

# ÜLKEMİZDE HEPATİT B VİRUSU (HBV) GENOTİP DAĞILIMI

Davut Özdemir\*, İsmail Balık\*

## ÖZET

HBV enfeksiyonları, gerek dünyada gerekse ülkemizde önemli halk sağlığı sorunlarındandır. Çalışmamızda ülkemizdeki HBV genotip dağılımı araştırıldı. Genotip dağılımının bazı epidemiyolojik faktörlerle ilişkili olduğu bilinmektedir. Ülkemizin çeşitli yörelerinden gelen HBV ile infekte 20 hastanın serumu incelendi. İlk önce PCR ile HBV DNA'lar izole edildi. Daha sonra Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) yöntemine göre HBV DNA genotipleri belirlendi ve hastaların 17'sinde genotip, D bulundu (Dominant HBV genotipi genotip D idi). Üç hastanın genotipi identifiye edilemedi. Bu hastaların, ya mutant bir HBV virüsüyle ya da yeni bir HBV genotipiyle infekte oldukları sonucuna varıldı. Sonuç olarak, ülkemizdeki baskın HBV genotipinin D olduğunu söyleyebiliriz.

**Anahtar kelimeler:** Hepatit B virüsü (HBV), HBV DNA, genotip

## SUMMARY

### IDENTIFICATION OF HEPATITIS B VIRUS (HBV) GENOTYPES IN TURKEY

HBV infection is a major health problem all over the world and in Turkey. We investigated the prevalence of HBV genotypes in Turkey. Twenty serum samples were evaluated from patients with HBV infection who came from different geographic regions of our country. HBV DNA extracted from the serum by PCR. Then HBV-DNA genotypes were identified by using of the Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) method and found as genotype D of HBV in 17 of patients (The dominant HBV genotype was genotype D). The genotype of three patients could not be determined. These three samples were defined either as an unpredicted or atypical restriction pattern. As a result, genotype D is the dominant HBV genotype in our country.

**Key words:** Hepatitis B virus (HBV), HBV DNA, Genotype

## Giriş

HBV; Hepadnaviridae ailesinin Orthohepadnavirus cinsinde yer alan, hepatotropik, zarflı ve kısmen çift sarmallı bir DNA virusudur (1). Bu virüsün dünya genelinde 450 milyon taşıyıcısı vardır. Ayrıca dünya nüfusunun yarıya yakınının HBV ile infekte olduğu ve her yıl yaklaşık bir milyon kişinin HBV'nun neden olduğu akut ve kronik hastalıklardan öldüğü tahmin edilmektedir (2,3,4,5). Ülkemizde bölgeden bölgeye değişmek üzere %3.9-12 oranında HBV taşıyıcılığı mevcuttur. Anti HBs pozitifliği ise %20-50 oranındadır (6,7).

HBV dünyada sigaradan sonra, ikinci sıklıkla kansere neden olan ajandır. Hepatosellüler kanser gelişme riski HBV taşıyan kişilerde normal popülasyona göre 200 kat artmıştır (4,5,8). Ayrıca HBV, kronik hepatit ve karaciğer sirozuna neden olarak toplum sağlığı açısından önemli problemler doğurur.

HBV genotip dağılımı ile mutant dağılımı, klinik ve bazı epidemiyolojik özellikler arasında ilişki kurulmaktadır.

Nükleotid dizileri arasındaki farklılık %8 veya daha fazla olan HBV genomları farklı genotip olarak tanımlanmış ve A'dan G'ye kadar 7 farklı genotip ortaya konmuştur. Daha sonra HBV genom sekansları ile S geni sekansları karşılaştırılmış ve genotiplerle subtipler arasındaki bağlantı kurulmaya çalışılmıştır (1). Tablo 1'de HBV genotipleri ile subtipler arasındaki bağlantı ve bunların coğrafi dağılımı gösterilmiştir. Tablo 1, 9 numaralı kaynaktan uyarlanmıştır.

Bu çalışmada; kliniğimize başvuran ve HBV ile infekte 20 hastanın

Tablo 1. HBV Genotipleri ve Subtiplerinin Coğrafi Dağılımı

Genotip	Subtip	En çok görüldüğü coğrafi bölge
A	adw2	Kuzeybatı Avrupa
	adw1	Sahra altı Afrika
B	adw2	Endonezya, Çin
	adw1	Vietnam
C	adw2	Doğu Asya
	adrq+	Japonya, Kore, Çin
	adrq- ayr	Fransız Polinezyası Vietnam
D	ayw2	Akdeniz Bölgesi
	ayw3	Hindistan, Pakistan, Yakın Doğu
E	ayw4	Batı ve Sahra altı Afrika
F	adw4q-	Orta Amerika, Şili, Arjantin, Peru, Amazon Bölgesi
G	adw2	Fransa, Kuzey Amerika

\*Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Bakteriyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı

(kronik hepatit, asemptomatik taşıyıcı, karaciğer sirozu) genotipleri araştırıldı. Ülkemizde henüz yeni yeni belirlenmeye başlanan HBV genotipleri ve genotiplerin diğer epidemiyolojik özelliklerle ilişkisini ortaya koyan çalışmalara katkıda bulunma amaçlandı.

## Gereç ve Yöntem

Çalışmamıza HBV ile infekte 20 hasta alındı. Hastaların serumları 1998-2000 yılları arasında toplandı ve HBV genotiplerini belirlemek için çalışma yapılıncaya kadar -680C'da saklandı. Bu hastaların bazıları asemptomatik HBV taşıyıcısı, bazıları kronik hepatit B hastasıydı. Bir hastada HBV'na bağlı karaciğer sirozu mevcuttu.

Araştırmamız Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Bakteriyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları A.D. PCR Laboratuvarı'nda yapıldı. Her hasta serumuna aşağıda anlatılan işlemler uygulandı: 13 mL extraction buffer (Generaleaser, ABD) alındı ve 10 mL hasta serumu ile karıştırıldı, üzerlerine mineral yağı kondu. Bu karışım 950C'da üç dakika ve daha sonra buz içinde bir dakika tutularak (işlem iki defa yapıldı) HBV DNA izole edildi. Daha sonra içinde izole edilmiş halde HBV DNA bulunan karışımın üzerine 2,5 mL 10X EX-Taq polimeraz buffer, 1 mL 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5 mL 2,5 mM deoksiribonükleotid trifosfat 10 pikamol birinci basamak sens primeri (HBMF1: 5'-YCCTGCTGGTG-GCTCCAGTTC-3'), 10 pikamol antisens primeri (HBMR2: 5'-AAGC-CANACARTGGGGGAAAAGC-3') ve 0,1 mL (5 ünite ) EX-Taq karışımından 25 mL kondu. Bu karışım 960C'da iki dakika, 940C'da 15 saniye, 600C'da 45 saniye, 720C'da 45 saniye tutuldu. Bu işlem toplam 25 defa tekrarlandı. Böylece birinci tur ürünler elde edildi.

İkinci tur ürünleri elde etmek için şu karışım hazırlandı: 2,5 mL 10X EX-Taq polimeraz buffer, 1 mL MgCl<sub>2</sub>, 2,5 mL deoksiribonükleotid trifosfat, 10 pikamol ikinci basamak inner sens (HBMF2: 5'-GTCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTCTC-3') 10 pikamol anti sens primeri (HBMR2: 5'-AAGCCANACARTGGGGGAAAAGC-3') 25 mL'ye distile su ile tamamlandı. Bu karışımın 22,5 mL'si birinci tur ürünlerin 2,5 mL'si ile karıştırıldı ve oluşan karışım 960C'da iki dakika, 940C'da 15 saniye, 600C'da 45 saniye, 720C'da 45 saniye tutuldu. Bu işlem toplam 25 defa tekrarlandı. Sonuçta ikinci tur PCR ürünleri elde edildi.

Daha sonra üç farklı karışım hazırlandı. Bu karışımlardan birinde 2,5 mL 10X reaksiyon buffer + 1 mL BspI (NlaIV) enzimi + 16,5 mL distile su vardı. Başka birinde 2,5 mL 10X reaksiyon bufferi + 1 mL Eam1104I (Ksp632I) enzimi ve 16,5 mL distile su bulunuyordu. Üçüncüde ise 2,5 mL 10X reaksiyon bufferi + 2 mL HphI enzimi + 15,5 mL distile su vardı. Bu karışımların her birinden ayrı ayrı 20 mL alınıp 5 mL ikinci tur PCR ürünleri ile karıştırıldı. Bu karışım 370C'da 12 saat bekletildi. Elde edilen ürünler her mL'sinde 500 ng ethidium bromid içeren 1xTBE buffer (134 mM Tris-HCl, pH: 10, 68 mM borik asit, 2,5 mM EDTA) içindeki %3'lük agaroz jelde yürütüldü. Sonuçlar 0,5 saat sonra ultraviyole ışık altında incelendi. Sonuçlar, kesici enzimlerin genotipler için spesifik DNA S geni bölgelerini kesmesi ve bu bölgelerin agaroz jelde farklı uzunlukta baz çiftleri oluşturması esasına dayana-

rak değerlendirildi (Restriction Fragment Length Polymorphism: RFLP yöntemi).

İkinci basamak ürünleri (485 baz çifti uzunluktadır) AlwI enzimi ile işleme sokulduktan sonra 485 bp (baz çifti ) oluşursa genotip C, EarI enzimi ile işleme sokulduktan sonra 485 bp oluşursa genotip B, HphI ve NciI enzimi ile işlemden sonra genotip E (379 bp) ve genotip F (485 veya 438 bp), NlaIV enzimi ile işlemden sonra genotip A (219 veya 220 bp) ve genotip D (186 bp) oluşur.

Çalışmamızda; Taq polimeraz ve agaroz jel Life Technologia (ABD)'den, HBV DNA primerleri Biosynthesis (ABD)'den, kesici (restriction) enzimler MBI Fermantes (Litvanya)'den sağlanmıştır.

## Bulgular

Yirmi hastanın 7'si kadın, 13'ü erkek hasta idi. Yaş ortalaması 35 (9-57) idi. Hastaların 5'i Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgesi, üçü Karadeniz Bölgesi, biri Akdeniz Bölgesi, 11'i İç ve Orta Anadolu Bölgesi kökenliydi.

Öndört hasta kronik hepatit B tanısı ile takip edilirken (üçü karaciğer biyopsisi ile doğrulanmış) bir hasta HBV'na bağlı karaciğer sirozuydu. Beş hastanın kronik hepatit B hastası mı, yoksa asemptomatik HBV taşıyıcısı mı oldukları belirlenemedi.

Yedi hastada HBeAg, bir hastada hem HBeAg hem de Anti-HBe, 12 hastada anti-HBe pozitif bulundu. Sadece bir hastada anti-Delta pozitif bulundu.

Altı hasta, hastalığın tahmini bulaş yolu hakkında bilgi veremedi. Beş hasta dış tedavisi sırasında hastalığın kendisine bulaşmış olabileceğini belirtirken, 4 hasta aile içi teması bulaştıran sorumlu tuttu. İki hasta hastalığın kendisine berberden, bir hasta ise cinsel temas ile bir başkasından bulaşmış olabileceğini belirtti. Bir hasta berber ve aile içi teması, bir hasta da dış tedavisi ve aile içi teması bulaş yolu olarak gösterdi. Tahmini olarak en uzun hastalık süresi 12 yıldır.

Çalışmaya alınan 20 hastanın 17'sinde HBV genotipi, genotip D olarak bulundu. Üç hastanın genotipi tayin edilemedi. Bunların ya yeni bir HBV genotipi ile veya mutant bir HBV ile infekte oldukları düşünüldü.

Araştırmaya alınan hastaların genotiplerinin agaroz jeldeki görüntüleri şekil 1 ve 2'de gösterilmiştir.

## Tartışma ve Sonuç

Bugüne kadar A'dan G'ye kadar 7 farklı HBV genotipi tanımlanmıştır. Muhtemelen bunlardan daha fazla genotip vardır ve bunlar çeşitli teknikler kullanılarak belirlenecektir (10, 11). Araştırmamızda RFLP yöntemi uygulandı. Ancak son zamanlarda, preS2 bölgesi ürünlerindeki epitoplara karşı, genotiplere spesifik monoklonal antikorlar kullanılarak da ELİSA ile HBV genotipleri tayin edilebilmektedir. Bu yöntemde nükleotid zincirlerini incelemek gerekmediği için, bu yöntem geniş taramalarda kullanılabilir (12).

HBV genotipleri, farklı coğrafi bölgelere göre farklı dağılım göster-

mektedirler. Genotip A Kuzey Avrupa'da, genotip B ve C Doğu Asya'da ve Uzak Doğu'da, genotip D tüm dünyada yaygın olmakla birlikte Akdeniz Bölgesi, Yakın Doğu, Orta Doğu ve Güney Asya'da, genotip E Sahra altı bölgenin batısında, genotip F Amerika Kıtası'nda baskın olarak bulunur (13,14).

Çalışmamızda, ülkemizin de içinde bulunduğu Akdeniz Bölgesi'nde en sık gözlenen genotip olan genotip D (17/20 hastada) bulundu. Üç hastamızın genotipleri tayin edilemedi ve Fransa'da yapılan bir çalışmaya dayanarak bu hastaların ya mutant bir HBV ile ya da yeni bir HBV genotipi ile infekte oldukları düşünüldü (11). Ulaşabildiğimiz yerli yayınlardan ancak bir tanesinde ülkemize ait HBV genotip çalışması bulundu. Bozdayı (15) ve arkadaşları tarafından yapılan bu çalışmada, HBV genotipleri araştırılan 13 hastanın tamamının genotipi genotip D olarak belirlenmiştir.

HBV genotiplerinin dağılımının coğrafi bölgelere göre farklılık göstermesi esasına dayanarak, HBV ile infekte hastaların atalarının göçleri konusunda da bilgi edinilebilmektedir (16).

Farklı HBV genotipleri arasında anti-HBe serokonversiyonu ve replikatif potansiyel açısından fark vardır (17). Bu, dünyanın çeşitli yerlerinde HBV taşıyıcısı oranları arasındaki farkla paralellik göstermektedir. HBV taşıyıcısı prevalansının düşük olduğu Kuzeybatı Avrupa ve ABD'de persistan taşıyıcılar arasında genotip A yaygındır. Amazon Bölgesi ve Peru gibi yüksek HBV prevalansı olan yerlerde, elde edilebilen bilgilere göre genotip F baskındır. Genotip B ve C Doğu Asya'da yaygındır ve bu bölgelerdeki kadınların çocuklarına doğum sırasında (vertikal) HBV'nu geçirme oranları yüksektir. Çünkü bu kadınlarda, vertikal geçişi arttıran HBeAg'nin pozitif olduğu dönem daha uzundur. Sahra altı Afrika ve Akdeniz Bölgesi'nde HBV'nun horizontal geçişi daha önemlidir ve buralarda genotip A ve D yaygındır. Bu bölgelerdeki doğurgan kadınlarda anti-HBe serokonversiyonu Asyalı kadınlara göre daha çabuk olur ve bu kadınlar çocuklarına doğum sırasında HBV'nu daha az bulaştırırlar. Çünkü vertikal geçiş viral replikasyonun olduğu dönemde daha fazladır ve HBeAg pozitifliği replikasyonun bir göstergesidir. Anti-HBe ise büyük oranda replikasyonun durduğunu gösterir (mutant virus enfeksiyonları dışında) (14, 16). Ülkemizde HBV'nun horizontal geçişi daha önemlidir ve araştırmaya aldığımız 20 hastanın 12'sinde anti-HBe, 7'sinde HBeAg pozitif bulunmuştur. Bir hastada ise HBeAg ve anti-HBe'nin birlikte pozitif olduğu gözlenmiştir.

HBV mutasyonları viral genotiplerle ilişkilidir (18). Şöyle ki: Pre-kor mutantlar genotip B, C ve D'nin yaygın olduğu Doğu Asya ve Akdeniz Bölgesi'nde yaygınken, genotip A'nın yaygın olduğu ABD ve Kuzey Avrupa'da bu mutantların insidansı düşüktür (19). Ayrıca pre-kor stop kodon 28 (adenin 1895) sıklığı ile genotip A arasında zıt ilişki vardır (20). Genotip C'de genotip B'ye göre daha sık kor promotör mutasyonu gözlenmektedir (21). Bununla birlikte kor gen delesyonu ile genotipler arasında ilişki olmadığını belirten yayınlar da vardır. Ayrıca bu yayınlarda kor gen delesyonlarının interferon tedavisinin üzerine olumsuz etkisi olmadığı da belirtilmektedir (19).

Normalde HBV enfeksiyonlarında HBeAg ve HBV DNA birlikte

pozitifdir. Bununla birlikte bazı kronik hepatit B'li hastalarda anti-HBe ile birlikte HBV DNA pozitifdir. Bu farklılık, sıklıkla HBV DNA genomunun pre-kor bölgesindeki 1896 numaralı nükleotiddeki mutasyonla açıklanır. Bu mutasyonla HBeAg sentezi durur ama viral replikasyon devam eder (19).

Akdeniz Bölgesi'nde HBeAg negatif kronik hepatit B'li hastaların %95'inden fazlasında 1896 pre-kor mutantlarının olduğu tahmin edilmektedir (19, 21). Ülkemizde Bozdayı (22) ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada 19 hastanın %84'ünde (16/19) pre-kor mutasyonu bulunmuştur. Çalışmamızda 20 hastanın tamamında HBV DNA pozitif olarak bulundu. Bunların 12'sinde aynı zamanda anti-HBe de pozitif. Bu bulgu ülkemizde HBV pre-kor mutantlarının yaygın olduğu ve bu mutantların genotip D'de sık görüldüğü görüşünü destekler niteliktedir.

Sonuç olarak; hastaların ülkemizin farklı bölgelerinden gelmelerini ve 17 hastada bulunulan genotip D'nin ülkemizin de içinde bulunduğu Akdeniz Bölgesi'nde yaygın HBV genotipi olduğunu da göz önünde bulundurursak, bulgularımızın değeri daha da artacaktır. Bu nedenle ülkemizde HBV genotipinin yaygın olarak genotip D olduğunu kabul edebiliriz. Çalışmamızın daha sonra yapılacak HBV genotipleri ile ilgili çalışmalara yardımcı olacağını ve bu sayede ülkemizdeki HBV enfeksiyonlarının epidemiyolojisinin, klinik seyrinin ve kronik hepatit B'nin tedaviye vereceği yanıtın daha iyi anlaşılacağını düşünmekteyiz.

#### KAYNAKLAR

1. Kıyan M: Viroloji, "K Kılıçturgay (ed), Viral Hepatit'98, 1. Baskı" Kitabında s 66, 1998, Viral Hepatitle Savaşım Derneği, İstanbul.
2. Mast E. E, Alter M. J: Epidemiology of viral hepatitis: An Overview. Seminars in Virol. , 1993, 4: 273-277.
3. Badur S: Hepatit B virüsü (HBV) moleküler ve serolojik tanı, "K Kılıçturgay (ed), Viral Hepatit'94, 1. Baskı" s 65, 1994, Viral Hepatitle Savaşım Derneği, İstanbul.
4. Balık İ: Hepatit B epidemiyolojisi. 2. Ulusal Viral Hepatit Simpozyumu, (Ankara), 1994, s 91.
5. Eddleston A: Modern vaccines. Hepatitis. The Lancet, 1990, 5(12): 1142-1145.
6. Taşyaran M. A: HBV Enfeksiyonu epidemiyolojisi, " K Kılıçturgay, S Badur (ed), Viral hepatit' 2001, 1. Baskı" s 121, 2000, Viral Hepatitle Savaşım Derneği, İstanbul.
7. Kılıç G, Ural O, Yaşayan Z: Genelev kadınlarında ELİSA yöntemi ile Hepatit B marker pozitifliğinin araştırılması. Mikrobiyol. Bült. , 1993, 27: 52-55.
8. Kurt H: Viral hepatitlerden korunma ilkeleri ve immunoprolaksi. Klinik seriler, 1991, 2(4): 154-161.
9. Kıyan M: Hepatit B virüsü, " K Kılıçturgay, S Badur (ed), Viral Hepatit' 2001, 1. Baskı" s 86, 2000, Viral Hepatitle Savaşım Derneği, İstanbul.
10. Norder H, Hammas B, Lofdahl S, Courouce A. M, Magrius

L. O: Comparison of the amino acid sequence of nine different serotypes of hepatitis B surface antigen and genomic classification of the corresponding hepatitis B virus strain. *J. Gen. Virol* , 1992, 73: 1201-1208.

11. Stuyver L, De Gendt S, Van Geyt C et al: A new genotype of hepatitis B virus complete genome and phylogenetic relatedness. *J. Gen. Virol* , 2000, 81 Pt 1: 67-74.

12. Usuda S, Okamoto H, Iwanari H et al: Serological detection of hepatitis B virus genotypes by ELISA with monoclonal antibodies to type-specific epitopes in the pre-S2 region product. *J. Virol. Methods*, 1999 , 80(1): 97-112.

13. Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H et al: Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J. Gen. Virol.* , 1988, 69: 2575-2583.

14. Kao J. H, Chen P. J, Lai M. Y, Chen D. S: Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcome in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology*, 2000, 118 (3): 554-559.

15. Bozdayı A. M, Türkyılmaz A. R, Aslan N ve arkadaşları: Hepatit B Virüsü Taşıyan Türk Hastalarda HBV Genotiplerinin Belirlenmesi. 17. Ulusal Gastroenteroloji Kongresi Antalya, 2000. S: 104.

16. Patricia A. R, Norder H, Visona A. K, Magrius O. L: Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Central America reflected in the genetic variability of the small S gene. *The Journal of Infectious Diseases*, 1997, 176: 851-858.

17. Norder H, Courouce A. M, Magnius O. L: Complete genomes phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the Hepatitis B Virus, four of which represent two new genotypes. *Virology*, 1994, 198: 489-503.

18. Grandjacques C, Pradat P, Stuyver L et al: Rapid detection of genotypes and mutations in the pre-core promoter and the pre-core region of hepatitis B virus genome: Correlation with viral persistence and disease severity. *J. Hepatol*, 2000, 33 (3): 430-439.

19. Nicolas C, Tassopoulos et al: Efficacy of lamivudine in patients with Hepatitis BeAg negative /hepatitis B virus DNA pozitive (Pre-core Mutants) chronic hepatitis B. *Hepatology*, 1999, 29: 889-896.

20. Bağcı S, Torre F, Stuyver L et al: Hepatitis B virus genotiplerinin precore/core gen mutasyonlarının gelişimi ve interferon tedavisinin sonuçları üzerine etkisi. *Gastroenteroloji*, 1996, 7(1 Ek): 8.

21. Kao J. H, Wu N. H, Chen P. J, Lai M. Y, Chen D. S: Hepatitis B genotypes and the response to interferon therapy. *J. Hepatol*, 2000, 33(6): 998-1002.

22. Bozdayı A. M, Uzunalimoğlu Ö, Bozkaya H ve arkadaşları: Türkiye’de kronik Hepatit B virüsü enfeksiyonu olan hastalarda pre-kor geni ve kor promotör mutasyonu prevalansı. *Gastroenteroloji*, 1996, 7(1 Ek): 9.