, test içi değerlendirmede % 0.32 - % 1.06; testler arası değerlendirmede % 0,49 - % 1 olarak bildirilmektedir (2).

Kantitatif bir nükleik asid testinin, hedefteki genotip farklılıklarından etkilenmemesi istenir. HBV genotiplerinin viral DNA kantitasyonuna olan etkisinin belirlenmesi çalışmasında kullanılan paneldeki tüm genotiplere ait (A, B, C, D, E, G) örnekler yeni testle saptanmıştır. Ancak, genotip B ve C içeren panel üyelerinde beklenen değer yaklaşık iki logaritma altında sonuçlar elde edilmiştir. Bu durumun nedenini araştırmak amacıyla farklı genotiplerdeki 56 adet HBV tüm genom dizisi üzerinde yeni testte kullanılan primer ve prob dizileri hizalanarak tekrar incelenmiştir. Hizalama sonucunda B ve C genotiplerinde saptama sorununa neden olabilecek düzeyde bir primer – prob bağlanma sorunu olmadığı gözlenmiştir. Kullanılan problemler farklı genotiplerdeki G/Adeğişikliklerini yakalayabilecek şekilde tasarlanmış iki adet dejenere nükleotid içermektedir (tablo 9). Sorunun kaynağını saptamaya yönelik olarak B ve C genotipini taşıyan panel üyelerinin sekansının yapılması düşünülmüştür ancak çalışma süresindeki kısıtlılık nedeniyle gerçekleştirilememiştir. Türkiye’deki hemen tüm hastaların D genotipindeki HBV ile enfekte olması nedeniyle farklı genotiplere ait hasta örneği bulunamamıştır. Yeni testin bu tür hasta örnekleriyle çalışılması ve ticari testlerle arasındaki uyumun farklı örneklerle araştırılmasının uygun olacağı düşünülmüştür.

Doğruluk çalışmasında, HBV DNA dış kalite kontrol panelinin (QCMD, İngiltere) yeni testle çalışılması ile elde edilen sonuçlar, beklenen değerlerle uyumlu olarak saptanmıştır ( $R^2 = 0.92$ ).

Ticari test ve yeni testin karşılaştırıldığı çalışmada, ticari testle HBV DNA (+) saptanan 180 örnek ve ticari testle HBV DNA (-) saptanan 80 örnek yeni testle de çalışılmıştır. Kalitatif sonuçlara bakıldığında toplam yedi örnekte uyumsuzluk saptanmıştır (ticari testle HBV DNA pozitif olan iki örnek yeni testle HBV DNA negatif olarak

saptanmıştır; ticari testle HBV DNA negatif olan beş örnek yeni testle HBV DNA pozitif olarak saptanmıştır). Test sonuçları uyumsuz olan yedi örnek tekrar çalışılmıştır, ikinci çalışmada da sonuçlar değişmemiştir. Bu örneklerin kantitatif sonuçlarına bakıldığında tümünün HBV DNA IU/ml değerlerinin düşük olduğu saptanmıştır ( < 20 IU/ml). Bu örneklerin serolojileri değerlendirildiğinde, tümünün HBsAg (+) ve total anti-HBc (+) olduğu görülmüştür. Sonuçlardaki uyumsuzluğun testler arası duyarlılık farkından ve HBV DNA'nın ekstraksiyona giren plazma örnekleri içindeki dağılım farkından (poisson dağılımı) olabileceği düşünülmüştür. Her iki testle de HBV DNA pozitif saptanan örneklerin (178 adet) kantitatif sonuçları arasındaki uyum, lineer regresyon analizi ile değerlendirilmiştir. Aralarında güçlü ve anlamlı bir korelasyon olduğu saptanmıştır ( $r= 0.86$ ,  $p=0.000$ ,  $R^2= 0.74$ ).

Yalancı pozitifliğin değerlendirildiği çalışmada hepadnaviridae ailesinde HBV DNA ile genetik benzerlik gösteren başka bir insan virusu bulunmamaktadır. Bu nedenle kronik hepatit yapabilen HCV RNA pozitif plazmalar kullanılmıştır. Yalancı pozitiflik saptanmamıştır. Primer-prob dizilerinin Blast programıyla yapılan incelemesinde de çapraz pozitifliğe yol açabilecek bir benzerlik belirlenmemiştir.

Hastanemizde yapılan rutin moleküler mikrobiyoloji laboratuvarı testlerinin yaklaşık yarısını HBV DNA testi oluşturmaktadır, yılda yaklaşık 1500 adet HBV DNA testi çalışılmaktadır. Maliyet analizine göre yeni test, ticari teste göre, test başına 45 TL daha ucuzdur. Yeni testin rutinde kullanılması durumunda elde edilecek maddi yarar, yılda yaklaşık 67500 TL olarak hesaplanmıştır.

Çalışmanın sonuçları göstermektedir ki yeni test, duyarlı bir saptama ve geniş bir dinamik aralıkta kantitasyon olanağı sağlamaktadır. Testin tekrarlanabilirliği, halen rutinde kullanılan ticari testle benzerlik göstermektedir. Testin doğruluğu, referans örnekler ve dış kalite kontrol panelleriyle gösterilmiş; duyarlılığı % 99, özgüllüğü %94 olarak bulunmuştur. Ülkemizdeki çalışmalarda sadece genotip D saptanmıştır. Bu nedenle yeni testin genotip B ve C'deki kısmi kantitasyon sorununun rutin hizmette soruna yol açmayacağı varsayılabilir. Sonuç olarak; amacımızdaki kriterleri karşılayan (internal kontrol içirme, geniş bir dinamik aralıkta kantitasyon yapabilme, en az 100 IU/ml' lik analitik duyarlılığa sahip olma, tüm genotipleri saptayabilme, yüksek tekrarlanabilirlik, düşük maliyet) yeni bir HBV DNA kantitasyon testi geliştirilmiştir.

## 8. KAYNAKLAR

1. Aritomi T, Yatsushashi H, Fujino T, Yamasaki K et al. Association of mutations in the core promoter and precore region of hepatitis virus with fulminant and severe acute hepatitis in Japan. *J Gastroenterol Hepatol* 1998; 13(11): 1125-32.
2. Artus HBV RG PCR kit handbook – QIAGEN. Mart 2007: versiyon 1.
3. Badur S: Viral Hepatitler (HAV, HBV, HDV) Eds: Ustaçelebi Ş. Abacıoğlu H, Badur S. *Moleküler Klinik ve Tanısal Viroloji*. Ankara, 2004: 183 – 98.
4. Baumert TF, Thimme R, von Weizsacker F. Pathogenesis of hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 83-90.
5. Beck J, Nassal M. Hepatitis B virus replication. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 48-64.
6. Beltrami EM, Williams IT, Shapiro CN, Chamberland ME. Risk and management of blood-borne infections in health care workers. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13: 385-407.
7. Berger A, Preiser W. Viral genome quantification as a tool for improving patient management: The example of HIV, HBV, HCV and CMV. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49: 713-21.
8. Bozdayı AM, Aslan N, Bozdayı G et al. Molecular epidemiology of hepatitis B, C and D viruses in Turkish patients. *Arch Virol* 2004; 149: 2115-29.
9. Bozdayı AM, Uzunalimoğlu Ö, Türkyılmaz AR, Aslan N et al. YSDD: a novel mutation in HBV DNA polymerase confers clinical resistance to lamivudine. *J Viral Hepat* 2003; 10: 256-65.
10. Brechtbuehl K, Whalley SA, Dusheiko GM, Saunders NA. A rapid real-time quantitative polymerase chain reaction for hepatitis B virus. *J Virol Methods* 2001; 93: 105-13.
11. Bruss V. Hepatitis B virus morphogenesis. *World J Gastroenterol*. 2007; 13: 65-73.
12. Chen CH, Lee CM, Wang JH, Tung HD et al. Correlation of quantitative assay of hepatitis B surface antigen and HBV DNA levels in asymptomatic hepatitis B virus carriers. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16: 1213-8.
13. Chen RW, Piiparinen H, Seppanen M, Koskela P et al. Real-Time PCR for Detection and Quantitation of Hepatitis B Virus DNA. *J Med Virol* 2001; 65: 250-6.



14. Chen WN, Oon CJ, Koh S. Horizontal transmission of a hepatitis B virus mutant. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 938-9.
15. Cooper A, Paran N, Shaul Y. The earliest steps in hepatitis B virus infection. *Biochimica et Biophysica Acta* 2003; 89-96.
16. Çakaloğlu Y, Ökten A. Hepatit B Ulusal uzlaşma toplantı metinleri: Birinci baskı. İstanbul Medikal Yayıncılık, İstanbul, 2003; 99-137.
17. Deguchi M, Yamashita N, Kagita M, Asari S et al. Quantitation of hepatitis B surface antigen by an automated chemiluminescent microparticle immunoassay. *J Virol Met* 2004; 115: 217–22.
18. European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2009; 50: 227–42.
19. Friedt M, Gerner P, Lausch E, Trubel H et al. Mutations in the basic core promotor and the precore region of hepatitis B virus and their selection in children with fulminant and chronic hepatitis B. *Hepatology* 1999; 29: 1252-8.
20. Gerlich WH. The enigma of concurrent hepatitis B surface antigen (HBsAg) and antibodies to HBsAg. *Clin Infect Dis* 2007; 44: 1170-2.
21. Glebe D, Urban S. Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 22-38.
22. Gurol E, Saban C, Oral O, Cigdem A et al. Trends in hepatitis B and hepatitis C virus among blood donors over 16 years in Turkey. *Eur J Epidemiol* 2006; 21: 299-305.
23. Hauri AM, Armstrong GL, Hutin YJ. The global burden of disease attributable to contaminated injections given in health care settings. *Int J STD AIDS*. 2004; 15: 7-16.
24. Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'  $\rightarrow$  3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci* 1991; 88: 7276-80.
25. Horvat RT, Tegtmeier GE (çeviri: İyigün CP, Avcı İY): Hepatit B ve D virüsleri. Eds: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller A, Tenover FC, Tenover FC. *Manual of Clinical Microbiology* 2008. 9. baskı, Washington DC. ASM. 2008: 1641-59.
26. Jardi R, Rodriguez F, Buti M, Costa X et al. Quantitative detection of hepatitis B virus DNA in serum by a new rapid real-time fluorescence PCR assay. *J Viral Hepat* 2001; 8: 465-71.

27. Jeong JK, Yoon GS, Ryu WS. Evidence that 5'-end cap structure is essential for encapsidation of hepatitis B virus pregenomic RNA. *J Virol* 2000; 74(12): 5502-8.
28. Kanra G, Tezcan S, Badur S, Turkish national study team. Hepatitis B and measles seroprevalence among Turkish children. *Turk J Pediatrics* 2005; 47: 105-10.
29. Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2000; 118: 554-9.
30. Kıyan M: Hepatit B virusu. Eds: Kılıçturgay K. *Viral hepatit* 1998. 1. baskı, İstanbul. Viral Hepatitle Savaşım Derneği. 1998: 66-106.
31. Knutsson M, Kidd-Ljunggren K. Urine from chronic hepatitis B virus carriers: implications for infectivity. *J Med Virol* 2000; 60: 17-20.
32. Kohmoto M, Enomoto M, Tamori A, Habu D et al. Quantitative detection of hepatitis B surface antigen by chemiluminescent microparticle immunoassay during lamivudine treatment of chronic hepatitis B virus carriers. *J Med Virol* 2005; 75: 235-9.
33. Kohmoto M, Enomoto M, Tamori A, Habu D et al. Quantitative detection of hepatitis B surface antigen by chemiluminescent microparticle immunoassay during lamivudine treatment of chronic hepatitis B virus carriers. *J Med Virol* 2005; 75: 235-9.
34. Leblebicioğlu H, Eroğlu C, Members of the Hepatitis Study Group. Acute hepatitis B virus infection in Turkey: epidemiology and genotype distribution. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 537-41.
35. Lee WM. Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med* 1997; 337: 1733-45.
36. Liou W, Sung YJ, Tao MH, Lo SJ. Morphogenesis of the hepatitis B virion and subviral particles in the liver of transgenic mice. *J Biomed Sci* 2008; 15: 311-6.
37. Lok ASF, McMahon BJ. AASLD Practice Guideline - Chronic Hepatitis B. *Hepatology*. 2007; 45(2): 508-39.
38. Lole KS, Arankalle VA. Quantitation of hepatitis B virus DNA by real-time PCR using internal amplification control and dual TaqMan MGB probes. *J Virol Method* 2006; 135: 83-90.
39. Lovato L, Inman M, Henderson G, Doster A et al. Infection of cattle with a bovine herpesvirus 1 strain that contains a mutation in the latency-related gene leads to increased apoptosis in trigeminal ganglia during the transition from acute infection to latency. *J Virol* 2003; 77: 4848-57.

40. Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 190-212.
41. Mahoney FJ. Update on diagnosis, management, and prevention of hepatitis B virus infection. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 351-66.
42. Marusawa H, Uemoto S, Hijikata M, Ueda Y et al. Latent hepatitis B virus infection in healthy individuals with antibodies to hepatitis B core antigen. *Hepatology* 2000; 31: 488-95.
43. Mayerat C, Mantegani A, Frei PC. Does hepatitis B virus (HBV) genotype influence the clinical outcome of HBV infection? *J Viral Hepat* 1999, 6: 299-304.
44. Milich D, Liang TJ. Exploring the biological basis of hepatitis B e antigen in hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2003; 38: 1075-86.
45. Murray JM, Purcell RH, Wieland SF. The half-life of hepatitis B virions. *Hepatology* 2006; 44: 1117-21.
46. Nassal M. Hepatitis B viruses: Reverse transcription a different way. *Virus Res* 2008; 134: 235-49.
47. Ngu SL, Hallet R, Teo CG. Natural and Iatrogenic Variation in Hepatitis B Virus. *Rev Med Virol* 1999; 9: 183-209.
48. Ngu SL, Watkins RP, Heptonstall J, Teo CG. Selective Transmission of Hepatitis B Virus after Percutaneous Exposure. *J Infect Dis* 2000; 181: 838-43.
49. Nowak MA, Bonhoeffer S, Hill AM, Boehme R et al. Viral dynamics in hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 4398-402.
50. Oketani M, Oketani K, Xiaohong C, Arima T. Low level wild-type and pre-core mutant hepatitis B viruses and HBeAg negative reactivation of chronic hepatitis B. *J Med Virol* 1999; 58: 332-7.
51. Oktun M, Erdogan MS, Tatman-Otkun M, Akata F. Exposure time to hepatitis B virus and associated risk factors among children in Edirne, Turkey. *Epidemiol Infect* 2005; 133: 509-16.
52. Özacar T: Hepatit B virusu. Eds: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. Nobel Tıp Kitabevleri. 2008: 1882-1904.
53. Paraskevis D, Haida C, Tassopoulos N, Raptopoulou M et al. Development and assessment of a novel real-time PCR assay for quantitation of HBV DNA. *J Virol Methods* 2002; 103: 201-12.

54. Pas SD, Fries E, De Man RA, Osterhaus AD et al. Development of a quantitative real-time detection assay for hepatitis B virus DNA and comparison with two commercial assays. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2897-901.
55. Pas SD, Niesters HGM. Detction of HBV DNA using real time analysis. *J Clin Virol* 2002; 25: 93-4.
56. Pasek M, Goto T, Gilbert W, Zink B et al. Hepatitis B virus genes and their expression in *E. coli*. *Nature* 1979; 282: 575-9.
57. Pawlotsky JM. Hepatitis B virus (HBV) DNA assays (methods and practical use) and viral kinetics. *J Hepatol* 2003; 39, Suppl 1:S31-5.
58. Rabenau HF, Kessler HH, Kortenbusch M, Steinhorst A et al. Verification and validation of diagnostic laboratory tests in clinical virology. *J Clin Virol* 2007; 40: 93-8.
59. Robinson WS: Hepadnaviridae: Hepatitis B virus and hepatitis delta virus. Eds: Mandell GL, Douglas RG, Bennelt JE. *Principles and Practice of Infectious Disease*. 5 th ed. Newyork, Churchill Livingstone, 2000: 1652-85.
60. Robinson WS: Hepadnaviridae: Hepatititis B virus and hepatitis delta virus. Eds:Mandell GL, Douglas RG, Bennelt JE. *Principles and Practice of Infectious Disease*. 5 th ed. Newyork, Churchill Livingstone, 2000: 1652-85.
61. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230:1350-4.
62. Sayiner AA, Özcan A, Şengönül A. Naturally occurring MHR variants in Turkish patients infected with hepatitis B virus. *J Med Virol* 2008; 80: 405-10.
63. Sayiner AA, Agca H, Sengonul A, Celik A et al. A new hepatitis B virus vaccine escape mutation in a renal transplant recipient. *J Clin Virol* 2007; 38: 157-60.
64. Schaefer S. Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. *World J Gastroenterol* 2007;13: 14-21.
65. Seeger C, Ganem D, Varmus HE. Nucleotide Sequence of an Infectious Molecularly Cloned Genome of Ground Squirrel Hepatitis Virus. *J Virol* 1984;51: 367-75.
66. Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000; 64: 51-68.

67. Seyec JL, Chouteau P, Cannie I, et al. Role of the pre-S2 domain of the large envelope protein in hepatitis B virus assembly and infectivity. *J Virol* 1998; 72: 5573-8.
68. Seyec JL, Chouteau P, Cannie I, Guguen-Guillouzo C, Gripon P. Infection process of hepatitis B virus depends on the presence of a defined sequence in the pre-S1 domain. *J Virol* 1999; 73: 2052-7.
69. Sheldon J, Rodes B, Zoulim F, Bartholomeuzs A et al. Mutations affecting the replication capacity of the hepatitis B virus. *J Viral Hepat* 2006; 13: 427-34.
70. Shepard CW, Simard EP, Finelli L, Fiore AE et al. Hepatitis B virus infection: epidemiology and vaccination. *Epidemiol Rev* 2006; 28: 112-25.
71. Şentürkler Gültaş N, Abacıoğlu YH. S-gene sequences and genotype-related restriction sites in hepatitis B virus carriers in Turkey. *Infection* 2004; 32: 344-9.
72. Ustaçelebi Ş, Ergünay K: Hepatit B virusunun moleküler viyolojisi. Eds: Tabak F, Balık İ, Tekeli E. *Viral Hepatit 2007*. 1. baskı, İstanbul. Viral Hepatitle Savaşım Derneği. 2007; 96-107.
73. Uzunalimoglu O, Yurdaydın C, Cetinkaya H, Bozkaya H et al. Risk factors for hepatocellular carcinoma in Turkey. *Dig Dis Sci* 2001; 46: 1022-8.
74. Van Thiel DH, De Maria N, Colantoni A, Friandler L. Can hepatitis B core antibody positive livers be used safely for transplantation: hepatitis B virus detection in the liver of individuals who are hepatitis B core antibody positive. *Transplantation* 1999; 68: 519-22.
75. Vranckx R, Alisjahbana A, Meheus A. Hepatitis B virus vaccination and antenatal transmission of HBV markers to neonates. *J Viral Hepat* 1999; 6: 135-9.
76. Wands JR. Prevention of (HBV) hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2004; 351:1567-70.
77. Weber B. Genetic variability of the S gene of hepatitis B virus: clinical and diagnostic impact. *J Clin Virol* 2005; 32: 102-12.
78. Yeh CT, Chien RN, Chu CM, Liaw YF. Clearance of the original hepatitis B virus YMDD-motif mutants with emergence of distinct lamivudine-resistant mutants during prolonged lamivudine therapy. *Hepatology* 2000; 31: 1318-26.
79. Yokosuka O, Arai M. Molecular biology of hepatitis B virus: effect of nucleotide substitutions on the clinical features of chronic hepatitis B. *Med Mol Morphol* 2006; 39: 113-20.