

**T.C.  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ**

**KRONİK HEPATİT B TEDAVİSİNDE KULLANILAN PEGİLE  
İNERFERON ALFA VE ORAL ANTİVİRALLERİN HBsAg GENİ VE  
POLİMERAZ GENİ ÜZERİNDE YAPTIĞI MUTASYONLARIN  
ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ  
Dr. Elif Sargın ALTUNOK**

**ENFEKSİYON HASTALIKLARI  
VE  
KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**2014**

**T.C.**  
**KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**

**KRONİK HEPATİT B TEDAVİSİNDE KULLANILAN PEGİLE  
İNTERFERON ALFA VE ORAL ANTİVİRALLERİN HBsAg GENİ VE  
POLİMERAZ GENİ ÜZERİNDE YAPTIĞI MUTASYONLARIN  
ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ**  
**Dr. Elif Sargın ALTUNOK**

**ENFEKSİYON HASTALIKLARI**  
**VE**  
**KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Tez Danışmanı**  
**Prof. Dr. Sıla ÇETİN AKHAN**

**Anabilim Dalı Başkanı**  
**Prof. Dr. Birsen MUTLU**

**Etik kurul onay tarihi: 26.06.2009, proje no: 2009/97**

**2014**

## I. ÖNSÖZ

*Uzmanlık eğitimim süresince anlayışı ve desteğiyle bana hep güven veren, bilgisini hiç esirgemeyen, tezimin tüm aşamalarında görüş ve tecrübelerinden faydalandığım değerli danışman hocam Prof. Dr. Sıla AKHAN' a sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.*

*Eğitimim sırasında bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, mesleki gelişimimde çok büyük katkıları olan anabilim dalı başkanımız sayın Prof. Dr. Birsen MUTLU, sayın hocalarım Prof. Dr. Ayşe WİLLKE, Prof. Dr. Sibel GÜNDEŞ, Doç. Dr. Meliha MERİÇ KOÇ ve Yard. Doç. Dr. Emel AZAK'a teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.*

*Tezimin hazırlanmasında derin bilgi birikimi ve tecrübesi ile yardımlarını esirgemeyen sayın Doç. Dr. Murat Sayan' a teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.*

*Uzun zamandır birlikte uyum içinde çalıştığımız değerli asistan arkadaşlarıma, asistanlığım süresince kendisiyle çalışmaktan büyük keyif aldığım sevgili arkadaşım, laboratuvar teknisyenimiz Ayşen POLAT ÇUVALCI' ya, güler yüzlü ve yardımsever ekip arkadaşlarım, değerli dostlarım servis hemşirelerimize ayrı ayrı teşekkür etmeyi bir borç bilirim.*

*Hayatımın ve eğitimimin her aşamasında hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan, aldığım her kararda beni destekleyen, her zaman yanında güven ve huzur bulduğum canım anneme, sevgi ve desteklerini her zaman hissettiğim babam ve kardeşime teşekkür ederim. Bu zorlu eğitim sürecimde gösterdiği sabır ve anlayışı için, tezimi hazırlarken desteğini esirgemeyen yol arkadaşım, sevgili eşim Tansu ALTUNOK'a ve ondan çaldığım zamanlar için, hayatımı anlamlandıran biricik oğlum Çınar ALTUNOK'a gönülden teşekkür ederim.*

*Dr. Elif SARGIN ALTUNOK*

## II. İÇİNDEKİLER

I. ÖNSÖZ.....	I
II. İÇİNDEKİLER.....	II
III. SİMGELER VE KISALTMALAR .....	IV
IV. ŞEKİL DİZİNİ.....	VII
V. TABLO DİZİNİ.....	VIII
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Tarihçe.....	3
2.2 Hepatit B Virusunun Yapısı.....	3
2.2.1 Virion yapısı.....	3
2.2.2 Genomun yapısı .....	5
2.2.3 Virus Proteinleri .....	7
2.3 Hepatit B Virusunun Genotip ve Subtipleri.....	9
2.4 Virus Replikasyonu .....	10
2.4.1 Hepatit B Virusunun replikasyon basamakları (Şekil 5) .....	10
2.5 Hepatit B Virus Mutantları .....	13
2.5.1 Prekor/kor Geni Mutasyonları .....	13
2.5.2 Yüzey Geni Mutasyonları .....	14
2.5.3 Polimeraz Geni Mutasyonları.....	15
2.5.4 X Geni Mutasyonları.....	17
2.6 Virusun Stabilitesi .....	18
2.7 Hepatit B Virus İnfeksiyonu.....	18
2.7.1 Epidemiyoloji.....	18
2.7.2 Patogenez ve immünite .....	21
2.7.3 Hepatit B Virus İnfeksiyonunda Klinik.....	23
2.7.4 Hepatit B Virus İnfeksiyonlarının Tanısı .....	28
2.7.5 Kronik Hepatit B Virus İnfeksiyonunda Tedavi.....	33
2.8 Antiviral Direnç .....	37
2.8.1 İndirekt yöntemler: .....	38
2.8.2 Fenotipik yöntemler: <sup>119</sup> .....	38

2.8.3	Genotipik Yöntemler: <sup>119</sup> .....	38
3.	GEREÇ VE YÖNTEM .....	41
3.1	Çalışma Grubu .....	41
3.1.1	Hasta Grubu .....	41
3.1.2	Kontrol Grubu .....	42
3.1.3	Çalışmaya Dahil Edilmeme Kriterleri .....	42
3.2	Yöntem .....	42
3.2.1	Biyokimyasal İncelemeler .....	42
3.2.2	Hematolojik İncelemeler .....	43
3.2.3	Serolojik İncelemeler .....	43
3.2.4	Serum HBsAg Kantitasyonu .....	44
3.2.5	Moleküler Testler .....	44
3.2.6	Patolojik İncelemeler .....	46
3.3	İstatistiksel Analiz .....	46
4.	BULGULAR .....	47
5.	TARTIŞMA .....	62
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER .....	68
7.	ÖZET .....	71
8.	ABSTRACT .....	73
9.	KAYNAKLAR .....	75

### III. SİMGELER VE KISALTMALAR

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ADAPVEM	Antiviral Drug- Associated Potantial Vaccine- Escape Mutant
ADV	Adefovir
ALT	Alanin aminotransferaz
Anti HBc	Hepatit B kor antikoru
Anti HBs	Hepatit B yüzey antikoru
AST	Aspartat aminotransferaz
AFP	Alfa Feto Protein
ALP	Alkalen Fosfataz
AUC	Eğri Altında Kalan Alan
BKP	Bazal Kor Promoter
CTL	Sitotoksik T lenfositleri
cccDNA	Covalently Closed Circular Deoksiribonükleik Asit
DNA	Deoksiribo nükleik asit
DR	Direct Repeats
ELİSA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ETV	Entekavir
GGT	Gama Glutamil Transpeptitaz
HAI	Histolojik Aktivite İndeksi
HBcAg	Hepatit B kor antijeni
HBeAg	Hepatit B early antijeni
HBİg	Hepatit B immunglobulin
HBsAg	Hepatit B yüzey antijeni

HBV	Hepatit B virusu
HCC	Hepatosellüler karsinom
IFN	İnterferon
INR	International Normalized Ratio
IU/mL	International unite/mili litre
KCFT	Karaciğer fonksiyon testleri
KHB	Kronik hepatit B
L-HBs	Large protein
LAM	Lamivudin
LdT	Telbivudin
M-HBs	Medium protein
mRNA	Messenger RNA
NA	Nükleotid/nükleozid analogu
ORF	Open reading frame
Peg-IFN	Pegile Interferon Alfa
PCR	Polimerase chain reaction
ROC	Receiver Operating Characteristic
pgRNA	Pregenomik RNA
PSKM	Prekor stop kodon mutasyonu
PTZ	Protrombin time
qHBsAg	HBsAg kantitasyonu
RNA	Ribonükleik asit
RT	Revers Transkriptaz
RNase-H	Ribonükleaz

S-HBs	Small protein
TDF	Tenofovir
U/L	Unite/litre
YMDD	Tirozin-Metionin-Aspartat-Aspartat





## IV. ŞEKİL DİZİNİ

### SAYFA NO

ŞEKİL 1: Hepatit B virionunun Şematik yapısı .....	4
ŞEKİL 2: Hepatit B virus partiküllerinin elektron mikroskopik görünümü.....	5
ŞEKİL 3: Hepatit B virusunun genomik organizasyonu ve sentezlenen RNA'lar ....	7
ŞEKİL 4: Hepatit B virusu genotiplerinin coğrafik dağılımı.....	9
ŞEKİL 5: Hepatit B virusunun replikasyonu .....	12
ŞEKİL 6: Polimeraz geninde meydana gelen ilaç direnç mutasyonları .....	17
ŞEKİL 7: Akut Hepatit B virus infeksiyonunun haftalara göre seyri .....	24
ŞEKİL 8: Kronik Hepatit B virus infeksiyonunun doğal seyri .....	26

## V. TABLO DİZİNİ

### SAYFA NO

<b>TABLO 1:</b> Tedavi yanıtı tanımlamaları .....	34
<b>TABLO 2:</b> Tedavi ve kontrol grubundaki hastaların sayı ve cinsiyet dağılımları ....	47
<b>TABLO 3:</b> Hastaların demografik, histopatolojik ve tedavi öncesi laboratuvar özelliklerinin karşılaştırılması.....	48
<b>TABLO 4:</b> Tedavi ve kontrol grubundaki hastaların başlangıç ve birinci yıl laboratuvar değerlerinin karşılaştırılması. ....	49
<b>TABLO 5:</b> Tedavi grubundaki hastaların karaciğer histopatolojik özelliklerinin karşılaştırılması.....	49
<b>TABLO 6:</b> Tedavi alan HBeAg negatif hastaların başlangıç, 12. hafta ve birinci yıl sonuçlarının fibroz durumuna göre karşılaştırılması. ....	50
<b>TABLO 7:</b> Tedavi alan HBeAg pozitif hastaların başlangıç, 12. hafta ve birinci yıl sonuçlarının fibroz durumuna göre karşılaştırılması. ....	52
<b>TABLO 8:</b> Tedavi alan hastaların başlangıç ve tedavinin birinci yıl sonuçlarının karşılaştırılması.....	53
<b>TABLO 9:</b> Hastaların kronik hepatit B enfeksiyonunun fazlarına göre karşılaştırılması.....	54
<b>TABLO 10:</b> HBV DNA sekanslama analizi yapılabilen hastalarda HBV polimeraz geni mutasyonları ve ilaç direnci durumu.....	59
<b>TABLO 11:</b> HBV DNA sekanslama analizi yapılabilen hastalarda HBV S geninde tipik HBsAg kaçış mutasyonları .....	60

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hepatit B virus infeksiyonu tüm dünyada yaygın olarak görülen önemli bir halk sağlığı sorunudur. Dünyada yaklaşık olarak iki milyar kişinin hepatit B virusu (HBV) ile karşılaştığı, yaklaşık 400 milyon kişinin HBV ile kronik olarak infekte olduğu bilinmektedir. Her yıl dünyada yaklaşık bir milyon kişi kronik hepatit B (KHB) infeksiyonuna bağlı siroz ve hepatoselüler karsinom (HCC) gibi komplikasyonlar nedeniyle kaybedilmektedir. Aşıyla korunulabilen viral hepatit etkenlerinden olan HBV için aşı uygulamaları, özellikle çocukluk döneminde HBsAg pozitifliğini anlamlı şekilde azaltmıştır. HBV aşılmasının yaygınlaştırılmasıyla gelecekte HBV infeksiyonu insidansının azalacağı tahmin edilmektedir.<sup>1,2,3</sup>

KHB tedavisinde son yıllardaki büyük gelişmelere rağmen hastalığın tam eradikasyonu, infekte hepatositin nükleusunda cccDNA'nın persistansı nedeniyle mümkün görünmemektedir. Tedavideki ana hedef, etkili HBV DNA baskılanması, mümkünse HBsAg kaybı ve serokonversiyonu, siroz ve HCC gibi komplikasyonların önlenmesidir. Günümüzde KHB tedavisinde interferonlar (IFN) ve nükleoz(t)id analogları (NA) kullanılmaktadır. IFN, kullanım süreleri belli olan ve direnç gelişme problemi olmayan immün modülatör ilaçlardır. NA'nın ise etkili HBV DNA baskılanması için bir yıldan daha uzun süreli kullanılması gerekmektedir. NA ile tedavide en önemli sorun uzun dönemde ilaç direnci ve çapraz direnç gelişmesidir. Telbivudin (LdT) HBV'e karşı lamivudinden (LAM) daha güçlü antiviral aktivitesi olan bir L-nükleosid analogudur. Ancak yapılan çalışmalarda tedaviden bir yıl sonra hastaların %2-5'nde direnç geliştiği görülmüştür. NA içerisinde entekavir (ETV) ve tenofovir (TDF), güçlü viral supresif etkileri ve yüksek genetik bariyerleri ile direnç oranları daha düşük olan oral antiviral ajanlardır.<sup>4,5,6</sup>

Günümüzde KHB infeksiyonunda antiviral tedaviye başlama kararı verilmesi, tedaviye yanıtın izlenmesi ve antiviral direnç saptamada pahalı ve deneyim gerektiren bir yöntem olan HBV DNA düzey tayini yapılmaktadır. Son dönemde yapılan çalışmalar daha ucuz bir yöntem olan serum HBsAg kantitasyonu (qHBsAg) ile hastalığın prognozu hakkında öngörü yapabileceğimizi düşündürmektedir. HBsAg

kantitatif değerleri ile hastalığın klinik evre, fibroz skoru ve tedavi yanıtı arasında ilişkinin olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmeye başlanmıştır. Serum HBsAg seviyeleri intrahepatik cccDNA seviyeleri ile korele olması nedeniyle kantitasyon enfekte hücreleri yansıtılmaktadır. qHBsAg' nin düşük HBV DNA seviyeleri olan HBeAg negatif hastalar ile inaktif taşıyıcıları ayırmada yardımcı olabileceği dşnlmektedir.<sup>7</sup>

HBV, yüksek replikasyon kapasitesinin (>10<sup>12</sup> virion/gün) olması ve ters transkripsiyon işleminde hata düzeltme yeteneğinin olmaması nedeniyle, yüksek mutasyon sıklığına sahip bir virustur.<sup>8</sup> Tedavi ncesinde NA direnci ile ilişkili mutasyonlar meydana gelebileceği gibi, KHB'nin NA ile uzun süreli tedavisinde de antiviral ajana dirençten sorumlu mutasyonlar gelişebilmektedir.<sup>9,10</sup> te yandan, HBV'nin genom organizasyonunda polimeraz (*pol*) ve yüzey (*S*) genleri st üste çakışır pozisyonda olması nedeniyle NA ilaç direnci mutasyonları, hepatit B yüzey antijeni (HBsAg) yapısında aminoasit değişikliklerine neden olabilmektedir. Son yıllarda HBV *pol/S* geni çakışmasına bağlı olarak “ilaca bağlı gelişen potansiyel aşı kaçağı mutasyonu” (ADAPVEM; Antiviral Drug-Associated Potential Vaccine-Escape Mutant) kavramı kullanılmaya başlanmıştır.<sup>11,12</sup>

Bu alışmada KHB tedavisinde kullanılan oral antivirallerin *pol* geni ve *S* geni üzerinde yaptığı mutasyonların araştırılması ve bu mutasyonların klinik ve epidemiyolojik öneminin saptanması, uzun dönemde ilaç direnci gelişiminin ve bunun yol açacağı sonuçların belirlenmesi amaçlanmıştır. İkincil olarak, kantitatif HBsAg titrelerinin ilaç direncini belirlemede erken bir marker olup olmadığının saptanması amaçlanmıştır.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1 Tarihçe**

İlk kez Babil Talmudları ve Hipokrat'ın yazılarında bahsedilen viral hepatitler, 1883 yılında Bremen'de çiçek aşısı yapılan tersane işçileri arasında görülen salgın sonucu kayıtlara geçmiştir. 1943 yılına gelindiğinde Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde bulaşıcı hepatit 'infeksiyöz hepatit' olarak isimlendirilirken, İngiltere Sağlık Bakanlığı aynı yıl kan, plazma ve serum naklinden sonra gelişen sarılıkları 'homolog serum sarılığı' adı altında toplamıştır. Hastalığa virusun neden olabileceğini 1908'de McDonald düşünmüş, 1947 yılında McCallum, infeksiyöz hepatit için 'hepatit A', serum hepatiti için ise 'hepatit B' deyimlerini kullanmıştır.<sup>13,14</sup>

Blumberg ve arkadaşlarının 1965 yılında bir hastanın serumunda Avustralya antijeni adını verdikleri yeni bir antijeni bulmaları ile hepatit serolojisinde yeni bir çığır açılmış ve bu buluşlarıyla araştırmacılar Nobel ödülü kazanmışlardır. Günümüzde hepatit B yüzey antijeni (HBsAg) olarak bilinen bu proteinden sonra, 1970 yılında infeksiyöz özelliğe sahip Dane partikülü tanımlanmıştır. Krugman 1971 yılında ısı ile inaktive edilen HBsAg pozitif serumların immünojenik olduğunu ve aşı olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Kaplan ve arkadaşları 1973 yılında virusun kor bölgesinde DNA'ya bağımlı DNA polimeraz varlığını saptamışlardır. 1979'da ise virusun DNA'sı kopyalanarak tam nükleotid dizisi çıkarılmıştır.<sup>13,15</sup>

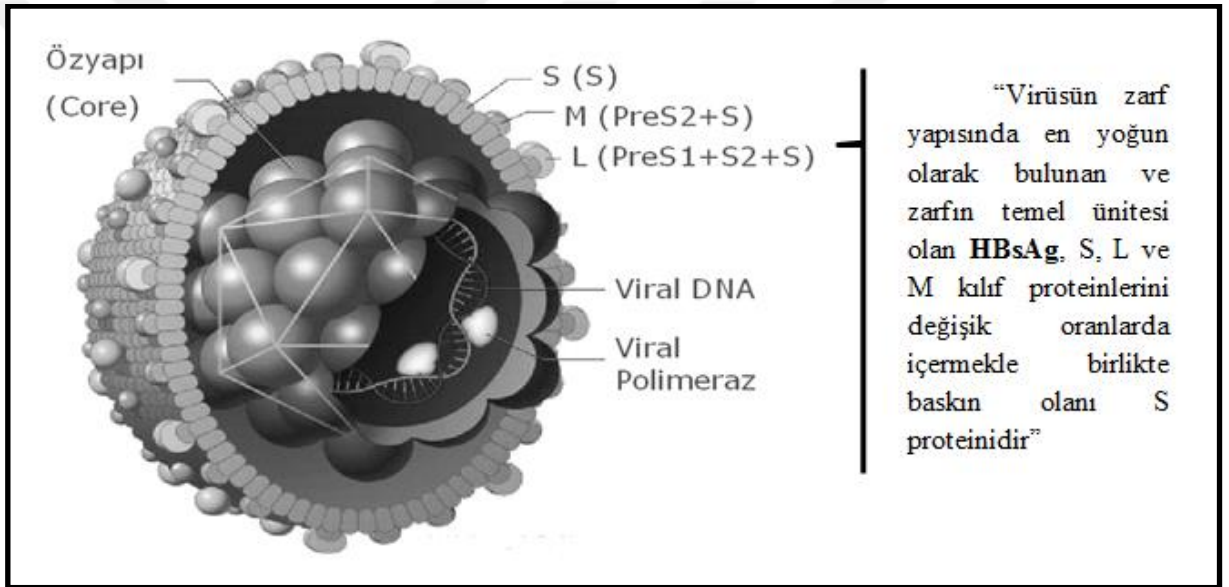
### **2.2 Hepatit B Virusunun Yapısı**

#### **2.2.1 Virion yapısı**

Hepadnaviridae ailesinin orthohepadnavirus cinsinde yer alan HBV, yalnızca insanları ve maymunları infekte edebilen hepatotropik bir virustur. İki genus içeren bu ailenin Avihepadnavirus olarak adlandırılan diğer genusu ise kuş viruslarından oluşmaktadır.<sup>16,17</sup>

42 nm çapında olan HBV, ikozahedral bir kapsid içindeki kısmen çift iplikli çembersel bir DNA ve bunu çevreleyen lipit yapılı bir zarftan oluşmaktadır.<sup>17</sup> Kapsidin üzerinde yer alan lipoprotein yapılı zarf, üç farklı büyüklükte yüzey antijeni

taşımaktadır: Küçük (S), orta (M) ve büyük (L). Virusun zarf yapısında en yoğun olarak bulunan ve zarfın temel ünitesi olan HBsAg, S, L ve M kılıf proteinlerini değişik oranlarda içermekle birlikte baskın olanı S proteinidir<sup>18</sup> (Şekil 1). Virion zarfı, iyonik olmayan deterjanlar ile muamele edildiğinde iç kısımdaki nükleokapsid ya da kor (özyapı) bölgesi açığa çıkmaktadır. 27 nm’lik ikozahedral simetrik kapsid, ‘hepatit B kor (core) antijeni’ (HBcAg) olarak isimlendirilen C proteinini, viral genomu ve polimeraz enzimini içermektedir<sup>19</sup>. İnfekte hücrelerden salınan HBsAg ve HBcAg antijenlerinin yanı sıra hepatit B e antijeni (HBeAg) olarak isimlendirilen üçüncü bir antijen daha bulunmaktadır. Bu antijenin kanda bulunuşu infeksiyöz virion yapımını göstermektedir.<sup>20,21</sup>

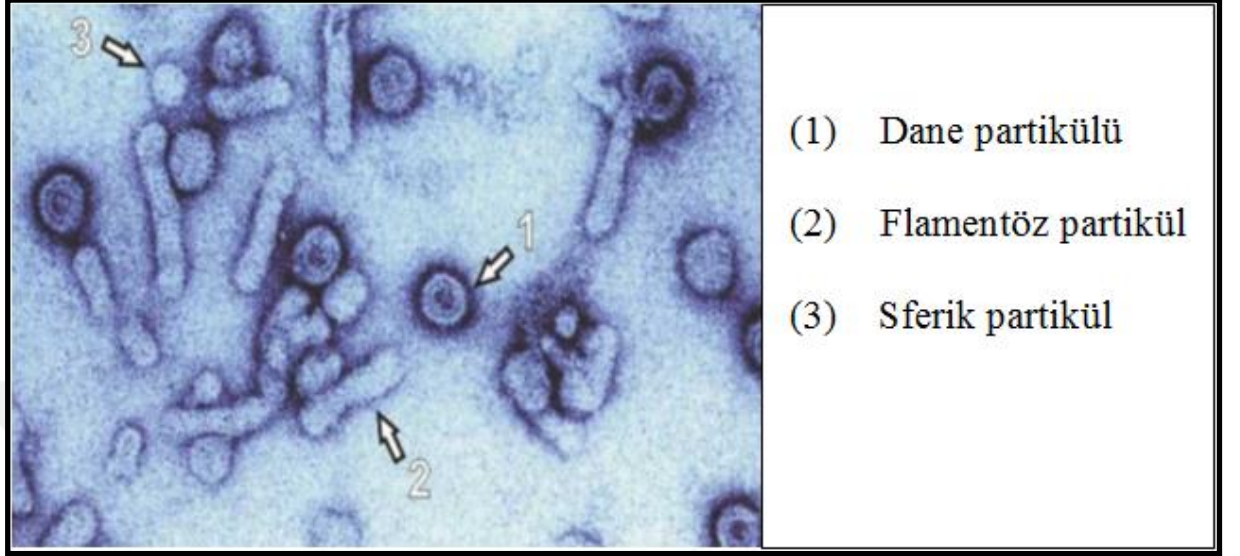


**Şekil 1 : Hepatit B virionunun şematik yapısı ( <sup>22</sup> Numaralı kaynaktan uyarlanmıştır).**

HBV ile infekte hastaların serumlarından hazırlanan preparatlar elektron mikroskopunda incelendiğinde, üç tip viral patikül olduğu gösterilmiştir.<sup>17,23</sup> (Şekil 2)

- Ortalama 42 nm (40–48) çapında, tam bir virion yapısında olan küresel şekilli Dane partikülleri,
- Yaklaşık 22 nm çapında, içinde nükleik asit bulunmayan, infeksiyöz olmayan sferik partiküller,
- 22 nm çapında, 50–500 nm uzunluğunda, nükleik asit içermeyen, infeksiyöz olmayan filamentöz partiküller.

Tüm partikül tipleri, infekte konak serumunda yüksek miktarda saptanabilen ve HBsAg adı verilen ortak yüzey antijenine sahip olup immünojeniktirler.<sup>14</sup>



**Şekil 2: Hepatit B virus partiküllerinin elektron mikroskopik görünüşleri**

(Universitäts Klinikum Heidelberg moleküler biyoloji ders notlarından adapte edilmiştir, [www.klinikum.uni-heidelberg.de](http://www.klinikum.uni-heidelberg.de)).

### 2.2.2 Genomun yapısı

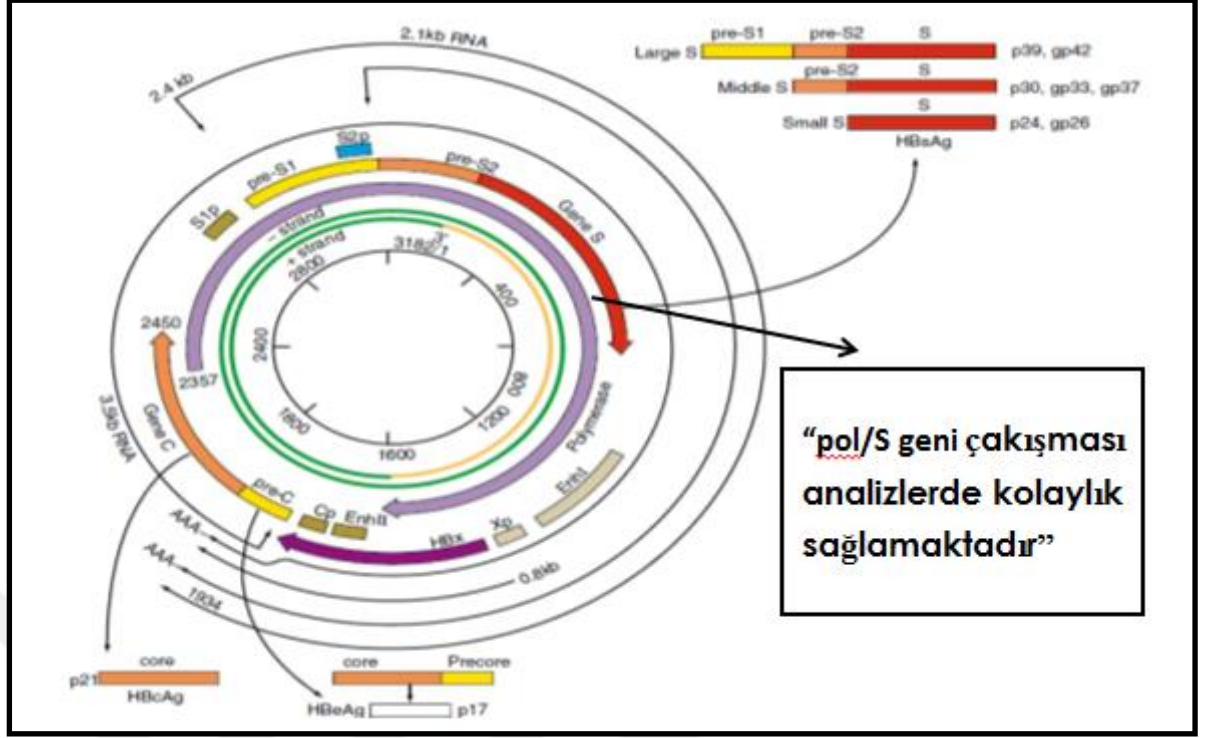
HBV, 3200 nükleotidden oluşan genomik yapısı ile bilinen hayvan virusları içinde en küçük genoma sahip olan DNA virusudur. Viral genom kısmen çift sarmallı (%70 çift, %30 tek) çembersel DNA'dan oluşmaktadır<sup>17</sup>. Pozitif polariteli ipçik, negatif ipçikten daha kısadır ve değişken uzunluktadır. Komplementer 5' ucunun hidrojen bağı ile bağlanması sonucu viral genomun çembersel yapısı oluşmaktadır. Pozitif zincirin 5' ucu sabit, 3' ucu ise genomda herhangi bir yerde olabilmektedir. İpçiklerin 5' uçlarındaki 244 bp.lik bölgede her iki ipçik üzerinde 10-12 nükleotidlik 'Direct repeats 1' (DR1) ve 'Direct repeats 2' (DR2) olarak tanımlanan benzer diziler bulunmaktadır. Bu bölgeler viral DNA sentezinin başlamasında önemli rol oynamaktadır<sup>22,24</sup> (Şekil 3).

HBV genomunda genetik bilginin tamamı uzun sarmal üzerinde kodlanmış olup, bu sarmal genom içerisindeki proteinleri kodlayan dört açık okuma çerçevesi (open reading frame: ORF) oluşturacak şekilde organize olmuştur<sup>25</sup>;

- PreS/S geni zarf proteinlerini kodlamaktadır. PreS1, preS2 ve S gen bölgelerini içermektedir. Küçük (S), orta (M) ve büyük (L) olmak üzere üç farklı yüzey antijeni sentezlemektedir. Okuma işlemi gen üzerindeki ilk kodondan başlarsa preS1, preS2 ve S gen bölgelerinin tümü okunacağından kılıfın büyük proteini (Large protein: L-HBs) sentezlenir. Okuma işlemi S geni üzerindeki ikinci kodondan başlarsa preS2 ve S bölgelerinin ürünü olan orta protein (Medium protein: M-HBs) sentezlenir. Okuma işlemi üçüncü kodondan başladığında sadece S bölgesi okunduğundan kılıfın küçük proteini (Small protein: S-HBs) sentezlenir. Zarfın temel ünitesi olan HBsAg, S, L ve M kılıf proteinlerini değişik oranlarda içermekle birlikte baskın olan S proteindir.<sup>24,26</sup> (Şekil 3)
- C geni 'core' (çekirdek) nükleokapsid polipeptidini (HBcAg) kodlamaktadır. C gen bölgesinde başlangıç kodonları iki parça halinde bulunmaktadır. Translasyon C başlangıç kodonundan başladığında C polipeptidi (HBcAg), pre-C başlangıç kodonundan başladığında ise HBeAg sentezlenmektedir (Şekil 3)<sup>24</sup>.
- *Pol* geni, HBV genomunun yaklaşık  $\frac{3}{4}$ 'ünü kodlayan en uzun gendir. P proteini, reverz transkriptaz, RNase-H (ribonükleaz) ve hem DNA hem de RNA bağımlı polimeraz aktivitesine sahiptir. Bu enzim, pozitif zincirli DNA'nın 3' ucunu primer ve negatif zinciri kalıp olarak kullanarak, virion DNA'sının tek zincirli bölgesini doldurma yeteneğine sahiptir. Bu endojen polimeraz reaksiyonuyla, tamamen çift zincirli, gevşek ve çembersel yapıdaki viral DNA oluşmaktadır<sup>27</sup>.
- X geni ise HBx proteinini kodlamaktadır.

PreS/S ORF bölgesi ile Pol ORF bölgesi ile tamamen örtüşük şekilde; C ve X ORF bölgeleri ise Pol ORF bölgesi ile kısmi olarak örtüşük şekilde bulunur. Virusun replikasyonu sırasında, kovalent olarak kapalı çembersel DNA (covalently closed circular DNA; cccDNA) formuna dönüştürülen genomdan, virusa ait mRNA transkriptleri sentezlenmektedir (Şekil 3)<sup>25</sup>.





Şekil 3: Hepatit B virusunun genomik organizasyonu ve sentezlenen RNA'lar (28 Numaralı kaynaktan uyarlanmıştır).

### 2.2.3 Virus Proteinleri

#### 2.2.3.1 HBsAg

Konak sitoplazmasında üretilir. S proteinlerinin 'a' determinantından başka iki determinanti daha saptanmıştır; 'd' ya da 'y' ile 'w' ya da 'r'. Ancak 'a' determinanti bütün HBsAg pozitif hastalarda olup, buna karşı oluşan anti HBs antikorunun HBV'nin hepatositlere bağlanmasını engeller ve tüm subtiplere karşı etkili bir bağışıklık sağlar.<sup>29</sup>

#### 2.2.3.2 HBcAg:

Sadece karaciğer hücresinde tespit edilebilmektedir. Sıklıkla intranükleer yerleşimlidir, ancak aktif hastalık döneminde ve aşırı viral replikasyon gösteren olgularda sitoplazmada da yaygın olarak saptanabilir<sup>20</sup>.

### 2.2.3.3 HBeAg

Replikasyonunun göstergesidir. HBeAg negatif olan prekor mutantlarında bu antijen salınmamakta, fakat replikasyon devam etmektedir. HBeAg'nin gerçek invivo fonksiyonu tam olarak bilinmemekle birlikte viral replikasyon için gerekli olmadığı anlaşılmıştır.<sup>30</sup> Ancak doğal infeksiyon sırasında periferal kanda HBeAg varlığı yüksek düzey viremi ile ilişkilidir ve yüksek infektiviteyi yansıtır. Bu çelişkili durum, HBeAg translasyonunun yapıldığı mRNA transkriptlerinin (genomik RNA) aynı zamanda viral DNA sentezi için de kalıp olarak kullanılmasından kaynaklanmaktadır. Dolayısıyla yüksek düzey HBeAg üretimi, yüksek düzey genomik RNA sentezi ve sonuç olarak etkin viral genom replikasyonunun bir göstergesidir.<sup>24</sup>

### 2.2.3.4 P proteini

90 kDa molekül ağırlığındaki bu proteinin en az dört farklı işleve sahip bölgesi vardır. Aminoterminal parçası, negatif sarmalın sentezlenmesinde RNA pregenomunun reverz transkripsiyonu için öncül görevi görür. Orta parça, negatif sarmal sentezi için reverz transkriptaz ve pozitif sarmal için DNA polimeraz olarak işlev görür. Karboksi uçtaki parça ise negatif sarmal sentezi sırasında RNA pregenomunun degradasyonu için gerekli olan RNase-H'i kodlar.<sup>21</sup>

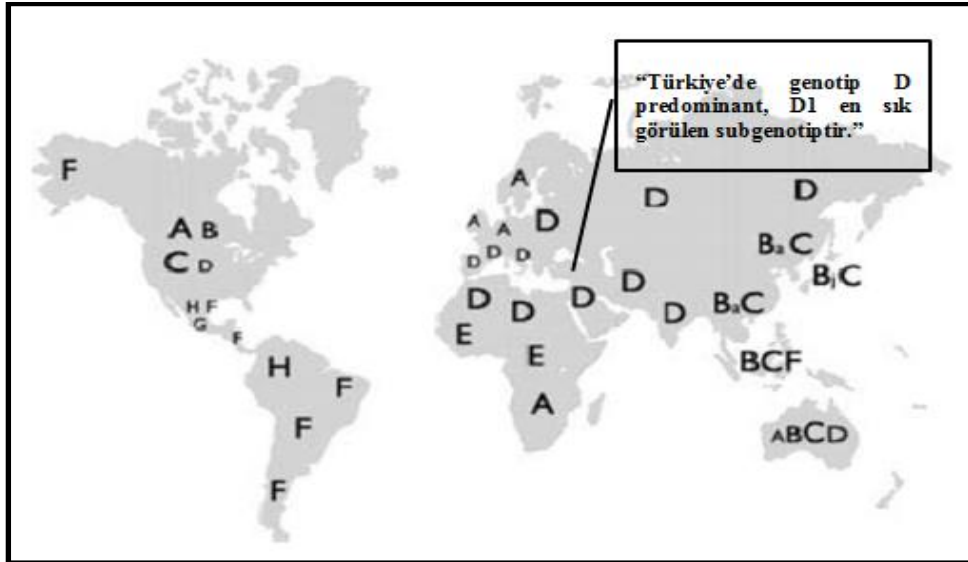
### 2.2.3.5 HBxAg

Hücrel sinyal yollarını aktive edebilmektedir. Diğer taraftan X proteini, tümör supresör gen ürününün (p53) işlevini bozmaktadır. Bu durum HBV ile ilişkili hepatokarsinogenez sürecinin ilk aşamasında etkili olarak, HBxAg (HBV X protein)'nin HCC gelişiminde rol oynayabileceğini akla getirmektedir. X dizisi içeren sentetik peptidler, hasta serumlarında AntiHBx antikorlarının saptanmasında kullanılmış ve HCC'nin erken tanısında yararlı olabileceği bildirilmiştir.<sup>31</sup>

### 2.3 Hepatit B Virusunun Genotip ve Subtipleri

Günümüzde HBV'nin tanımlanan sekiz genotipi (A-H) bulunmaktadır. Farklı genotiplerin varlığında hastalığın klinik seyrinde ve tedavi yanıtında farklılıklar izlenmektedir. Bu nedenle KHB infeksiyonu varlığında genotipin belirlenmesi, hastalığın seyrinin öngörülmesi ve uygun tedavi seçeneğinin belirlenmesi açısından önemlidir.<sup>32,33</sup>

Genotipik dağılımın coğrafik olarak farklılık gösterdiği bilinmektedir (Şekil 4). Kuzey Avrupa, ABD ve Orta Afrika'da genotip A; Asya'da genotip B ve C; Güney Avrupa, Ortadoğu ve Hindistan'da genotip D; Afrika'da genotip E; Orta ve Güney Amerika'da özellikle Pasifik okyanusundaki adalarda (Polinezya) genotip F ve ABD ve Fransa'da genotip G sık görülmektedir. Genotip H ise, ilk olarak ABD ve Nikaragua'da tanımlanmış daha sonra Orta Amerika, Meksika ve Japonya'dan bildirilmiştir.<sup>32,34</sup> Yapılan çalışmalar Türkiye'de HBV genotip D'nin baskın olduğunu göstermekle birlikte genotip D dışında diğer genotiplerin de bulunabildiğini göstermektedir.<sup>35</sup>



Şekil 4: Hepatit B virusu genotiplerinin coğrafik dağılımı (<sup>36</sup> Numaralı kaynaktan uyarlanmıştır).

HBV genotiplerinin coğrafi dağılım dışında virülans farklılıklarının olduğu da düşünülmektedir. Yapılan bir çalışmada, A genotipinin daha ağır infeksiyonlara neden

olabileceği bildirilmiştir. B genotipinin 50 yaş altında HCC gelişimi ile C genotipinin ise daha ağır karaciğer hasarı ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Ülkemizde dominant olarak görülen genotip D infeksiyonunda HBeAg serokonversiyonu daha düşük oranlardadır ve precore-core mutasyonu sık görülmektedir.<sup>14,20</sup>

HBV genotipleri ile tedaviye yanıt arasındaki ilişki değerlendirildiğinde, Almanya’da yapılan bir çalışmada IFN’a bağlı HBeAg serokonversiyonunun genotip A’da D’den daha sık olduğu görülmüştür.<sup>37</sup> Tayvan’daki bir diğer çalışmada ise tedavi yanıtı serum aminotransferaz düzeylerinin normale inmesi, tedaviden sonraki 48 haftalık izlemde HBeAg ve HBV DNA’nın negatifleşmesi olarak değerlendirildiğinde IFN tedavisine genotip B’nin C’den daha iyi yanıt verdiği bildirilmiştir.<sup>38</sup>

S proteininin farklı determinantının kombinasyonları ile subtipler 9’a ulaşmıştır: Bunlar ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adw2, adw4, adrq+, adrq- subtipleridir. Monoklonal antikolarla serolojik olarak ayırt edilebilen bu subtiplerin saptanması infeksiyon kaynağının belirlenmesi açısından önem taşımaktadır. Tüm HBV serotiplerinde ortak olan immünodominant “a” determinanı nedeni ile farklı serotiplerle reinfeksiyon nadirdir. Ülkemizde görülen alt tip ise ayw3 ve ayw2 olarak saptanmıştır.<sup>39</sup>

## **2.4 Virus Replikasyonu**

HBV’nin replikasyon kapasitesi yüksektir ve günde  $>10^{12}$  virus salınmaktadır. HBV replikasyonu sitopatik değildir ve hücrede belirgin bir morfolojik değişiklik yapmamaktadır.<sup>40</sup> HBV’nin kanıtlanmış tek replikasyon yeri hepatositler olduğu bilinmekle birlikte safra kanalı epitelyum hücreleri, pankreasın bazı endokrin ve ekzokrin hücreleri, böbrek ve lenfoid doku da infeksiyon hedefi olabilmektedir. Ancak hepatosit dışı replikasyon bölgelerinin patogeneizde rolü olmadığı düşünülmektedir.<sup>41</sup>

### **2.4.1 Hepatit B Virusunun replikasyon basamakları (Şekil 5)**

Virusun hücre yüzeyine tutunması ve reseptör bağımlı endositoz ile hücre içine girmesi ile replikasyon başlamaktadır. S proteinine özgü bazı reseptörlerin (endonexin

II, siyaloglikoprotein gibi) varlığı gösterilmiş olsa da, HBV'nin hepatositlere tutunmasında L ve M proteinlerinin de önemli olduğu gösterilmiştir. <sup>41,42</sup>

Hücreye giren ve zarftan ayrılan nükleokapsid, işlenmeden pasif difüzyon ve tübüler taşınım ile konak hücre çekirdeğine taşınmaktadır. <sup>41,43</sup>

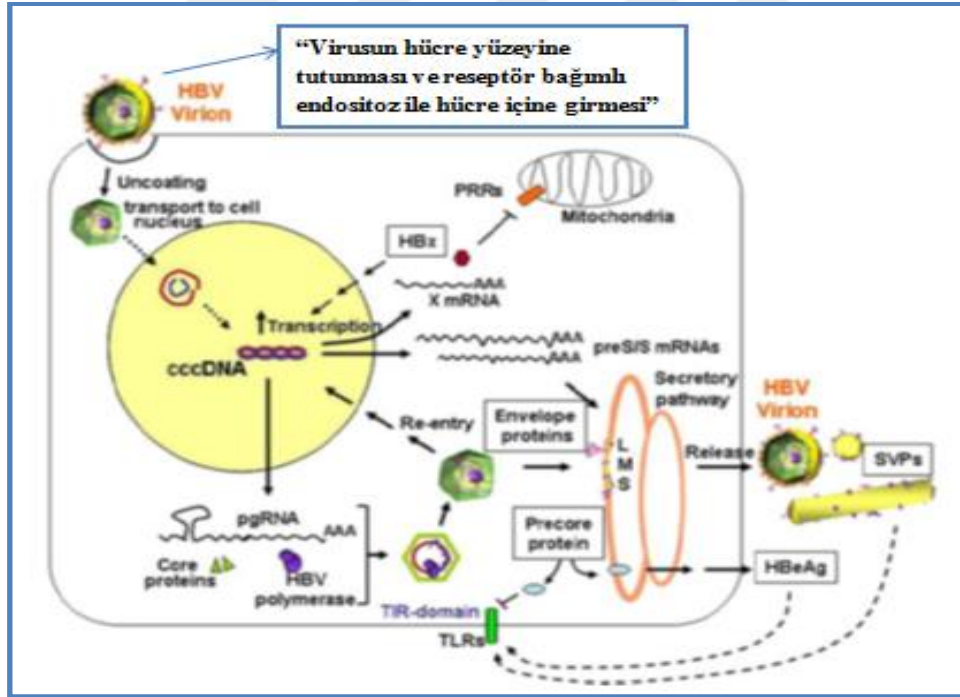
Kısmen çift sarmallı ve her iki ucu serbest halde bulunan DNA'nın kısa sarmalının eksik olan bölümü endojen DNA polimeraz tarafından tamamlanır. Bu sırada uzun sarmalın 5' ve 3' uçları arasındaki açıklık onarılır ve sonuçta çift sarmallı, uçları kapalı, sirküler yapıda bir HBV DNA (cccDNA) meydana gelir. Replikasyonun normal seyri sırasında, HBV DNA'nın konak genomuna integrasyonu görülmez. Viral mRNA'ların transkripsiyonunda kalıp görevini yapan cccDNA, viral minikromozomlar oluşturacak şekilde nükleozomların içinde organize olur. Hepatosit çekirdeğindeki cccDNA rezervuarı HBV enfeksiyonunun persistansında en önemli faktördür <sup>41,43</sup>

Kalıp olarak kullanılan cccDNA'dan konak hücre RNA polimerazının yardımı ve viral düzenleyicilerin etkisiyle dört tip viral mRNA sentezlenir. HBV'nin mRNA sentezini yöneten PreC/C, PreS1, S, X olmak üzere dört promoter bölgesi bulunmaktadır. Core promoter bölgesi viral replikasyonun merkezidir ve pregenomik RNA (pgRNA) olarak adlandırılan, viral genomdan daha uzun olan 3.5 kb'lık en büyük RNA'yı sentezletir. PgrNA, hem reverz transkripsiyonla viral genom sentezi için kullanılır, hem de diğer mRNA'lar için translasyona uğrayarak HBcAg, HBeAg ve polimeraz proteinlerini sentezletir. 2.4 kb'lık transkriptten ise pre-S1, pre-S2 ve HBsAg kodlanırken, 2.1 kb'lık transkriptten de pre-S2 ve HBsAg kodlanır. 0.7 kb'lık en küçük transkriptten ise X proteini sentezlenir. Bu transkriptler adenilasyona uğrayarak sitoplazmaya taşınırlar. Sonra viral proteinleri (HBcAg, HBeAg, Pol protein, viral zarf proteinleri, HBx) oluşturmak üzere translasyona uğrarlar. <sup>41,43</sup>

Konak hücre sitoplazmasında devam eden replikasyon boyunca viral polimeraz enziminin reverz transkriptaz aktivitesi ile pgRNA'dan negatif DNA iplikçığı sentezlenir. Sentez ilerledikçe pgRNA, viral polimerazın RNase-H etkisiyle yıkılır. Kısa zincirin sentezinde kalıp olarak uzun sarmal kullanılır ve DNA polimeraz

aktivitesi ile 5' ucundaki RNA primeri kullanılarak pozitif iplikçik sentezlenir. Kısmen çift sarmallı sirküler yapıdaki kor yapısının kılıf proteinleri tarafından çevrenmesi ve aynı zamanda polimerazın da tükenmesi nedeniyle kısa zincirin sentezi tamamlanamaz ve bu sarmal eksik kalır.<sup>41,43</sup>

HBs proteinleri, endoplazmik retikulumda öncelikle transmembran proteinleri olarak sentezlenir. Daha sonra HBc proteini sitozolde sentezlenip zarf proteinleri (özellikle LHb) tarafından paketlenir. Viral genom oluşuktan sonra partiküller endoplazmik retikulum içine tomurcuklanarak glikoprotein zarfını kazanır ve veziküler taşıyım ile hücre dışına salınır. HBV replikasyonu sırasında sitoplazmada yeni sentezlenen viral DNA'ların bir kısmı çekirdeğe taşınarak orada sürekli cccDNA havuzu oluşturulmasını sağlar. Sentezlenen HBsAg ise cccDNA oluşumunu inhibe eder. Bunlar virus replikasyonunun (+) ve (-) geri bildirim (feed back) mekanizmaları olabilir.<sup>41,43</sup>



Şekil 5: Hepatit B virusunun replikasyonu ( <sup>44</sup> Numaralı kaynaktan uyarlanmıştır).

## 2.5 Hepatit B Virus Mutantları

HBV, yüksek replikasyon kapasitesi ve ters transkripsiyon işleminde hata düzeltememe özelliğinden dolayı yüksek mutasyon sıklığına sahip bir virustur. HBV polimerazının hata oranı diğer DNA viruslarından yaklaşık  $10^4$  kat daha yüksektir. Oluşan bu viral mutantlar, endojen (fonksiyonel kısıtlamalar, immün sistemin etkileri, vb) ve ekzojen (aşılama, ilaç tedavisi, vb) faktörlerle sınırlandırılmakla birlikte, bu faktörlerin seçici baskısı ile yeni mutantlar ortaya çıkabilmektedir. Diğer bir deyişle, konaktaki virusa herhangi bir avantaj sağlayan mutasyonu taşıyan suşlar seçilerek baskın popülasyon haline gelecektir. Dolayısıyla infekte bir kişideki virus popülasyonu, genetik olarak yakın, ancak farklı özelliklere sahip varyantların (quasispecies; türümsü) bir kombinasyonu olarak karşımıza çıkacaktır.<sup>22,45</sup>

### 2.5.1 Prekor/kor Geni Mutasyonları

Prekor ve kor proteinlerini kodlayan ORF'de iki farklı başlama kodonu bulunmaktadır. Ancak prekor bölgesinde stop kodon bulunmaz ve prekor bölgesinin başlangıç kodonundan başlayan sentez işlemi kor bölgesinin start kodonu ile devam eder. HBeAg yapısal bir protein değildir ve gerçek fonksiyonu bilinmemektedir. HBeAg replikasyon göstergesi olarak kabul edilse de bazı replikatif infeksiyonlarda HBeAg saptanamamaktadır. Bunun en sık nedeni prekor stop kodon, daha ender olarak da kor promoter mutasyonlarıdır.<sup>46</sup>

Güney Avrupa ve Asya'lı hastalarda HBeAg negatifliğine rağmen ciddi karaciğer hastalığı ve aktif viremi tablosu görülmesi nedeniyle yapılan çalışmalarda, prekor bölgesinin dizi analizinde 1896. nükleotidde guanin yerine adenin değişimi ile sonuçlanan bir nokta mutasyonu gösterilmiştir. Bu prekor stop kodon mutasyonu (PSKM), HBeAg üretiminin durdurulmasına, ancak kor proteini üretiminin devam etmesine yol açmaktadır. PSKM, genotip B, C, D ve E'nin predominant olduğu ülkelerde yaygın olarak görülmektedir.<sup>25,47</sup>

Bu bölgedeki mutasyonlar ile hepatositlerde, enkapside olmamış replikasyon araçlarının birikmesi ve viral birleşmenin bloke olması sonucunda viral replikasyon etkilenir. Bu durum, replikasyon araçlarının kromozomal DNA'ya entegrasyonunu artırarak hepatokarsinogeneze katkıda bulunmaktadır.<sup>48</sup>

HBeAg negatif olguların bir kısmında prekor mutasyonu bulunmamaktadır. Yapılan çalışmalarda HBeAg sentezini transkripsiyon düzeyinde kontrol eden bazal kor promoter (BKP) bölgesindeki bazı mutasyonların, HBeAg negatif olgularda pozitif olanlara oranla daha fazla görüldüğü saptanmıştır. BKP bölgesini etkileyen bu mutasyonlar, prekor/kor RNA'larının transkripsiyonunda azalma şeklinde kendini göstermektedir. BKP bölgesinde A1762T ve G1764A mutasyonları, viral genotiplere bağlı olarak yalnız ya da prekor mutasyonları ile birlikte görülebilirler. A1762T ve G1764A çift mutasyonunun varlığı ise, HBeAg sentezinde azalmaya ve viral yükte artışa neden olmaktadır. Genel olarak bu mutasyon tipi sıklıkla A genotipi ile infekte kişilerde ortaya çıkmaktadır. BKP bölgesinde oluşan mutasyonlar, daha az prekor ve kor transkriptinin ve kor proteininin oluşmasına neden olurlar; ancak pgRNA transkripsiyonunu ya da polimeraz/kor proteinlerinin translasyonunu etkilemezler.<sup>47</sup>

## 2.5.2 Yüzey Geni Mutasyonları

HBsAg fenotipleri arasında farklı coğrafi dağılımlar görülse de subtip değişikliğinin infeksiyonun doğası üzerinde herhangi bir etkisi yoktur. Tüm subtiplerde "a" determinantı ortak olduğundan ve bu bölgeye karşı oluşan antikorlar HBV'nin hepatositlere bağlanmasını engellediğinden; ister aşı, isterse doğal infeksiyonun geçirilmesi ile herhangi bir sub tipe karşı gelişmiş olan humoral bağışık yanıt tüm serotiplere karşı koruyuculuk sağlamaktadır. Fakat "a" determinantındaki değişiklik hallerinde klasik HBsAg subtiplerine karşı meydana gelen antikorların koruyucu özelliği kalmamaktadır.<sup>49</sup>

Aşı ile ilişkili ilk kaçak mutant 1988 yılında İtalya'da görülmüştür. HBeAg pozitif anneden doğduğu için pasif ve aktif immünizasyon uygulanan bir bebeğin yeterli düzeyde anti HBs'ye sahip olduğu halde bir süre sonra HBsAg ve HBeAg pozitifleşerek bebekte kronik hepatit geliştiği saptanmıştır. Anne ve çocuktan elde edilen HBsAg epitopları ile "monoklonal anti-a" antikorları karşılaştırıldığında



çocuktan alınan HBsAg epitoplarının anti-a'ya annesininkinden daha az bağlandığı saptanmıştır. Yapılan sekans analizleri sonucunda anneye ait "a" determinantının 145 inci pozisyonunda glisin bulunduğu halde çocuğunkinde arginin bulunduğu ortaya konmuştur. Normalde 587' nci nükleotidde bulunan taban bazı guanin (G)'dir ancak mutant suşlarda guanin, adenin (A) ile yer değiştirmekte, sonuçta GGA (glisin) yerine AGA (arginin) sentezlenmektedir. Bu durumda klasik HBsAg subtipleri ile hazırlanan aşılarda koruyuculuğu yeterli olmamaktadır.<sup>21</sup>

Hepatit B virusunun genomik organizasyonu göz önüne alındığında, "a" determinantındaki değişikliklerin, HBV polimeraz fonksiyonunda değişiklik oluşturma potansiyeli olduğu bilinmektedir. Aynı şekilde HBV tedavisi ile ilişkili polimeraz varyantlarının da, yüzey geni mutasyonlarına yol açma potansiyeli bulunmaktadır.<sup>24,50</sup>

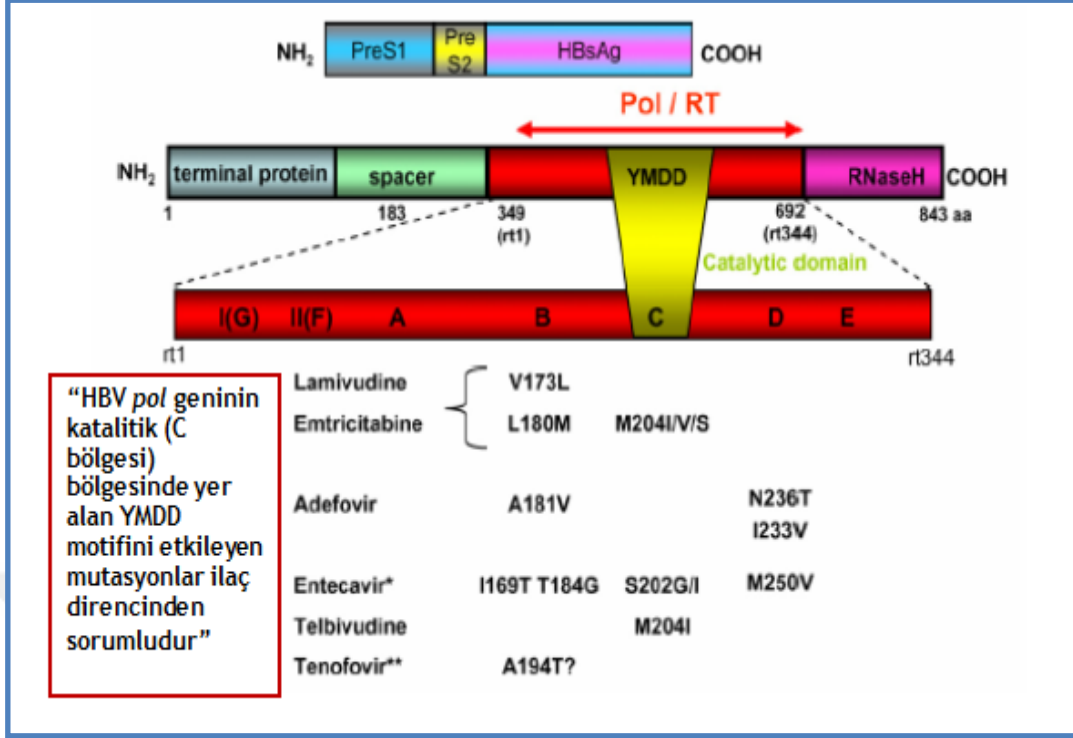
### 2.5.3 Polimeraz Geni Mutasyonları

HBV enfeksiyonunun doğal seyri sırasında polimeraz geni mutasyonları nadiren ortaya çıkmakta ve IFN tedavisi boyunca polimeraz mutasyonları indüklenmemektedir.<sup>51</sup> KHB enfeksiyonlarının tedavisinde NA kullanımı, *pol* geninde mutasyonu olan dirençli virusların seçilmesine ve sonuçta ilaçların klinik etkinliğinde azalmaya neden olmaktadır. HBV'de izlenen ve NA'na direnç oluşturan mutasyonların büyük kısmı, polimeraz proteininin dNTP bağlayan bölgesinde (C kangalı, YMDD motifi) izlenmektedir<sup>52</sup> (Şekil 6). Bunlar arasında, LAM direncinden sorumlu olan rtM204V (YVDD), rtM204I (YIDD) ve rtM204S (YSDD) mutasyonları sayılabilir. YMDD (Y: tirozin; M: metiyonin; D: aspartik asit) motifinde aminoasit değişimi taşıyan dirençli mutantların in vitro replikasyon etkinliğinin, vahşi tip virüslere göre daha düşük olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte, mutant virüsün replikasyon yeteneğini artıracak ikincil (onarıcı; compensatory) mutasyonların, dirençten sorumlu ana mutasyonlarla birlikte seçildiği bilinmektedir.<sup>53</sup>

Önemli bir diğer konu ise, HBV genomunda yer alan *pol* geni, S geni ile üst üste çakışarak tamamen örtüşmektedir (Şekil 6). HBV *pol* geninde hem primer hem de kompensatuvar (replikasyon kapasitesini onarıcı/viral yükü artırıcı) NA direnç

mutasyonları, HBsAg'i kodlayan bölgede değişikliklere neden olabilmektedir. Yapılan güncel çalışmalarda HBV *pol/S* geni çakışmasına bağlı olarak 'ilaca bağlı gelişen potansiyel aşı kaçığı mutasyonu' (ADAPVEM) kavramı kullanılmaya başlanmıştır. Ülkemizde KHB' li hastalarda yaygın olarak kullanılan LAM ve LdT tedavilerinin ADAPVEM oluşturma potansiyeli bulunmaktadır.<sup>54</sup> Ülkemizde yapılan bir çalışmada KHB'nin tüm klinik fazlarında ADAPVEM'lerin gelişebildiği ve NA tedavilerinde (%24) ADAPVEM oluşumunun naif bireylere göre (%0,7) predominant olduğu gösterilmiştir.<sup>55</sup>

LAM ile seçilen HBV *pol/rt* mutasyonları, S geninde mutasyonlara yol açabilmekte ve bu mutasyonlar, HBsAg proteinlerinin aminoasit dizisini dolayısıyla antijenik özelliğini değiştirebilmektedirler. Toressi ve arkadaşları bu mutasyonlara bağlı olarak antijenik yapısı değişmiş olan HBsAg'ye, anti HBs antikorlarının daha az bağlandığını bildirmişlerdir. Anti HBs'ye affinitesi azalmış HBsAg, tanı testlerinde yanlış negatifliklere veya aşı ya da HBIg (Hepatit B immunglobulin) ile korumada yetersizliğe yol açabilmektedir.<sup>12,56</sup> HBV aşı kaçığı mutasyonlarına sahip olan suşlar, aşılanmış bireylere de bulaşabilme potansiyeli taşıdığından, lokal ya da global hepatit B bağışıklama programlarında risk oluşturabilirler.<sup>57</sup>



Şekil 6: Polimeraz geninde meydana gelen ilaç direnç mutasyonları ( <sup>58</sup> Numaralı kaynaktan uyarlanmıştır).

#### 2.5.4 X Geni Mutasyonları

X proteini HBV genlerini transaktive etmekte ve kor promoter, enhancer II, DR1 ile DR2 bu bölgede yer almaktadır. X geninde meydana gelen mutasyonların fonksiyonel önemi tam olarak açıklığa kavuşmamış olmakla beraber bu tip varyantların infektiviteleri zayıf, replikasyon yetenekleri düşüktür. KHB infeksiyonlu, HCC'li, fulminant hepatitli ve sirozun son döneminde bulunan hastalarda X geni üzerinde 130. kodondaki AAG (lizin) yerine ATG (methionin) ve 131. kodondaki GTC (valin) yerine ATC (izolösün) değişimi ile sonuçlanan nokta mutasyonlar bildirilmiştir. Her iki mutasyon da transaktivasyon için gerekli olan ve genomun 132 - 139. kodonları arasında bulunan enhancer II-kor promoter bölgesinde yer alır. 1770 - 1777. pozisyonlar arasındaki 8 nükleotidlik delesyonunun, DNA ekspresyon ve replikasyonunu baskıladığı ve sonuçta HBsAg'nin negatif hale geldiği bildirilmiştir.<sup>59</sup>

## 2.6 Virusun Stabilitesi

HBV, serum içinde 30-32°C'de altı ay, -20°C'de ise yıllarca canlılığını korumaktadır. HBsAg'nin stabilitesi virusun stabilitesi ile uyum göstermemekle birlikte her ikisi de -20 °C'ye 20 yıldan fazla dayanabildiği gibi tekrarlayan dondurma ve çözdürmelere karşı da dayanıklıdırlar. Kurutulmuş virus 25°C'de saklandığında bir hafta süreyle canlılığını devam ettirebilmektedir. Kuru sıcak hava ile 180°C'de bir saatte, otoklavda 121°C'de 15 dakikada, kaynatma ile 10-20 dakikada inaktive olmaktadır. HBsAg, pH 2,4'te altı saat stabil kalabilirken virus infektivitesini yitirir, ancak immunojenite ve antijenik özelliğini korur. HBsAg, %2.5 sodyum hipoklorit varlığında üç dakikada antijenik özelliğini ve infektivitesini yitirir. HBsAg içeren kan ve kan ürünlerinin ultraviyole ışınlarına maruz kalmasının infektivite ve antijenik yapı üzerine etkisi yoktur. Son çalışmalar HBV'nin sodyum hipoklorit (500mg serbest Cl/ml) ile 10 dakikada, %0.1-2 aköz glutaraldehid, %70 izopropil alkol, %80 etil alkolde 2 dakikada inaktive olduğunu göstermiştir.<sup>41</sup>

## 2.7 Hepatit B Virus İnfeksiyonu

### 2.7.1 Epidemiyoloji

#### 2.7.1.1 Dünyada Hepatit B Virus İnfeksiyonu

Dünyada yaklaşık olarak iki milyar kişinin HBV ile karşılaştığı, yaklaşık 400 milyon kişinin HBV ile kronik olarak infekte olduğu bilinmektedir. Bu kişilerin Dünya Sağlık Örgütü'ne göre % 5'i kronik hastadır. Bu kronik hastaların yaklaşık dörtte birinde siroza ve HCC'e ilerleme olmakta ve bu hastalardan da yaklaşık yılda 1 milyon kişi hepatit B virusuna bağlı komplikasyonlar nedeniyle kaybedilmektedir.<sup>22-1:2</sup>

HBV infeksiyonunun görülme sıklığı ve yaygın bulaşma yoluna göre dünya ülkeleri üç gruba ayrılmaktadır:

- Yüksek endemisite ülkelerinde toplumda HBsAg pozitifliği görülme oranı % 8'in üzerindedir. Dünya nüfusunun yaklaşık % 45'i bu ülkelerde yaşamaktadır.

Japonya ve Hindistan dışında kalan birçok Asya ülkesi, Amazon bölgesi, Pasifik Adaları, Afrika ülkeleri, Alaska, Avustralya ve Yeni Zelanda yerlileri yüksek endemite bölgeleri arasında yer almaktadır. Bu yüksek endemite ülkelerinde infeksiyon çoğunlukla kronikleşme riskinin yüksek olduğu yenidoğan ve erken çocukluk döneminde kazanılmaktadır. Bu dönemde asemptomatik infeksiyon geçirilmesi nedeniyle akut hastalık tanısı az, fakat kronik karaciğer hastalığı ve HCC oranı yüksektir.<sup>41</sup>

- Türkiye’nde içinde yer aldığı orta endemite ülkelerinde HBsAg prevalansının % 2–7 arasındadır. Kuzey Afrika ülkeleri, Ortadoğu ülkeleri, Akdeniz havzası, Doğu Avrupa ve Rusya orta endemite ülkeleri arasında sayılmaktadır. Bu bölgelerde daha çok horizontal bulaş sözkonusudur, perinatal bulaş % 10–20 oranında görülmektedir. Dünya nüfusunun % 43’ü orta endemite ülkelerinde yaşamaktadır. İnfeksiyon sıklıkla erişkin ve adölesan dönemde oluştuğundan bu ülkelerde akut infeksiyon sık görülmektedir.<sup>41,60</sup>

- Düşük endemite ülkelerinde ise toplumdaki HBsAg pozitifliği % 2’nin altındadır. Dünya nüfusunun sadece % 12’si bu ülkelerde yaşamaktadır. ABD, Kuzey ve Batı Avrupa ülkeleri, Avustralya düşük endemite ülkeleridir. Bu ülkelerde yaşam boyunca HBV ile karşılaşma riski % 20’den azdır. İnfeksiyonların çoğu erişkinlerde ve risk gruplarında görülmektedir. ABD’de KHB infeksiyonu prevalansı % 0.35’dir. Akut HBV infeksiyonu genellikle erişkinlerde görülmekle birlikte kronik infeksiyonların üçte biri perinatal olarak veya erken çocuklukta kazanılmıştır.<sup>41</sup>

### **2.7.1.2 Türkiye’de Hepatit B Virus İnfeksiyonu**

Türkiye, epidemiyolojik olarak HBV infeksiyonu yönünden orta endemik ülkeler arasında yer almaktadır. Ülkemizden bildirilen HBsAg pozitiflik oranları ülke genelinde % 1-14.3 arasında değişmekte; batı bölgelerimizde bu oran ortalama %3-4.5 arasında iken, doğu ve güneydoğu bölgelerimizde ise çok daha yüksek oranlara (%8-14.3) ulaşmaktadır.<sup>41</sup>

Türkiye’de 3,5 milyon insan HBV ile infekte olup, bunların sadece 400 bini tedavi alabilmektedir. Geri kalanlar ise HBV ile infekte olduğundan habersiz olarak yaşamını sürdürmektedir.<sup>60</sup>

### 2.7.1.3 Bulaşma Yolları ve Risk Grupları

Parenteral yol, virusun en önemli bulaşma yoludur. İnfekte kan ve kan ürünlerinin transfüzyonu, damar içi uyuşturucu kullanıcılarında ortak enjektör kullanımı, hemodiyaliz, endoskopi, dövme yaptırma, akupunktur, jilet gibi kesicidelici aletlerin ortak kullanımı virusun bulaşmasına neden olabilmektedir. Sağlık personeli, sürekli kan transfüzyonu yapılan hastalar, hemodiyalize giren hastalar ve uyuşturucu bağımlıları riskli grubunda yer almaktadır.<sup>61</sup>

Kan ve kan ürünlerinin ELISA (Enzyme-Linked İmmunosorbent Assay) gibi duyarlı testlerle HBsAg açısından taranması transfüzyon aracılığıyla HBV'nin bulaşını çok azalmıştır. Nadir de olsa HBsAg negatif bulunan kanlarla da post transfüzyon Hepatit B infeksiyonu oluşabilmektedir. Bu duruma taramalarda kullanılan kitlerin duyarlılık farklılıkları yanında, HBsAg negatif sağlıklı HBV taşıyıcılarının varlığı neden olmaktadır.<sup>62</sup>

Kan ve kan ürünleri dışında semen, tükürük, idrar, feçes, ter, gözyaşı, vaginal salgılar, sinoviyal sıvılar, beyin omurilik sıvısı ve kordon kanında da HBsAg varlığı ve HBV DNA pozitifliği gösterilmiştir. Doğrudan kandan oluşan eksuda, plevra ve periton sıvıları gibi vücut sıvılarındaki virion yoğunluğu serumdaki ile benzer düzeydedir. HBeAg pozitif kişilerin serumlarında mililitrede  $10^8$ - $10^{10}$  virion, anti HBe pozitif kişilerin serumlarında ise mililitrede  $10^1$ - $10^7$  virion bulunduğu saptanmıştır. Semen ve tükürükteki virion yükü aynı bireyin serumundakine göre  $10^3$  kez daha azdır. Diğer salgılarda ise yoğunluk çok daha düşük olarak bulunduğundan bulaşmada önemli rol oynamazlar.<sup>62</sup>

HBV cinsel salgılarda bulunduğundan, cinsel eşe mukozal yoldan bulaş olabilmektedir. Travmatik ilişkilerde ve başka bir cinsel yolla bulaşan hastalık varlığında bulaşma riski daha da artmaktadır. Akut veya kronik hastaların eşleri, çoklu cinsel eşi olanlar, homoseksüeller bu yolla bulaşda riskli grubu oluşturmaktadırlar.<sup>62</sup>

İnfekte annenin bebeğine bulaş oranı % 40-50 arasında değişmektedir. HBeAg pozitif bir anneden bulaş riski bundan daha yüksek (%70-90) iken, HBeAg negatif anneden bebeğe bulaş riski %5-20'dir. Anneden bebeğe bulaşma, doğum sırasında veya doğumdan sonra oluşabilen deri ve mukoza sıyrıklarının infekte maternal sıvılarla teması, vaginal kanaldan geçiş sırasında anne kanının yutulması, sezeryan sırasında anne kanı ile temas veya plasenta hasarı sonucu maternal dolaşımın fetal dolaşıma karışması gibi nedenler ile olmaktadır. Postnatal anne sütü aracılığıyla da bulaşma olabilmektedir. İntrauterin bulaş oranı ise %5-10 arasındadır.<sup>62</sup>

Aynı ev içinde, yakın yaşama koşullarında da HBV bulaşabilmektedir. Bu horizontal bulaşma yolu özellikle aile içinde HBV taşıyıcılarının olması durumunda ve diğer bulaşma yollarının geçerli olmadığı ortak yaşam koşullarında meydana geldiği düşünülmektedir. Özellikle deri çizikleri, diğer lezyonlar, tükürük ya da idrar yoluyla bulaşma olduğu sanılmaktadır.<sup>62</sup>

HBV bulaşında mevsim ve yaş gibi faktörlerin rolü bulunmamaktadır. Fekal-oral yolla HBV bulaşı olmadığından infeksiyonun yayılmasında su ve gıdaların önemi yoktur. Oral yolla bulaşma ancak infekte kanın, hasarlanmış oral mukozaya temas etmesiyle gerçekleşebilmektedir.<sup>23</sup>

### **2.7.2 Patogenez ve immünite**

HBV hepatositlerde sitopatik bir etki oluşturmaksızın replike olmaktadır. Karaciğer hasarının oluşmasında viral faktörlerden çok konak immün yanıtının rolü vardır.<sup>40</sup> HBV taşıyıcılarında yüksek düzeyde viral replikasyona rağmen, normal karaciğer enzim düzeyi ve histopatolojisinin olması, virusun direkt sitopatik etkisinin olmadığını göstermektedir. HBV infeksiyonunu doğum sırasında alan yenidoğanlarda yüksek viral replikasyon ve yüksek kronik infeksiyon oranlarına rağmen karaciğerde hafif hasar oluşması da yine bunu desteklemektedir. Bu durumun aksine, HBV'ye bağlı fulminan hepatitlerde düşük virus düzeyine rağmen yaygın hepatosellüler nekroz görülmesi güçlü immün yanıt ile açıklanmaktadır. Immün patogenezin rol oynadığı diğer hastalıklar gibi HBV'de de, viral yayılımı belirleyen değişkenlerle immün sistem değişkenleri arasındaki denge hastalığın sonucunu belirlemektedir.<sup>63</sup>

Viral infeksiyonlara karşı en önemli doğal immün yanıt mekanizmaları, bilindiği gibi virusun hücreleri infekte etmesini takiben ortaya çıkan tip 1 IFN ve Natural Killer hücre yanıtıdır. Ancak ilginç olarak, HBV infeksiyonunda doğal bağışıklık mekanizmalarının, gerek vireminin kontrolüne gerekse karaciğer hücre hasarına önemli bir katkısı yoktur.<sup>40</sup> Bunun nedeni, infeksiyonun ilk dönemlerinde, özgül immün yanıt oluşuncaya kadar, virusun kendisini doğal immün yanıtın tanıma mekanizmalarından başarılı bir şekilde saklamasından kaynaklanmaktadır.<sup>40,64</sup> Dolayısıyla HBV patogenezinde katkıda bulunacak olan özgül immün yanıt elemanları olan T lenfosit yanıtı oluşuncaya kadar hepatosit harabiyeti de ortaya çıkmamaktadır. HBV immünopatogenezinde rol oynayan hücreler primer olarak sitotoksik CD8+ T hücreleridir (Cytotoxic T lymphocyte; CTL). CD4+ T hücreleri ise dolaylı olarak sitotoksik salgılarıyla CTL aktivasyonuna ve kalıcılığına katkıda bulunmaktadır.<sup>40,65</sup>

HBV'nin profesyonel antijen sunan hücreleri infekte etme özelliği olmadığı için, T hücreleri, virusla infekte apoptotik hücreleri fagosite ederek bölgesel lenf nodlarına giden dendritik hücreler tarafından uyarılmaktadır.<sup>40</sup> CTL tarafından virusun temizlenmesi iki farklı mekanizma ile gerçekleşmektedir;<sup>65,66</sup>

- CTL, hepatositleri öldürmeksizin antiviral etki gösteren IFN gama ve tümör nekrozis faktör salgılayarak virus ekspresyonu ve replikasyonunu sınırlandırmaktadır.
- Daha geç dönemde ise sitopatik mekanizmalarla HBV'ye özgül CTL'nin, infekte hücreleri MHC sınıf I antijenleri ile tanıyarak Fas ligand/perforin yoluyla öldürmesi sonucu karaciğer hastalığı ortaya çıkmaktadır.

Kendiliğinden iyileşen akut HBV infeksiyonlarının aksine, KHB infeksiyonu olan hastalarda, nedeni tam olarak açıklanamayan zayıf CD4+ T hücre yanıtı ve zayıf CTL yanıtı olmaktadır.<sup>67</sup> Virusun persistansında öngörülen bir diğer mekanizma da, viral kaçış mutasyonlarıdır. Bu mutasyonlar sonucu B ve T hücre epitoplarının inaktive olduğu ya da değişebildiği gösterilmiştir.<sup>64,68</sup> Kronik infeksiyonlarda T hücre yanıtının yetersiz kalmasında, viral yükün yüksek olmasının da önemli rol oynayabileceği düşünülmektedir.<sup>65</sup>



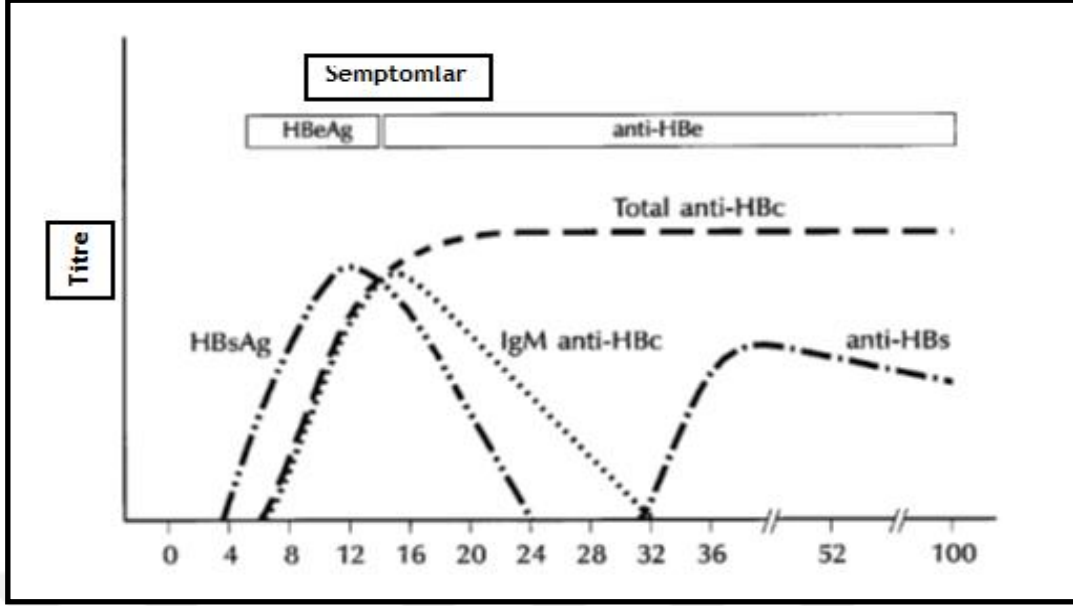
HBV infeksiyonunda, hücrel immün yanıt virusla infekte hücreleri elimine ederken, humoral immün yanıt ise dolaşımdaki viral partikülleri temizleyerek virusun yayılımını sınırlamaktadır. Transaminazların yükseldiği dönemde HBV proteinlerine karşı antikor sentezi başlamıştır. Kendini sınırlayan bir akut infeksiyon sırasında HBcAg, HBeAg, HBsAg proteinlerine karşı güçlü CD4+ T hücre yanıtı gelişmektedir. HBV spesifik CD4+ T hücreleri aynı zamanda HBV spesifik CTL'i aktive etmektedir.<sup>40</sup>

HBV infeksiyonu sırasında oluşan HBsAg, kendisine karşı oluşan antikorlarla immün kompleksler oluşturarak damar endoteli, eklem ve böbreklerde birikmekte ve bunun sonucunda immün kompleks hastalıkları meydana gelebilmektedir. İndüklenen tip III aşırı duyarlılık reaksiyonları sonucu hastalık sırasında deri döküntüleri, artralji ve böbrek harabiyeti meydana gelebilmektedir.<sup>69</sup>

### **2.7.3 Hepatit B Virus İnfeksiyonunda Klinik**

#### **2.7.3.1 Akut Hepatit B Virus İnfeksiyonu**

Akut HBV infeksiyonunun inkübasyon dönemi alınan virus miktarına ve konağın immünitesine bağlı olarak dört ila 28 hafta arasında değişmekle birlikte bu süre çoğunlukla 60 - 180 gündür. Virusun alınmasından yaklaşık altı hafta sonra HBsAg ve diğer aktif viral replikasyon göstergeleri pozitifleşirken, biyokimyasal testlerde bozulma ve klinik belirtiler ortaya çıkmaktadır (Şekil 7).<sup>23</sup> Klinik olarak akut hepatit B, asemptomatik olabileceği gibi, anikterik, ikterik ya da fulminan formda seyredebilmektedir. Akut HBV infeksiyonunun klinik bulguları ve infeksiyonun seyri pek çok duruma bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Bunlar arasında infeksiyonun alındığı yaş, virusun genetik yapısı, eşlik eden bir başka hepatotrop virus infeksiyonunun varlığı, konağın immun durumu önemli faktörlerdendir. Yenidoğan döneminde alınan infeksiyon %90 oranında kronikleşirken, bu oran ilk beş yaşta %30'a, erişkin çağda %5'in altına inmektedir.<sup>70,71</sup>



**Şekil 7: Akut hepatit B virus infeksiyonunun haftalara göre seyri ( <sup>14</sup> Numaralı kaynaktan uyarlanmıştır).**

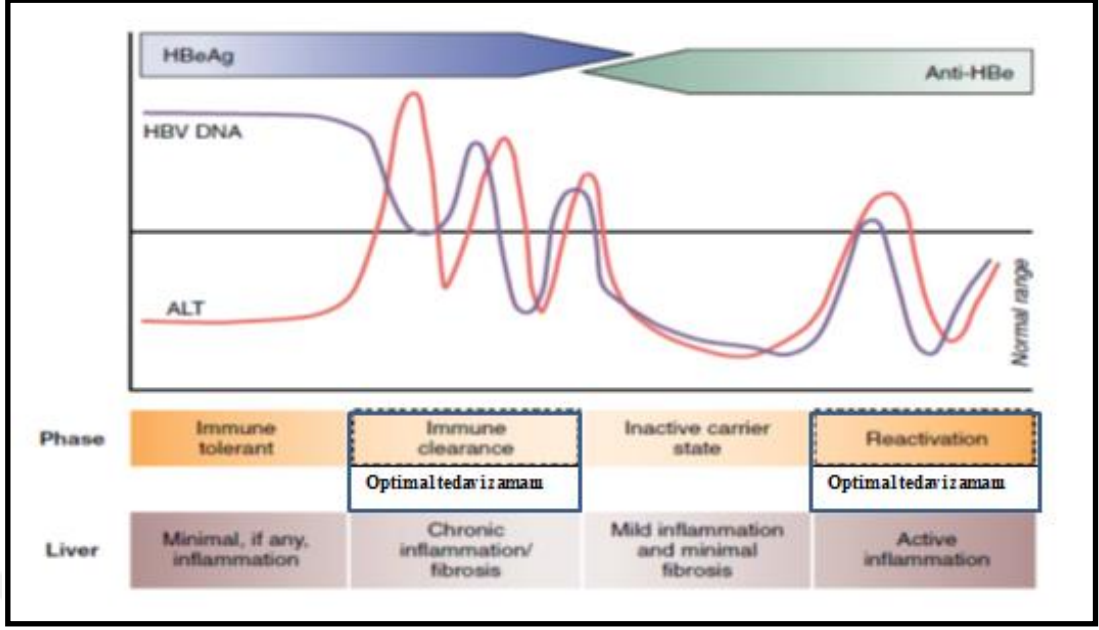
### 2.7.3.2 Kronik Hepatit B Virus İnfeksiyonu

HBV infeksiyonunun doğal seyri infeksiyonun alındığı yaşa göre değişmektedir. İnfeksiyonun kronikleşmesindeki en büyük etken virusa karşı zayıf antiviral immün yanıt oluşmasıdır. Akut infeksiyon sonrasında HBsAg pozitifliğinin altı aydan uzun sürmesi durumunda infeksiyonun kronikleştiğinden sözedilmektedir. <sup>67,72,73</sup>

KHB sessiz seyreden bir hastalıktır, teşhis genellikle rutin tetkik ya da donör muayenelerinde konulmaktadır. En önemli semptom yorgunluktur. Görülebilen diğer semptomlar bulantı, üst abdominal ağrı, kas ve eklem ağrıları şeklindedir. Ayrıca hastalarda anksiyete başta olmak üzere bir takım psikiyatrik semptomlar, endişe hali, düşüncelerini yoğunlaştıramama, uykusuzluk ve depresyon görülebilmektedir. Antijen-antikor komplekslerine bağlı olarak görülen ekstrahepatik belirtiler; poliarteritis nodosa, vaskülitik döküntü, membranoproliferatif glomerulonefrit, ateş, poliartraljidir. Aktif viral replikasyonu ve aminotransferaz yüksekliği olan olguların %15-20'sinde infeksiyon 5 yıl içerisinde siroza ilerlemekte, sirozlu hastaların %20'sinde ise HCC gelişmektedir. <sup>72,73</sup>

KHB infeksiyonunun klinik seyrinde konağın virusa karşı oluşturduğu immün cevaba göre birbirini izleyen dört farklı dönem görülmektedir (Şekil 8):

- **İmmün tolerans dönemi:** Özellikle perinatal bulaşa maruz kalan olgularda gözlenen bir evredir. Bu dönem yenidoğanda uzun yıllar sürerken çocukluk ve erişkin dönemde çok kısadır ya da hiç görülmeyebilir.<sup>41</sup> Bu dönemde virusa karşı gösterilen immün tolerans nedeni ile karaciğer hasarı yoktur ve bu hasarın göstergesi olan aminotransferazlar ve karaciğer histopatolojisi normalken; viral replikasyon çok yüksektir. HBeAg pozitif olarak saptanır ve serokonversiyon düşüktür.<sup>74,75</sup>
- **İmmün klirens-yanıt dönemi:** İnflamatuvar yanıt ile bu dönemde hücre harabiyeti olmakta, viral replikasyon hızı ve serumdaki viral yük immün tolerans evresine göre azalmaktadır. İmmün yanıtın aktivasyonu ile karaciğer hasarının başlamasıyla biyokimyasal bulgular ve karaciğer histopatolojisinde inflamasyon bulguları ortaya çıkmaktadır. Bu dönemin klinik yansıması tamamen sessiz olabileceği gibi, bazı hastalar fulminan hepatik yetmezliğe kadar giden ataklarla gelebilir. Bu ataklarda bazı olgularda HBeAg serokonversiyonu ile hepatik aktivitenin remisyona girdiği görülebilmektedir. Bu evrenin devamı durumunda karaciğer hasarı siroza kadar ilerleyebilmekte ve HCC gelişim riski artmaktadır.<sup>75,7</sup>
- **İnaktif dönem:** Bu dönemde viral replikasyonun baskılanması sonucu HBV DNA negatif ya da düşük düzeylerde seyretmektedir. HBeAg kaybolup, anti HBe ortaya oluşurken aminotransferazlar da normal düzeylere inmektedir. Bu dönemde aktivitenin şiddetli olduğu bazı vakalarda bir süre sonra siroz ya da HCC gelişebildiğinden hastaların 3-6 ayda bir ALT ve yılda bir HBV DNA ile periyodik takibi önerilmektedir.<sup>75</sup>
- **Reaktivasyon dönemi:** İnaktif dönemdeki olguların bir bölümünde viral replikasyon yeniden başlayabilmektedir. HBV DNA düzeyleri immün tolerans faz ve immün klirens faza göre düşük olsa da inaktif faza göre yüksektir. Bazen immün klirens evresindeki olgularda inaktif evreye geçmeden HBeAg (-) kronik hepatit gelişebilmektedir.<sup>75</sup>



**Şekil 8: Kronik hepatit B virus infeksiyonunun doğal seyri** ( <sup>28</sup> Numaralı kaynaktan uyarlanmıştır).

### 2.7.3.3 İnaktif HBsAg Taşıyıcılığı

Dünyada yaklaşık 400 milyon HBsAg taşıyıcısının yaklaşık 350 milyonu inaktif HBsAg taşıyıcısıdır.<sup>76</sup> İnaktif HBsAg tanı kriterleri; altı aydan uzun süren HBsAg pozitifliği, HBeAg negatif iken anti HBe'nin pozitif olması, serum HBV DNA'nın <2.000 IU/mL olması, sürekli olarak normal AST/ALT düzeyi ve karaciğer biyopsisinde belirgin hepatit bulgularının olmamasıdır (AASLD 2009).

KHB infeksiyonu dinamik süreç olup, hepatositlerdeki virüsü eradike etmek için konağın immün yanıtı periyodik olarak aktive olmaktadır.<sup>77</sup> Konağın immün yanıtı sonucu, yüksek HBV DNA ve ALT seviyelerinin düşmesiyle sonuçlanan immün klirens fazının sonunda HBeAg serokonversiyonu gelişir ve histolojik ve biyokimyasal olarak remisyon olur.<sup>78</sup> Bu hastaların çoğu inaktif HBsAg taşıyıcısı olurken %5 kadarı HBeAg negatif KHB hastası olur. İnaktif taşıyıcılarda da %20-30'nda spontan veya immünsupresyona bağlı olarak HBV reaktivasyonu gelişebilmektedir.<sup>79</sup>

#### 2.7.3.4 HBeAg Negatif Kronik Hepatit B Virus İnfeksiyonu

HBeAg serokonversiyonu olan bazı hastalarda mutant HBV'e bağılı olarak replikasyonun devam ettiği ancak HBeAg negatif KHB dönemi gelişir. HBeAg negatif varyantların, HBV genomunda core promotor ve /veya precore bölge mutasyonları mevcuttur. Bu mutasyonlar HBeAg üretimini durdurur ancak yüksek seviyede viral replikasyon devam eder. Bu evre HBeAg'nin yokluğu, anti HBe antikorunun varlığı, tespit edilebilir HBV DNA düzeyleri, yükselmiş ALT seviyeleri ve karaciğerin devam eden nekroinflamasyonunun histolojik bulguları ile karakterizedir. Kendiliğinden kalıcı remisyona girme olasılığı çok düşüktür. Hastalık ALT dalgalanmalarıyla seyrebildiği için ALT normal olan zamanlarda inaktif taşıyıcılıktan ayırmakta güçlük çekilebilir. Hastalarda en az bir yıl boyunca anti HBe pozitif olması, zaman zaman veya sürekli ALT yüksekliği ve viral yükün  $>10^{4-5}$  kopya/ml olması, HBeAg negatif kronik hepatit lehinedir. Uzun dönem prognozu HBeAg pozitif hastalardan kötüdür ve siroz gelişme riski HBeAg pozitif olanlara göre iki kat fazladır. HCC veya hepatik dekompanzasyon infeksiyonun seyrinde görülebilmektedir.<sup>80,81,82</sup>

#### 2.7.3.5 Okült Hepatit B Virus İnfeksiyonu

Okült hepatit B virus infeksiyonu, periferik kan ya da karaciğerde HBsAg saptanamazken, duyarlı nükleik asit saptama yöntemleri ile HBV DNA'nın tespit edildiği durumlar olarak tanımlanır. Okült HBV virus infeksiyonunun, HBsAg'yi kodlayan ya da transkripsiyonu kontrol eden bölgelerin mutasyonu sonucunda antijenite ya da ekspresyon düzeylerinin değişimine bağılı olarak gelişebileceği düşünölmektedir. HBeAg nadiren tespit edilebilir düzeydedir, anti HBs ve anti HBe ise değişen oranlarda pozitif saptanmaktadır. Vakaların yaklaşık beşte birinde ise geçirilmiş HBV infeksiyonuna ait tüm markerlar negatif bulunmaktadır.<sup>83,84</sup>

Okült hepatit B virus infeksiyonu; kan transfüzyonu, hemodiyaliz ve organ transplantasyonu yapılan hastalar için bir risk oluşturmaktadır. Ayrıca HCC gelişimiyle ilişkili bulunmuştur. Bir diğer noktada kronik hepatit C'de hastalık progresyonunu ve tedaviye yanıtı etkilemesidir.<sup>85</sup>

## 2.7.4 Hepatit B Virus İnfeksiyonlarının Tanısı

### 2.7.4.1 Serolojik Tanı Yöntemleri

Hepatit B virus infeksiyonunun spesifik tanısı virusa ait antijen ve antikorların serolojik yöntemlerle saptanmasına dayanmaktadır. Bu amaçla HBsAg, HBeAg, anti HBs, anti HBe, anti HBc IgM, anti HBc IgG serolojik olarak saptanabilirken, HBc Ag ise sadece hepatositlerde bulunduğundan saptanamamaktadır.<sup>86</sup> HBV göstergelerinin saptanmasında en yaygın olarak kullanılan serolojik test ELISA yöntemidir.<sup>87</sup> Bu testlerden; akut ve kronik infeksiyonun ayırımında, infektivitenin değerlendirilmesinde, bağışıklık durumunun tayininde, kan ve organ vericilerinin taranmasında yararlanılmaktadır.<sup>86</sup>

Akut HBV infeksiyonu sırasında saptanan ilk gösterge HBsAg'dir. Hastalık belirtileri başlamadan 3-5 hafta önce serumda saptanabilir düzeye ulaşmakta ve akut infeksiyon sırasında en yüksek düzeye çıkmaktadır. İyileşme ile sonuçlanan olgularda HBsAg, 2-6 ay içinde azalarak kaybolmakta ve kısa bir süre sonra HBsAg'ye karşı oluşan ve genellikle hayat boyu kalıcı olan anti HBs antikorları ortaya çıkmaktadır. Anti HBs antikorları nötralizan özelliğe sahip koruyucu antikorlardır. Aslında anti HBs, akut hastalık sırasında daha erken dönemde oluşmakta, ancak çok fazla miktarda HBsAg varlığı nedeniyle antijen tarafından bloke edilmekte ve bu şekilde oluşan immün komplekslerin anti HBs'nin saptanmasını maskeleydiği düşünülmektedir. HBsAg'nin kaybolduğu ve henüz anti HBs antikorlarının saptanamadığı bu döneme "pencere dönemi" adı verilmektedir. Bu dönemde hem HBsAg hem de anti HBs negatif olarak bulunduğundan, akut infeksiyonun tek göstergesi anti HBc IgM ve/veya total pozitifliği'dir. Akut infeksiyondan sonra anti HBs antikorlarının oluşması, iyileşmeyi ve kazanılan bağışıklığı ifade etmektedir. Anti HBs pozitifliği, geçirilmiş akut infeksiyon dışında hepatit B aşısı ile bağışıklama, hepatit B immüno globulin uygulaması, kan transfüzyonu ve anneden bebeğe pasif geçiş durumlarında da saptanabilmektedir. Serum anti HBs düzeyi >10 IU/ml olması, infeksiyona karşı koruyuculuğu sağladığını göstermektedir.<sup>88,89</sup>

Akut infeksiyon sırasında HBsAg'nin ortaya çıkmasından kısa bir süre sonra serumda HBeAg belirmente ve HBsAg negatifleşmeden önce kaybolmaktadır. Serumda HBeAg'nin varlığı, bulaştırıcılık, infektivite ve aktif viral replikasyon ile ilişkilidir. HBeAg kaybolmasından kısa bir süre sonra anti HBe antikorları ortaya çıkmakta; bu serokonversiyon ise viral replikasyonda azalmayı ve hastalık prognozunun iyiye gittiğini göstermektedir. Ancak prekor mutantlar, HBeAg ekspresyon etmeden aktif replikasyon göstererek, siroz ve HCC gelişimi için yüksek risk oluşturmaktadır. HBeAg'nin 10 haftada kaybolmaması kronikleşmeye işarettir.<sup>47,88</sup>

Kor proteinine karşı oluşan IgM tipi antikorlar, HBsAg'nin pozitifleşmesinden kısa bir süre sonra oluşan ilk HBV antikorlarıdır. Anti HBc IgM pozitifliği virusla yeni karşılaşmayı işaret ettiğinden, akut HBV infeksiyonu için tanısal değer taşımaktadır. Daha sonra anti HBc IgM, yerini anti HBc IgG/total antikorlarına bırakmakta ve bu antikorlar da genellikle serumda hayat boyu pozitif kalmaktadırlar. Bu nedenle anti HBc IgG/total pozitifliği anti HBs varlığı ile birlikte doğal olarak geçirilen infeksiyona karşı gelişen bağışık yanıtı göstermektedir.<sup>89,90</sup>

#### **Tek başına anti HBc IgG pozitifliği şu durumlarda saptanabilir.<sup>41,28,91</sup>**

- Anti HBs oluşmuş fakat saptanamayacak düzeye inmiş kişiler. Bu tip olgularda tek doz HBV aşısı sonrası iki hafta içinde anamnestic reaksiyon sonucu anti HBs yanıtı alınır ve ölçülebilir seviyelere gelir.
- HBsAg düzeyi ölçülemeyecek kadar düşük olan KHB infeksiyonlu olgular (immün baskılanma, immün kompleksler, ko infeksiyonlar ile HBsAg'nin baskılanması, mutasyonlar ya da düşük düzey HBsAg nedenleriyle).
- Pencere döneminin uzaması ile anti HBc IgM antikorları yerine anti HBc IgG antikorlarının gelmesi.
- Yalancı pozitiflik.
- Kan transfüzyonunu ya da intrauterin geçişle. Bunlar 3-6 ay içinde ortadan kaybolurlar.

Kronik HBV infeksiyonlarında ise, HBsAg genellikle ömür boyu kalıcı olmakta ve genellikle anti HBs antikorları saptanamamaktadır. Bu hastalarda HBeAg

pozitifliği değişkenlik göstermektedir. Anti HBc IgM, akut infeksiyondan sonra 6 ay içinde sıklıkla negatifleşmesine rağmen, bazen kronik infeksiyonun akut alevlenmeleri sırasında serumda saptanabilir düzeylere tekrar ulaşmaktadır.<sup>89</sup>

#### **2.7.4.2 Moleküler Tanı Yöntemleri**

Moleküler yöntemlerin kullanım alanları; serolojik yöntemlerin tanıda yetersiz kaldığı durumlar, HBsAg negatif HBV infeksiyonlarının tanısı, antiviral ilaç direncinin belirlenmesi, antiviral tedaviye karar verme ve tedavinin izlenmesi, genotip tayini, HCC oluşum mekanizmalarının aydınlatılması olarak sıralanabilmektedir.<sup>91</sup>

Kantitatif HBV DNA testlerinin, KHB'nin ilk değerlendirmesi sırasında ve prognozun takibinde olduğu kadar, tedavinin başlamasında ve antiviral ajanlara karşı yanıtın takibinde de büyük önemi vardır.<sup>92</sup>

Akut HBV infeksiyonu sırasında HBV DNA serum transaminaz düzeyleri ile paralel olarak 3-5 hafta önce saptanabilmektedir. Viral replikasyonun en iyi göstergesi HBV DNA'dır. HBV DNA'nın saptanması ve kantitasyonu amacıyla farklı yöntemler geliştirilmiştir. Bunlar, hibridizasyon temelli (sinyal amplifikasyonu) ve nükleik asit amplifikasyonu (PCR vb) temelli tekniklerdir.<sup>93</sup>

HBV genotipleri ile kronik infeksiyon gelişim riski ve tedaviye yanıt arasında yakın ilişki olduğu bilinmektedir. Bu nedenlerden dolayı moleküler yöntemler ile HBV genotiplendirmesinin yapılması önerilmektedir. Genotiplendirme için DNA dizi analizi ve Line Prob Assay gibi yöntemler kullanılmaktadır.<sup>94,95</sup>

Tedavi alan KHB'li hastalarda, antiviral ilaçlara karşı direnç gelişiminin izlenmesinde viral yük takibinin yapılması ve tedaviye yanıtızlığın olduğu durumlarda dirence neden olan mutasyonların saptanması için de yine moleküler yöntemlerden yararlanılmaktadır.<sup>10</sup>



Moleküler tanı konusundaki en önemli gelişme HBV DNA testlerinin sensitivitesini artıran real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) tekniğinin ortaya çıkması ve gelişmesidir. Bu yöntem ile sonuçlar kantitatif olarak daha kısa zamanda verilmekte ve farklı HBV genotiplerini saptamak mümkün olmaktadır.<sup>91,96</sup>

**Real-Time PCR:** Işıma özelliğine sahip moleküller kullanılarak, PCR'ı oluşturken izleme ve miktar belirleme (kantitasyon) yöntemidir.<sup>97,98</sup> PCR sırasında DNA amplifikasyonu eksponansiyel bir gidiş göstererek sonunda linear plato evresine ulaşır. Real-time PCR, eksponansiyel amplifikasyon dönemini izleyebilme ve başlangıçtaki nükleik asid miktarını bu aşamada hesaplayabilme olanağı sağlamaktadır. Bu dönemde, çoğalmakta olan nükleik asidden elde edilen sinyalin, eşik değeri aşarak saptanabilir hale geldiği döngü sayısı ("threshold cycle", CT) belirlenir. Örnekteki hedef nükleik asid sayısı ne kadar çoksa, sinyal o kadar erken bir döngüde saptanır. Sinyalin saptanabilir aşamaya geldiği döngü sayısı, standart eğri yardımıyla nükleik asid miktarının hesaplanmasında kullanılır.<sup>98</sup>

Real-time PCR'ın, klasik PCR yöntemine üstünlükleri şunlardır: <sup>98</sup>

- İyi tasarlanmış bir real-time PCR ile geniş bir dinamik aralıkta (en az 6 log) kantitasyon yapılabilir.
- Hesaplanan viral yük, gerçeğe daha yakındır ve tekrarlanabilirliği yüksektir.
- PCR sonrası ürünün saptanması için ek işlem gerekmez, daha hızlıdır.
- Amplikonlara bağlı kontaminasyon riski düşüktür.

#### 2.7.4.3 Karaciğer Biyopsisi

HBV enfeksiyonu olan hastaların tedavi kararında önemli bir rol alan karaciğer biyopsisi hepatik patolojinin değerlendirilmesinde altın standarttır. KHB'nin karaciğer histopatolojik incelemesinde en karakteristik bulgusu hematoksilen-eozin boyası ile saptanan buzlu cam tarzında sitoplazma ve kumsu nükleus görülmesidir. Sitoplazmanın tümünde ya da bir kısmında izlenen buzlu cam görünümü, HBsAg içeren endoplazmik retikulum varlığı nedeniyle meydana gelmektedir. Buzlu cam tarzında sitoplazma KHB enfeksiyonu için patognomonik değildir. Diğer bazı patolojilerde de izlenebilir. Ancak bu görüntüdeki sitoplazmada, immünohistokimyasal

olarak HBsAg'nin saptanması kronik B hepatiti için patognomoniktir. Bir diğer özgün bulgu nükleusta masif HBcAg toplanmasına bağlı olan kumsu nükleus görünümüdür.<sup>99,100</sup>

KHB'nin morfolojisi hastalığın gidiş sürecinde farklı histopatolojik görüntülere yol açabilmektedir. Aslında, bağ dokusu artışı dışındaki değişiklikler hem akut hem de kronik hepatitlerde görülebilen özelliklerdir.<sup>99,101</sup>

### **Kronik hepatitlerde görülen doku değişiklikleri :<sup>101</sup>**

- **Hepatosit zararları;**
  - Şişme, balonlaşma
  - Apoptotik/asidofilik cisimcikler
  - Odaksal (fokal) nekrozlar; Küçük bir grup hepatositin nekrozu ve yerini iltihap hücrelerinin görüldüğü lezyonlardır.
  - Birleşik/geniş (konfluent) nekrozlar; Daha fazla sayıda hepatositin zarara uğradığı lezyonlardır.
  - Köprüleşme (bridging) nekrozları; Bir terminal venül ile portal alan arasında köprüleşmeye yol açacak kadar genişleyen birleşik nekrozlar.
  - Panasiner/multiasiner (lobüler) nekrozlar; Daha çok fulminan seyirli akut hepatitlerde ve toksik hepatitlerde görülen bir veya birkaç lobülün parankim hücrelerinin çoğunu ortadan kaldıran çok geniş nekrozların görülmesidir.
  - Periportal hepatosit ölümü/periportal hepatit (Interface hepatit); önceleri güve yeniği nekrozu olarak tanımlanan bu lezyon, portal alandaki infiltrasyonu oluşturan lenfositlerin, portal alanı çevreleyen hepatositleri kuşatarak ve apoptoza uğratarak lobül içine doğru girmeleri ile tanımlanır.
  - Hepatosit dejenerasyonu
- **Portal iltihap;** viral hepatitlerde portal ve lobüler infiltrasyonun baskın hücresi lenfositlerdir. Portal iltihabın yoğunluğu ile sınır hepatitinin şiddeti her zaman orantılı olmayabilir.
- **Bağ dokusu artışı (fibroz);** tüm onarım olaylarında olduğu gibi hepatitlerde de ortada kalkan ve yenilenmesi artık mümkün olmayan hücrelerin yerini alarak artar.

Hepatit B tanısında, patolojik olarak aktivite ve fibroz derecesini gösteren çeşitli skorlama sistemleri mevcuttur. Bunlar; Knodell, Scheuer, Metavir ve Modifiye Knodell (Ishak) skorlama sistemleridir. Günümüzde bu amaçla yaygın olarak kullanılan sistem Ishak'ın modifiye histolojik aktivite indeksi derecelendirme ve evrelendirme sistemidir.<sup>101</sup>

#### **2.7.4.4 HBsAg Kantitasyonu**

Akut ve kronik hepatit ayrımında, antiviral tedavi yanıtının değerlendirilmesinde qHbsAg, yapılan çalışmalarda anlamlı bulunmuştur. HbsAg kantitasyonunun viral genomu serum HBV DNA'dan daha iyi monitorize edebileceği düşünülmektedir. Antiviral tedavi sırasında serum HBV DNA düzeyleri ile serum HbsAg titrelerinin korelasyon gösterdiği bazı çalışmalarda gösterilmiş olsada bu konuda daha fazla çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. qHBsAg testinin en önemli dezavantajı ise geniş bir dinamik aralığa gereksinim duyulmasıdır (1000-1.000.000 ng/ml). Mevcut sistemler ise bu kadar geniş bir aralığa yanıt verememektedir (Architect HBsAg 0.05-250 IU/ml; Elecsys II assay 0.05- 52000 IU/ml).<sup>102</sup>

#### **2.7.5 Kronik Hepatit B Virus İnfeksiyonunda Tedavi**

HBV replikasyonunu idame ettiren cccDNA formunun konvansiyonel tedavilere dirençli olması sonucunda güncel antiviral tedaviler ile HBV eradikasyonu pek mümkün değildir. Bu tedaviler ile HBV DNA düzeylerini karaciğer hastalığı yapabilecek düzeyin altına indirebilmek, dolayısıyla klinik remisyon sağlamak, progresyonu yavaşlatmak ve durdurmak amaçlanmaktadır. HBV'e bağlı kronik hepatit tedavisinde kullanılan güncel antiviraller viral polimerazı hedeflemektedir.<sup>103</sup> KHB'de tedavi yanıtı için kullanılan çeşitli göstergeler; biyokimyasal yanıt, serolojik yanıt, virolojik yanıt, histolojik yanıt ve tam yanıt (Tablo 1).<sup>104,9</sup>

**Tablo 1:** Tedavi yanıtı tanımlamaları <sup>105</sup>

<b>Primer Yanıtsızlık</b>	Tedavinin 12. haftasında, HBV DNA düzeyinde <1 log IU/ML azalma olmasıdır.
<b>Kısmi Virolojik Yanıt</b>	NA verilen olgularda ise tedavinin 24. haftasında da HBV DNA düzeyinde > 1 log IU/ML azalma olması fakat Real-Time PCR ile saptanabilir düzeyde olmasıdır.
<b>Virolojik Yanıt</b>	IFN tedavisi alan olgularda tedavinin 24. haftasında HBV DNA düzeyinin < 2.000 IU/ML olması, NA verilenlerde ise tedavinin 48. haftasında HBV DNA'nın Real-Time PCR ile saptanmayacak düzeye inmesidir.
<b>Serolojik Yanıt</b>	HBeAg pozitif olgularda HBeAg serokonversiyonunun olmasıdır.
<b>Biyokimyasal Yanıt</b>	Serum ALT seviyesinin normal aralığa gerilemesidir.
<b>Histolojik Yanıt</b>	Fibroz skorunda kötüleşme olmaksızın nekroinflamatuvar aktivite skorunda en az 2 puan düzelme olmasıdır.
<b>Tam Yanıt</b>	Biyokimyasal ve virolojik yanıtla birlikte HBsAg'nin kaybolmasıdır.
<b>Tedavi Sonu Yanıt</b>	Tedavi bitiminde elde edilen yanıttır.
<b>Kalıcı Yanıt</b>	Tedavi kesildikten 6-12 ay sonra elde edilen yanıttır.

KHB enfeksiyonu olan hastalarda HBV replikasyonunu baskılamak ve karaciğer hastalığının siroza, karaciğer yetmezliğine veya HCC'ye ilerlemesini durdurmak, organ nakli ihtiyacı oluşmasını engellemek amacıyla antiviral tedavi uygulanmaktadır.<sup>92-9</sup> Bu amaçla günümüzde iki grup ilaç kullanılmaktadır:

- İmmün modulatorler (İnterferon alfa ve pegillenmiş formları)
- Viral polimeraz inhibitörleri (Nükleozid ve nükleotid analogları)

Antiviral tedaviye başlama kararı verilirken serum ALT düzeyi, HBV DNA düzeyi ile karaciğerin histopatolojik incelemesi değerlendirilmektedir.<sup>92</sup> Tedavi adayları kılavuzlara göre değişiklik gösterebilir HBeAg-pozitif ve HBeAg-negatif hastalar için optimal tedaviler belirlenmiştir.<sup>106</sup>

- AASLD kılavuzu, ALT seviyeleri normalin en az iki katı ve serum HBV DNA >20.000 IU/mL olan HBeAg-negatif ve HBeAg-pozitif hastalara tedavi önermektedir.
- HBeAg-negatif hastalar için ALT normalin 1-2 katı kadar yüksekse ve HBV DNA virus yükü 2.000-20.000 IU/mL arasında ise karaciğer biyopsisi önerilir.

### 2.7.5.1 Tedavide kullanılan ilaçlar

#### 2.7.5.1.1 İnterferon alfa:

Antiviral, antiproliferatif ve immünomodülatör etkili doğal sitokinlerdir. Tedavi öncesinde ALT'nin yüksek olması ve HBV DNA düzeyinin düşük olması en önemli yanıt belirteçleri olarak görülmektedir. Ayrıca HBV genotipi ve HBeAg pozitifliği de IFN tedavisine yanıtta önemli görülmektedir. Günümüzde standart IFN alfanın yerini polietilen glikol molekülü ile pegilasyonu ile elde edilen pegile IFN alfa (peg-IFN) almıştır. Yarı ömrünün daha uzun olması, daha yüksek sistemik kalıcılık ve daha iyi biyolojik etki oluşturması nedeniyle tedavide peg-IFN tercih edilen bir moleküldür. Tedavi sürelerinin belirli olması ve antiviral dirence neden olmaları IFN'nun en önemli avantajları iken, gribe benzer semptomlar, halsizlik, nötropeni, trombositopeni, psikiyatrik bozukluklar ve otoimmün hastalıkların alevlenme riski gibi ciddi yan etkilerinin olması dezavantajlarıdır. Özellikle sirotik zeminde hepatik alevlenmelere ve dekompanzasyona neden olabilmektedirler.<sup>107,108</sup>

#### 2.7.5.1.2 Nükleoz(t)id Analogları:

NA, polimeraz inhibitörü olarak etki gösterebilmeleri için fosforile edilerek aktive olmaları gerektiğinden ön ilaç (pro-drug) olarak kabul edilmektedirler. Bu ilaçlar önce hücrel kinazlarla nükleozid monofosfatlara, daha sonra da yine hücrel enzimlerle difosfat ve trifosfat formlarına dönüşmektedir. Günümüzde; L-nükleozidler (LAM, LdT, emtrisitabin, klevudin), asiklik fosfonat nükleotidler (ADV, TDF) ve siklopentan deoksiguanozin analogları (ETV, abakavir/karbovirin) olmak üzere üç grup ajan mevcuttur.<sup>109</sup>

**Lamivudin:** 1998 yılında KHB tedavisinde ruhsat alarak kullanıma girmiş olan ilk L-nükleozit analogudur. 2'-3' dideoksi-3'-tiasitidin enantiomeri olan bir sitozin analogudur. İntraselüler hepatosit kinazlar tarafından fosforile edilerek aktive metaboliti trifosfata dönüşür. Aktif trifosfat çoğalmakta olan DNA zinciri ile birleşerek zincirde erken sonlanma sonucu DNA sentezini inhibe eder. LAM kullanan hastalarda zaman içinde bu ilaca karşı gelişen direnç önemli bir sorundur. Polimeraz geninin reverz transkriptaz proteini üzerindeki C ve B bölgelerindeki mutasyonlar

LAM direncinden sorumlu temel mutasyonlardır. Genotipik direnç, bir yıldır LAM alan hastalarda % 14-32 arasında görülmekte ve tedavinin 5. yılında bu oran % 50-60'lara yükselmektedir.<sup>110,111,112</sup>

**Adefovir:** 2002 yılında kullanıma giren Adefovir dipivoxilin (ADV) aktif formu, hem reverz transkriptazı hem de DNA polimerazı inhibe ederek HBV DNA zincirinin sonlanmasına neden olur. İn-vitro ve klinik çalışmalarda hem vahşi tip virüsü hem de LAM dirençli kökenleri inhibe ettiği gösterilmiştir.<sup>113</sup> Nefrotoksisite önemli yan etkilerindedir. Son yıllarda onay alarak kullanımda olan bir diğer nükleotit analogu olan TDF ile ilgili çalışmalarda, HBeAg negatif ve pozitif hastalarda, etkinlik açısından ADV'den üstün olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle güncel tedavi rehberlerinde ADV'in, yerini TDF'e bıraktığı gözlenmiştir.<sup>112</sup>

**Entekavir:** ABD'de 2005, Türkiye'de ise 2007 yılında ruhsat alan ETV, 2-deoksiguanozinin bir karbosiklik analogudur ve konak hücre selüler kinazları tarafından 3 kez fosforillenecek şekilde aktif formu olan entekavir trifosfat formuna dönüşür. HBV replikasyonunu, diğer nükleozid ya da nükleotit analoglarından farklı olarak, 3 ayrı basamakta inhibe etmesi nedeniyle, HBV DNA'nın yüksek baskılanma oranlarını sağlamış, in-vitro çalışmalarda LAM ve ADV'e oranla daha güçlü bir antiviral olduğunu göstermiştir. ETV direncinin gelişmesi için LAM direnç mutasyonlarının yanında (rt M204V ve rt L180M) HBV polimerazda ek mutasyonların (rt I169T, rtT84S/A/I/LG/C/M, rt S202G/C/I, rt M205I/V) da olması gerektiği bildirilmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda 5 yıldan uzun süredir ETV kullanan hastalarda düşük direnç oranlarının (<% 1), ETV'in daha potent bir antiviral olmasının yanında birkaç basamaklı mutasyon gerektiren güçlü genetik bariyer yapısına da bağlı olduğu bildirilmektedir.<sup>114,115,112.</sup>

**Tenofovir:** İlk olarak HIV/AIDS ve HIV/HBV koinfekte hastalarda kullanılan TDF, yapılan çalışmalarda hem vahşi hem de LAM dirençli kökenlere karşı etkili olduğunun saptanması üzerine, 2008 yılında KHB'nin tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. TDF, ADV gibi bir asiklik nükleotit analogudur. Ancak daha az nefrotoksik olması sayesinde günde 300 mg kullanılabilmesi, daha güçlü bir antiviral etki sağlamıştır. Kırk sekiz haftalık TDF veya ADV tedavisi sonunda HBV DNA

düzeyinin  $<10^5$  kopya/ml olması yönünden iki ilaç karşılaştırıldığında, TDF'in ADV'den daha üstün olduğu saptanmıştır (% 100'e karşı % 44). Nükleozit analoglarına karşı çapraz direnç göstermemesi avantajının yanında DNA polimerazdaki mutasyonlara karşı yüksek genetik bariyere sahip olması, direnç açısından daha az sorun yaşanacağını düşündürmektedir.<sup>116,112</sup>

**Telbivudin (L-deoksitimidin-LdT):** 2006 yılında kullanıma giren LdT, timidinin L deoksi modifikasyonu olan nükleozid analogu bir antiviraldir. Fosforilasyon sonrası, aktif formu HBV DNA polimeraz tarafından sentezlenen DNA zincirine katılabilmek için timidin ile yarışmaktadır. Yapılan çalışmalarda, LdT'in LAM'e oranla hepatit B replikasyonunu baskılamada daha potent bir antiviral olduğu gösterilmiştir. Ancak antiviral direnç LdT için de bir sorun olmakla birlikte, LAM'e göre daha düşük oranlarda direnç geliştiği bildirilmektedir. LAM dirençli kökenlerin, LdT'e de çapraz direnç gösterdikleri bilinmektedir. LdT için önemli bir özellik prelinik toksikolojik testlerde embriyo üzerine mutajenik ya da karsinojenik etkinliği olduğu saptanmamıştır. Bu nedenle gebelikte kullanımı açısından B grubunda yer alan ilaçlar içindedir.<sup>117,112</sup>

## 2.8 Antiviral Direnç

Antiviral direncin ilk ortaya çıkma şekli sekonder yanıtızlık (virolojik kırılma-breakthrough) gelişmesidir. Antiviral direnci ve tedaviye uyumsuzluk, sekonder yanıtızlıktan sorunlu olan en önemli iki faktördür.<sup>104</sup> Bu nedenle genetik direnç araştırmadan evvel hastanın tedaviye uyumu mutlaka sorgulanmalıdır. Antiviral direnç mutasyonlarının bir diğer potansiyel sonucu, diğer NA ile çapraz direnç olup, gelecek tedavi seçeneklerini sınırlandırmasıdır. Ardışık NA monoterapisi alan hastalarda çoklu ilaç direnç mutasyonları gösterilmiştir. Ayrıca bir kez antiviral dirençli HBV mutantları oluştuktan sonra, bunlar hepatosit içerisinde cccDNA kütüphanesinde birikirler. LAM kesildikten dört yıl sonra bile LAM direnci olan HBV mutantları saptanmıştır.<sup>118</sup>

NA karşı direnç gelişimi sıklıkla HBV DNA *pol* gen bölgesi mutasyonları sonucu olmaktadır. Direnç araştırmasında kullanılan yöntemler indirekt, fenotipik ve

genotipik yöntemler olarak üçe ayrılmaktadır. Genotipik yöntemler viral genom üzerinde dirençle ilişkili mutasyonlar hakkında bilgi verirken, fenotipik yöntemler hücre kültüründe hastadan izole edilmiş virusların, ilaca karşı olan duyarlılığını ölçmemizi sağlamaktadır.<sup>119</sup>

### **2.8.1 İndirekt yöntemler:<sup>120</sup>**

HBV DNA viral yük tayini  
İlaç düzeyi analizi

### **2.8.2 Fenotipik yöntemler:<sup>119</sup>**

Hücre kültürü veya deney hayvanlarında, HBV DNA replikasyonu ve ilaca duyarlılık değerlendirilir. Replikasyon bazlı yöntemler ikiye ayrılmaktadır:

- Vektörsüz fenotipik testler
- Vektörlü fenotipik testler

### **2.8.3 Genotipik Yöntemler:<sup>121,119</sup>**

Tüm genotipik yöntemler hasta serumundan izole edilen HBV DNA'nın bir bölümünün veya tamamının PCR ile amplifikasyonunu baz almaktadır.

- Dizi analizi
- Restriksiyon enzim analizi (RFLP; Restriction fragment length polymorphism)
- Strip hibridizasyon (LiPA; Line Probe Assay)
- Gerçek zamanlı PCR

Diğer yeni geliştirilen genotiplendirme yöntemleri arasında DNA çip, “minisequencing” karışık hibridizasyon-dizi analizi- PCR, “mass spectrometry”, lusiferaz testleri, guanin oksidasyon sinyalini ölçen elektrokimyasal biyosensörler, “revers dot blotting” bulunmaktadır.



Dizi analizi için seçilmiş gen bölgesi (direkt veya klonlanarak) PCR ile çoğaltılır. PCR ürünü saflaştırılarak nükleotid dizisi otomatize cihazlarda tek veya çift yönlü olarak belirlenir. Araştırılan gen bölgesine ait dizi, referans dizi ile eşleştirilerek nükleotid ve aminoasid değişimleri araştırılır. Direkt uygulanan dizi analizinde mutasyonun saptanabilmesi için mutant nükleotidin, incelenen virus popülasyonunda baskın olması gereklidir. Virus popülasyonu içerisinde % 20'den az oranda bulunan mutant suşlar bu yöntemle saptanamazlar. En önemli avantajı yeni mutasyonları saptamaya açık olmasıdır. Dizi analizinin iş yükü fazladır ve özel ekipman gerektirir.<sup>119,121,122</sup>

REA, yöntem olarak PCR sonrası elde edilen ürünün araştırılan bölgesinin restriksiyon endonükleazlar aracılığıyla tanınması ve kesilmesi esasına dayanır. Bir veya daha fazla endonükleaz tarafından kesilerek elde edilen DNA fragmanlarının jel elektroforezinde incelenmesiyle mutasyon varlığı araştırılır. Dizi analizi gibi iş yükü fazla olan bu yöntem, optimize edildiğinde baskın olmayan viral popülasyonu da saptayabilmesi açısından dizi analizine üstündür.<sup>121</sup>

LiPA ise mutasyon araştırılan gen bölgesinin öncelikle PCR ile çoğaltıldığı, daha sonra araştırılan mutasyonların problar aracılığıyla tespitine dayanan bir yöntemdir. PCR ürünü, şeritler üzerine yerleştirilmiş oligonükleotid problara komplementer ise hibridizasyon gerçekleşmekte ve şerit üzerinde enzim-substrat kullanılarak gerçekleştirilen kimyasal reaksiyon neticesinde hibridler bantlar şeklinde görüntülenmektedir. Oluşan bu bantlar referans şerit ile karşılaştırılarak mutasyon varlığı araştırılır. Sadece bilinen mutasyonları saptayabilen, minor popülasyonları da yakalayabilen ancak pahalı bir yöntemdir.<sup>123,124</sup>

Gerçek zamanlı PCR ise araştırılan mutasyona uygun olarak hazırlanmış prob/problar kullanılarak amplifikasyonla eş zamanlı saptama yapabilen bir yöntemdir. Problar farklı boyalarda işaretlenerek saptama yapılabileceği gibi, erime ısısı analizine dayalı olarak da mutasyon belirlenebilir. Erime ısısı analizi, prob / amplikon hibridinin erime ısısının, probdan elde edilen sinyalin, ortam ısısının giderek arttırılması sırasında incelenmesi ile belirlenir. Mutasyona özgü erime ısısının

belirlenmesi ile tanı konur. Sadece bilinen mutasyonları saptayabilen bir yöntemdir. Bu yöntemin en önemli avantajları, hızlı sonuç vermesi, nispeten ucuz olması ve otomatize sistemle çalışıldığı için daha az iş gücü gerektirmesidir. <sup>125,126</sup>



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma Kocaeli Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi'nde 2009 ile 2014 yılları arasında yapıldı. Hastalar İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji polikliniğine başvuran, daha önce hiç tedavi almamış HBV enfeksiyonu olan gönüllüler arasından seçildi. Çalışmada KHB tedavisinde kullanılan peg-IFN ve oral antivirallerin HBsAg ve polimeraz geni üzerinde yaptığı mutasyonların araştırılması, bu mutasyonların hasta bazında yapacağı etkilerin saptanması ve ayrıca uzun dönemde ilaç direnci gelişiminin ve bunun yol açacağı sonuçların belirlenmesi amaçlandı. İkincil olarak da qHBsAg titrelerinin ilaç direncini belirlemede erken bir marker olup olmadığının saptanması amaçlandı. Çalışma, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 26.06.2009 tarih ve 2009/97 sayılı kararı ile onay alınarak yapıldı.

#### 3.1 Çalışma Grubu

##### 3.1.1 Hasta Grubu

- HBsAg en az 6 aydan beri pozitif olan,
- Biyopsi ile kanıtlanan kronik karaciğer hastalığı olan,
- Anti HBe (-), HBV DNA 20.000 IU/mL üzerinde, ALT'si normal veya yüksek olan,
- Anti HBe (+), HBV DNA 2000 IU/mL üzerinde, ALT'si normal veya yüksek olan,
- KHB enfeksiyonuna bağlı kompanse karaciğer sirozu olan hastalar(bu hastalarda karaciğer biyopsi şartı ve HBV DNA'nın >2000 IU/mL olması şartı aranmadı),
- Daha önce antiviral tedavi almamış KHB enfeksiyonu olan hastalar.

### 3.1.2 Kontrol Grubu

- En az altı aydır HBsAg pozitifliği bilinen,
- HBeAg(-), Anti HBe(+),
- 6 ay ara ile 2 kez bakılan ALT değeri normal olan
- 6 ay ara ile 2 kez bakılan HBV DNA virus yükü < 2000 IU/ml olan gönüllü inaktif HBsAg taşıyıcıları.

Hasta gruplarından birincisine peg-IFN, ikincisine TDF 245 mg/gün tablet, üçüncüsüne ETV 0,5-1 mg/gün, dördüncüsüne LdT 600 mg/gün tedavisi verildi, beşinci gruba ise tedavisiz izlemi yapılan inaktif HBsAg taşıyıcıları alındı. Peg-IFN tedavisi alan hastalarda tedavi yanıt kriteri olarak tedavinin altıncı ayında HBV DNA virus yükünün <2000 IU/mL olması, NA alan hastalarda ise 12.ayındaki HBV DNA virus yükleri kullanılmıştır.

Tüm hastalar çalışma ile ilgili bilgilendirildi ve yazılı onamları alınarak çalışmaya dahil edildi.

### 3.1.3 Çalışmaya Dahil Edilmeme Kriterleri

- 18 yaşından küçük olan,
- Gebe ya da emziren kadınlar,
- Dekompanse siroz,
- Hepatosellüler kanser,
- Ko-infeksiyon,
- Alkolik hepatit,
- Otoimmün hepatit tanıları olan hastalar çalışmaya alınmadı.

## 3.2 Yöntem

### 3.2.1 Biyokimyasal İncelemeler

Karaciğer fonksiyon testleri [AST, ALT, ALP, GGT, LDH, total bilirubin, direkt bilirubin, albumin, globulin, INR (international normalized ratio)], açlık kan şekeri,

total kolesterol, trigliserit, HDL, LDL, üre, BUN, kreatinin ve AFP Kocaeli Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Merkez Laboratuvarı Biyokimya bölümünde ARCIHTECT C16000 – ABBOTT® cihazıyla yapıldı.

Çalışmaya alınan tüm hastaların karaciğer fonksiyon testleri, AKŞ, lipit profili, böbrek fonksiyon testlerine (üre, BUN, kreatinin ) tedavinin başlangıcında bakıldı. Takiplerinde tedavi grubundaki hastaların tedavinin üçüncü ayında ve birinci yılında, inaktif HBsAg taşıyıcılarında ise bir yıl sonra olmak üzere AST, ALT, albümin, globülin değerlerine bakıldı. AFP'e ise tedavi başlangıcında ve birinci yılda bakıldı.

### **3.2.2 Hematolojik İncelemeler**

Tam kan sayımı Kocaeli Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Merkez Laboratuvarı Hematoloji bölümünde CELL-DYN 3700 - Abbott® cihazıyla yapıldı.

Çalışmaya alınan tüm hastaların kandaki hemoglobin, lökosit, nötrofil, trombosit değerlerine tedavinin başlangıcında bakıldı. Tedavi grubundaki hastaların tedavinin üçüncü ayında ve birinci yılında, inaktif HBsAg taşıyıcılarında ise birinci yılın sonunda olmak üzere trombosit değerine bakıldı.

### **3.2.3 Serolojik İncelemeler**

HBsAg, Anti HBs, HBeAg, Anti HBe, Anti HBc IgM ve IgG, Anti HCV, Anti HIV, Anti HDV IgM ve total testleri Kocaeli Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Merkez Laboratuvarı Seroloji Ünitesinde ELISA tekniği ile ARCIHTECT İ2000 – ABBOTT® cihazıyla yapıldı.

Çalışmaya alınan hastaların HBsAg, Anti HBs, HBeAg, Anti HBe, Anti HBc IgM ve IgG, Anti HCV, Anti HIV, Anti HDV IgM ve total testleri tedavi başlangıcında yapıldı. Takiplerinde tedavi grubundakilere tedavinin üçüncü ayında ve birinci yılında, inaktif HBsAg taşıyıcılarında ise birinci yılı sonunda olmak üzere HBsAg, anti HBs, HBeAg, anti HBe bakıldı.

### **3.2.4 Serum HBsAg Kantitasyonu**

Tedavi grubundaki hastalarda tedavi öncesi, tedavinin üçüncü ayı ve birinci yılında, inaktif HBsAg taşıyıcılarında ise bir yıl ara ile iki kez olmak üzere qHBsAg titresine bakıldı. Hastalardan alınan kan örnekleri 30-60 dakika süreyle oda ısısında bekletildikten sonra 3000-5000 devirde 10-15 dakika santrifüj edildi. Elde edilen serum örnekleri daha sonra qHBsAg ve gerektiğinde DNA sekans analizi çalışılmak üzere  $-80^{\circ}\text{C}$ 'da derin dondurucuda saklandı. Çalışmaya alınan hasta serumları çalışılacağı gün;  $+4^{\circ}\text{C}$ 'lik ortamda bekletilerek çözümleri sağlandıktan sonra oda ısısına bırakıldı. Serumda qHBsAg, HBsAg II Quant kiti (Roche Diagnostics, Indianapolis, USA) kullanılarak Cobas e601 sisteminde Electrochemiluminescence Immunoassay ("ECLIA", elektrokemilüminesans) yöntemiyle çalışıldı. Testin ölçüm aralığı seyreltilmemiş numuneler için 0,05-130 IU/mL, 400 kat seyreltilmiş numuneler için ise 20-52000 IU/mL olarak Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) EP17-A gereklerine göre tayin edilmiştir.

### **3.2.5 Moleküler Testler**

#### **3.2.5.1 HBV DNA izolasyonu**

HBV DNA, QIASymphony SP manyetik partikül izolasyon platformunda (QIAGEN GmbH, Hilden, Almanya) izole edildi.

#### **3.2.5.2 Real-time PCR**

HBV DNA, real-time PCR tekniğine göre Artus HBV DNA RGQ kiti ile Rotor-GENE platformunda çalışıldı (QIAGEN GmbH, Hilden, Almanya).

### 3.2.5.3 HBV DNA sekanslama

HBV genotip/altgenotip tespiti, bilinen tüm primer/kompansatuvar NA direnci mutasyonları ve *pol* geni ile çakışan *S* geni (HBsAg proteini; 111.-227. aminoasitler arası) mutasyonları HBV *pol* geni (ters transkriptaz; RT bölgesi, 80.-250. aminoasitler arası) dizilenecek analiz edildi.<sup>127</sup> Bu amaçla serum örneğinden HBV DNA izole edildi (Anatolia Geneworks, Bosphore® Viral DNA Extraction Spin Kit ve Magnesia® 16 Magnetic Bead Extraction System, İstanbul, Türkiye). HBV *pol* geni amplifikasyonu (742 bp) için ileri (F:5'- tcgtggtggacttctctcaatt-3') ve geri (R:5'- cgttgacagactttccaatcaat-3') primerler kullanıldı. PCR koşulları için 95°C'de 10 dakika ön denatürasyon, ardından 35 döngü 95°C'de 45 saniye, 60°C'de 45 saniye ve 72°C'de 45 saniye ısı/zaman döngüsü uygulandı.<sup>127</sup> Tüm PCR ürünleri High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics, Almanya) ile saflaştırıldı. Dizileme protokolünde Phire Hot Start DNA polimeraz (Finnzymes Oy, Finlandiya) enzimi kullanıldı. Dizileme, BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech Inc., ABD), 36 cm kapiller ve POP-7 TM polimer (Applied Biosystems Inc., ABD) kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems Inc., ABD) platformunda gerçekleştirildi. Direkt dizileme için kullanılan PCR protokolü; 35 döngü 95°C'de 20 saniye, 50°C'de 25 saniye ve finalde 60°C'de 2 dakika olarak gerçekleşti. Elektroferogramlar Vector NTI v5.1 (InforMax, Invitrogen, Life Science Software, ABD) programı aracılığıyla elde edildi. Elde edilen diziler Geno2pheno Drug Resistance programında (Center of Advanced European Studies and Research, Almanya) analiz edildi. Geno2pheno programı, fasta formatındaki bilinmeyen nükleik asit dizilerini databazında bulunan referans dizilerle karşılaştırmaktadır. Karşılaştırma sonrasında HBV *pol* geni RT kangalında; 80., 84., 85., 91., 169., 173., 180., 181., 184., 191., 194., 202., 204., 214., 215., 233., 236-238. ve 250. aminoasit pozisyonları primer ilaç direnci ve kompansatuvar mutasyonlar yönünden analiz edildi.<sup>10</sup> Ayrıca HBV RT kangalı ile çakışan *S* gen bölgesinde; 121., 135., 137., 139.-149., 151-153., 155-157., 161., 164., 172., 173., 175., 176., 182., 193-196. aminoasit pozisyonları mutasyonlar yönünden analiz edildi.<sup>128</sup>

Tedavi grubundaki hastalarda tedavi öncesi, tedavinin üçüncü ayı ve birinci yılında, inaktif HBsAg taşıyıcılarında ise bir yıl ara ile iki kez olmak üzere serum HBV

DNA düzeyine bakıldı. Tüm hastaların tedavi öncesi serumlarında, inaktif HBsAg taşıyıcılarından ise HBV DNA düzeyi >100 IU/ML olanların serumlarında DNA sekans analizi yapıldı. NA alan gruptakilerin takiplerinde breakthrough geliştiği dönemdeki serumlarında DNA sekans analizi yapıldı.

### **3.2.6 Patolojik İncelemeler**

Hastalara peg-IFN veya NA başlanmadan önce Kocaeli Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Girişimsel Radyoloji bölümü tarafından karaciğer biyopsisi yapıldı, biyopsi örnekleri Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Laboratuvarı'nda tek bir patolog tarafından değerlendirildi. İncelemelerde İshak'a göre modifiye Knodell sistemi kullanıldı. Histolojik aktivite indeksi (HAI) 0–18 aralığında ve fibroz derecesi de 0–6 arasında değerler ile raporlandı.

### **3.3 İstatistiksel Analiz**

Çalışmada elde edilen veriler SPSS 17,0 istatistik programı kullanılarak analiz edildi. Niteliksel değerler sayı ve yüzdelerle ifade edildi. Ölçümsel değerler normal dağılıma uymadığı için medyan (25-75 persantiller) olarak verildi. Bağımlı grupların karşılaştırılmasında Wilcoxon ve Friedman, bağımsız grupların karşılaştırılmasında ise Mann Whitney U ve Kruskal Wallis testleri kullanıldı. Nominal değerler ise ki kare ve Fisher ile test edildi. Korelasyon analizlerinde Spearman's rho testi kullanıldı. ROC analizleri Medcalc version 13.0.6.0 kullanıldı. İstatistiksel değerlendirmede  $p < 0.05$  olan değerler anlamlı kabul edildi.



#### 4. BULGULAR

Çalışmamıza daha önceden KHB enfeksiyonu için tedavi almamış aktif KHB tanımlı 55 hasta ile 39 inaktif HBsAg taşıyıcısı olmak üzere toplam 94 hasta dahil edildi. Aktif KHB'li hastaların 15'i peg-IFN, 17'i TDF, 15'i ETV, 8'i ise LdT tedavisi aldı. İnaktif HBsAg taşıyıcısı olan 39 hasta ise kontrol grubunu oluşturdu. Çalışmaya alınan hastaların 56'sı erkek, 38'i kadın idi. Gruplar arasında kadın ve erkek cinsiyet açısından anlamlı bir farklılık saptanmadı (Tablo 2).

**Tablo 2:** Tedavi ve kontrol grubundaki hastaların sayısı ve cinsiyet dağılımları

	Tedavi grubu		Kontrol grubu		p*
	Hasta sayısı (n)	Hasta yüzdesi (%)	Hasta sayısı (n)	Hasta yüzdesi (%)	
<b>Kadın</b>	20	21,3	18	19,1	0,23
<b>Erkek</b>	35	37,2	21	22,3	

\*Chi square test

Grupların demografik özellikleri, başlangıç laboratuvar özellikleri, HBV DNA düzeyleri, qHBsAg titreleri ve karaciğer histopatolojik özellikleri tablo 3'te gösterildiği gibiydi. Kontrol grubu ile peg-IFN, TDF ve ETV alan hastaların başlangıç AST ve ALT değerleri arasında anlamlı bir fark saptanırken, LdT grubunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında başlangıç AST ve ALT değerleri açısından anlamlı bir fark saptanmadı. Başlangıç trombosit, INR, protombin zamanı, qHBsAg ve HBV DNA virus yükleri karşılaştırıldığında gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ve bu anlamlılığın kontrol grubu olan inaktif HBsAg taşıyıcılarından kaynaklandığı düşünüldü.

Aktif KHB tanımlı hastalar (n=55) ile inaktif HBsAg taşıyıcılarından oluşan kontrol grubunda (n=39) başlangıç ve birinci yıl AST, ALT, qHBsAg ve HBV DNA seviyeleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı. Tedavi grubunda birinci yılda AST, ALT, qHBsAg ve HBV DNA seviyelerinde azalma olurken HBsAg (S/CO) seviyelerinde tedavi ile azalma olmadığı görüldü. Her iki grup arasında HBsAg (S/CO) seviyeleri açısından başlangıçta anlamlı bir fark olduğu görülürken birinci yılda anlamlı bir fark saptanmadı (Tablo 4).

**Tablo 3:** Hastaların demografik, histopatolojik ve tedavi öncesi laboratuvar özelliklerinin karşılaştırılması

	<b>Peg-IFN</b>	<b>TDF</b>	<b>ETV</b>	<b>LdT</b>	<b>KONTROL</b>	
	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	<b>p*</b>
<b>YAŞ</b>	36 (18-70)	33 (24-74)	36 (22-55)	34,5 (18-68)	40 (21-70)	0,392
<b>HAİ</b>	5 (2-7)	6 (4-16)	6 (2-12)	4,5 (4-9)	.	0,038
<b>Fibroz</b>	3 (2-4)	4 (1-6)	4 (2-5)	3 (2-4)	.	0,148
<b>Üre, mg/dl</b>	27,6 (16,6-38)	29,9 (17,1-39)	29,6 (21,6-38,5)	27,8 (17,1-47)	27,8 (17-42)	0,483
<b>Kreatinin, mg/dl</b>	0,7 (0,5-1)	0,7 (0,6-1)	0,7 (0,6-0,9)	0,75 (0,5-1,4)	0,7 (0,5-1,2)	0,850
<b>T.Bilirubin, mg/dL</b>	0,7 (0,2-1,8)	0,7 (0,3-1,5)	0,7 (0,2-1,6)	0,55 (0,3-1,1)	0,6 (0,2-2,4)	0,455
<b>D.Bilirubin, mg/dL</b>	0,3 (0,1-0,6)	0,3 (0,07-0,5)	0,3 (0,1-0,7)	0,2 (0,1-0,4)	0,3 (0,1-0,7)	0,393
<b>AST, U/L</b>	67 (26-126)	53 (17-130)	40 (17-218)	27,5 (16-113)	22 (12-78)	0,000
<b>ALT, U/L</b>	125 (37-284)	82 (21-248)	70 (17-815)	45 (19-317)	20 (13-108)	0,000
<b>GGT, U/L</b>	27 (8-107)	42 (14-138)	33 (15-116)	17,5 (12-179)	20 (4-113)	0,006
<b>LDH, U/L</b>	205 (145-472)	192 (101-420)	212 (107-412)	188 (153-451)	198 (84-609)	0,770
<b>ALP, U/L</b>	87 (60-114)	76 (55-130)	88 (60-136)	77,5 (63-140)	74 (40-215)	0,112
<b>Albumin, g/dL</b>	4,1 (3,8-4,6)	4,3 (3,5-4,9)	4,1 (3,2-4,5)	4,1 (3,8-4,7)	4,4 (3,1-5,1)	0,006
<b>Globulin, g/dL</b>	3,6 (2,5-4,3)	3,1 (2,5-4,7)	3,1 (2,1-3,9)	3,25 (2,8-4,1)	2,9 (2,1-4,3)	0,054
<b>Albumin/ Globulin</b>	1,135 (0,91-1,84)	1,345 (0,74-1,76)	1,323 (0,89-1,95)	1,235 (0,93-1,57)	1,455 (0,91-2,05)	0,020
<b>PTZ</b>	13,9 (12,6-14,9)	13,6 (12,5-15,9)	13,4 (12,1-16)	12,7 (12,3-13,3)	13 (11,9-14,3)	0,000
<b>INR</b>	1,1 (1-1,2)	1,1 (0,9-1,3)	1 (0,9-1,3)	0,95 (0,9-1)	1 (0,9-1,1)	0,000
<b>WBC, 10<sup>3</sup>/µL</b>	6520 (3610-8470)	6340 (2960-8460)	6540 (3890-13500)	6830 (4760-9330)	6610 (3810-11400)	0,602
<b>Hemoglobin, g/dl</b>	14,6 (8,5-16,3)	15,1 (13,4-17)	14,6 (12,4-16,8)	16,5 (13,2-17,6)	14,4 (11,2-17,1)	0,021
<b>PLT, x 10<sup>3</sup>/µL</b>	206 (114-333)	207 (106-271)	164 (58,1-268)	226,5 (179-327)	262 (153-357)	0,000
<b>TG, mg/dl</b>	76 (46-288)	98 (27-194)	90 (42-182)	137 (53-177)	97 (40-194)	0,220
<b>T.KOL, mg/dl</b>	175 (119-212)	155 (121-244)	185 (130-259)	202 (159-219)	179 (129-265)	0,082
<b>HDL</b>	41 (22-70)	42 (26-58)	44 (28-80)	43,5 (32-84)	44 (23-72)	0,586
<b>LDL</b>	97 (75-142)	98 (57-179)	122 (77,8-166)	126,5 (90-150)	112 (65-197)	0,245
<b>AFP, IU/ml</b>	1,9 (0,9-7,8)	2,6 (0,8-11)	2,6 (0,6-16,1)	1,8 (1-3,4)	2,1 (0,8-9,4)	0,257
<b>HBsAg (S/Co)</b>	1843 (335,5-5057)	2514 (270-6227)	3202 (192,1-4351)	3673 (1273-6125)	3827 (12,9-6869)	0,125
<b>qHBsAg (IU/mL)</b>	9599 (213,4-52000)	9776 (1781-33406)	5235 (2439-10294)	5002,5 (455,3-33562)	964,6 (0,05-19994)	0,000
<b>HBcAg (S/Co)</b>	0,341 (0,076-1384)	160,6 (0,069-1667)	0,383 (0,076-2032,9)	0,3565 (0,146-140,9)	0,381 (0,226-0,533)	0,441
<b>HBV DNA x 10<sup>3</sup> IU/mL</b>	154 (7,64-149000)	11300 (0,195-178000)	4260 (2,37-484000)	30,15 (5,61-10500)	0,068 (0-1,21)	0,000

\*Kruskal Wallis test

**Tablo 4:** Tedavi ve kontrol grubundaki hastaların başlangıç ve birinci yıl laboratuvar değerlerinin karşılaştırılması.

	<b>Tedavi grubu (n=55)</b>	<b>Kontrol grubu (n=39)</b>	
	Median (% 25-75 Persentil)	Median (% 25-75 Persentil)	p*
<b>Başlangıç AST</b>	46 (32-74)	22 (18-25)	0,000
<b>Başlangıç ALT</b>	80 (52-137)	20 (16-33)	0,000
<b>Başlangıç HBsAg (S/CO)</b>	2923 (1671-4070)	3827 (2290-5032)	0,035
<b>Başlangıç qHBsAg</b>	5882 (3232-21298)	964,6 (143,2-3092)	0,000
<b>Başlangıç HBV DNA</b>	346000 (18800-33200000)	68 (30-425)	0,000
<b>1.yıl AST</b>	24 (20-32)	20 (15-24)	0,002
<b>1.yıl ALT</b>	27,5 (23-36)	21 (15-31)	0,006
<b>1.yıl HBsAg (S/CO)</b>	3257 (1652-4405)	3651 (2150-4454)	0,503
<b>1.yıl qHBsAg</b>	5487 (2226-16445)	835,1 (174,9-2975)	0,000
<b>1.yıl HBV DNA</b>	0 (0-42)	44 (0-276)	0,002

\*Mann Whitney U test

Karaciğer biyopsisi yapılan 53 aktif KHB'li hastanın histopatolojik incelemesinde 24 hastada (%45,3) HAI altı ve üzerinde, 29 hastada (%54,7) ise altının altında idi. Hastaların fibroz açısından yapılan değerlendirilmesinde bir hastada fibroz bir, 28 hastada fibroz iki ve üç, 24 hastada (%45,3) fibrozun dört ve üzerinde olduğu görüldü. ETV alan iki hastada siroza bağlı trombositopeni nedeniyle karaciğer biyopsisi yapılamadı (Tablo 5).

**Tablo 5:** Tedavi grubundaki hastaların karaciğer histopatolojik özelliklerinin karşılaştırılması.

	<b>Fibroz &lt;4 n (%)</b>	<b>Fibroz ≥4 n (%)</b>	<b>HAI &lt;6 n (%)</b>	<b>HAI ≥6 n (%)</b>
<b>Peg-IFN (n=15)</b>	11 (% 73,3 )	4 (% 26,7 )	11 (% 73,3 )	4 (% 26,7 )
<b>TDF (n=17)</b>	5 (% 29,4 )	12 (% 70,6 )	6 (% 35,3 )	11 (% 64,7 )
<b>ETV (n=13)</b>	6 (% 46,2 )	7 (% 53,8 )	6 (% 46,2 )	7 (% 53,8 )
<b>LdT (n=8)</b>	7 (% 87,5 )	1 (% 12,5 )	6 (% 75 )	2 (% 25 )
<b>Toplam (n=53)</b>	29 (% 54,7 )	24 (% 45,3 )	29 (% 54,7 )	24 (% 45,3 )

Hastaların tümü birlikte değerlendirildiğinde karaciğer biyopsisi yapılan 53 hastanın 34'ü HBeAg negatif, 19'u HBeAg pozitif hastalardı. 34 HBeAg negatif hastanın 11'ine peg-IFN, yedisine TDF, 10'una ETV, yedisine LdT tedavisi verildi. HBeAg negatif hastalar fibroz skoruna göre karşılaştırıldığında fibrozu dördün altında olan 16 hasta ile fibroz skoru dört ve üzerinde olan 18 hasta mevcuttu. İki grup arasında başlangıçta, tedavinin 12. haftası ve birinci yılında bakılan ALT, HBsAg (S/Co),

qHBsAg, HBeAg (S/Co) ve HBV DNA virus yükü değerleri arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı (Tablo 6).

**Tablo 6:** Tedavi alan HBeAg negatif hastaların başlangıç, 12. hafta ve birinci yıl sonuçlarının fibroz durumuna göre karşılaştırılması.

	<b>Fibroz &lt;4 (n=16)</b>	<b>Fibroz =&gt;4 (n=18)</b>	
	<b>Median (% 25-75 Persentil)</b>	<b>Median (% 25-75 Persentil)</b>	<b>p*</b>
<b>Başlangıç</b>			
ALT	85 (40-148,5)	86 (37-137)	0,959
HBsAg (S/Co)	3001 (1897-4652)	3633 (3202-4565)	0,384
qHBsAg (IU/mL)	5217 (1990,5-16190,5)	4252 (2439-5567)	0,443
HBeAg (S/Co)	0,28 (0,095-0,42)	0,31 (0,12-0,4)	0,958
HBV DNA, x10 <sup>3</sup> IU/mL	30,15 (15,05-129,6)	74,85 (8,9-473)	0,646
<b>12.hafta</b>			
ALT	35,5 (21-46)	35 (23-56)	0,878
HBsAg (S/Co)	3728 (2728,5-4540,5)	3434 (2103-4082)	0,33
qHBsAg (IU/mL)	4907,5 (1715-13627,5)	3818 (1870-4407)	0,164
HBeAg (S/Co)	0,34 (0,3-0,4)	0,32 (0,27-0,34)	0,237
HBV DNA	30 (0-40,5)	0 (0-30)	0,365
<b>1.yıl</b>			
ALT	31 (25,5-51)	25 (20-34)	0,109
HBsAg (S/Co)	3359 (2196-4260)	4391,5 (3682-4857)	0,109
qHBsAg (IU/mL)	4953,5 (635,75-10113)	3124 (1511-5210)	0,528
HBeAg (S/Co)	0,37 (0,28-0,4)	0,35 (0,28-0,43)	1
HBV DNA	0 (0-15)	0 (0-0)	0,33

\*Mann Whitney U test

Karaciğer biyopsisi olan 19 HBeAg pozitif hastalar fibroz skoruna göre karşılaştırıldığında ise fibrozu dördün altında olan 13 hasta ve fibroz skoru dört ve üzerinde olan altı hasta mevcuttu. Fibroz skoru dört ve üzerinde olan grupta başlangıç ALT değerleri fibroz skoru dördün altında olan gruptan anlamlı olarak daha yüksek saptandı. Fibroz skoru dördün altında olan grupta hem başlangıç, hem tedavinin üçüncü ayında hem de tedavinin birinci yılında qHBsAg düzeyi anlamlı olarak daha yüksek bulundu. HBV DNA virus yükü açısından bakıldığında başlangıçta ve tedavinin üçüncü ayında her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yok iken tedavinin birinci yılında fibroz skoru dördün altında olan grupta anlamlı olarak daha yüksek saptandı. İki grup arasında başlangıçta, tedavinin 12. haftası ve birinci yılında bakılan HBsAg (S/Co) ve HBeAg (S/Co) değerlerinde her iki grup arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı (Tablo 7).



**Tablo 7:** Tedavi alan HBeAg pozitif hastaların başlangıç, 12. hafta ve birinci yıl sonuçlarının fibroz durumuna göre karşılaştırılması.

	<b>F&lt;4 (n=13)</b>	<b>F&gt;=&gt;4 (n=6)</b>	
	<b>Median (% 25-75 Persentil)</b>	<b>Median (% 25-75 Persentil)</b>	<b>p*</b>
<b>Başlangıç</b>			
ALT	76 (60-82)	161 (74-214)	0,036
HBsAg (S/Co)	1385 (335,5-1816)	2065,5 (1671-2514)	0,087
qHBsAg (IU/mL)	33505 (25831-52000)	10729 (7698-13555)	0,005
HBeAg (S/Co)	717,1 (183,4-1077)	806,4 (684-809)	0,924
HBV DNA, x10 <sup>3</sup> IU/mL	35100 (10500-140000)	55500 (27700-110000)	0,765
<b>12.hafta</b>			
ALT	37 (28-63)	43 (28-65)	0,701
HBsAg (S/Co)	1738 (553,3-2251)	2310 (1643-3220)	0,072
qHBsAg (IU/mL)	30753 (22736-52000)	9188 (8269-12031)	0,009
HBeAg (S/Co)	171,6 (30,9-1129)	15,93 (1-304,3)	0,087
HBV DNA	1730 (331-24500)	161,5 (30-8750)	0,179
<b>1.yıl</b>			
ALT	34,5 (26-37)	25,5 (24-32)	0,385
HBsAg (S/Co)	1457,5 (1112,35-2238)	2232,5 (1652-2749)	0,083
qHBsAg (IU/ML)	32289 (20225,5-46758)	10230 (8293-16445)	0,013
HBeAg (S/Co)	32,45 (10,23-439,55)	11,23 (1,3-51,9)	0,291
HBV DNA	849,5 (38-7910)	0 (0-30)	0,005

\*Mann Whitney U test

Tedavi alan hastalar birlikte değerlendirilerek başlangıç ve birinci yıl ALT, qHBsAg, HBsAg (S/Co), HBeAg (S/Co) ve HBV DNA virus yükleri karşılaştırıldı. Peg-IFN alan hastalardan birinin tedaviye yanıtı olmadığı nedeniyle, birinci yıl sonuçları bir hasta eksik olarak analiz edildi. ALT, qHBsAg ve HBV DNA virus yükünde birinci yılda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu görüldü. HBsAg (S/Co) düzeyleri karşılaştırıldığında başlangıç ve birinci yıl sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. HBeAg (S/Co) düzeylerinde birinci yılda istatistiksel olarak anlamlı ancak klinik olarak anlamsız olduğu düşünülen bir artış olduğu görüldü (Tablo 8).

**Tablo 8:** Tedavi alan hastaların başlangıç ve tedavinin birinci yıl sonuçlarının karşılaştırılması

	n	Median	% 25-75 Persentil	Min-max	p*
ALT	55	80,00	52-137	17-815	<0.0001
ALT 1.yıl	54	27,50	22,75-36	11-101	
HBsAg (S/Co)	55	2923,00	1671-4070	192,1-6227	0,106
HBsAg 1.yıl (S/Co)	54	3257,00	1635-4407	2,7-5463	
qHBsAg (IU/mL)	55	5882,00	3232-21298	213,4-171800	0,004
qHBsAg 1.yıl (IU/mL)	54	5487,00	2136-16860,25	0,08-52000	
HBV DNA, x 10 <sup>3</sup> IU/MI	55	346	18,8-33200	0,195-484000	<0.0001
HBV DNA 1.yıl	54	0,00	0-43	0-56700	

\*Wilcoxon test

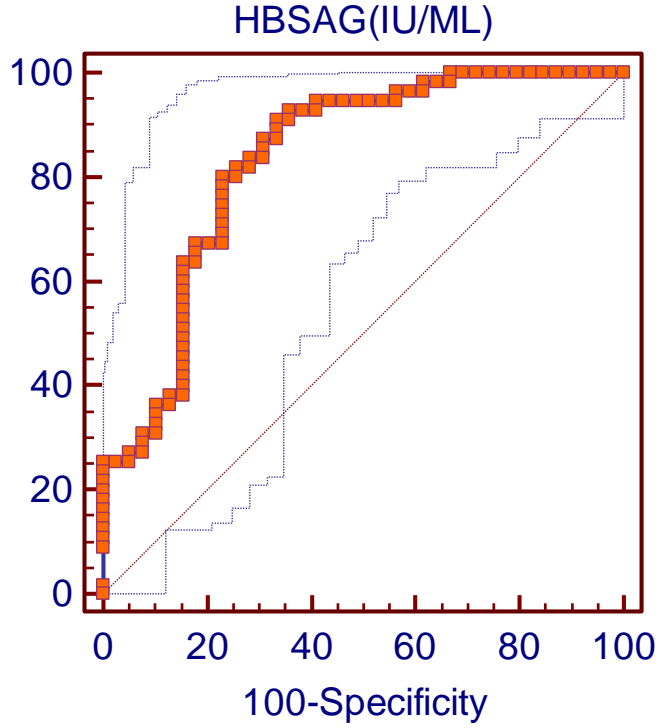
Çalışmamızda hastaları KHB enfeksiyonunun fazlarına göre gruplandırdığımızda HBeAg pozitif hastalarda (n=20) qHBsAg'nin median değeri 25405 IU/mL, inaktif HBsAg taşıyıcılarında (n=39) 964,6 IU/mL, HBeAg negatif hastalarda (n=35) 4797 IU/mL saptanmıştır. Hem HBeAg pozitif hastalarda hem de HBeAg negatif hastalarda tedavi ile ALT, qHBsAg ve HBV DNA virus yükünde birinci yılda bir azalma olduğu görülürken, HBsAg (S/Co) düzeylerinde her iki grupta tedavi ile azalma görülmemektedir (Tablo 9).

**Tablo 9:** Hastaların kronik hepatit B enfeksiyonunun fazlarına göre karşılaştırılması.

	<b>HBeAg pozitif hastalar (n=20)</b>	<b>İnaktif HBsAg taşıyıcıları (n=39)</b>	<b>HBeAg negatif hastalar (n=35)</b>
	<b>Median (% 25-75 Persentil)</b>	<b>Median (% 25-75 Persentil)</b>	<b>Median (% 25-75 Persentil)</b>
<b>Başlangıç AST</b>	49,5 (32/88)	22 (18/25)	46 (32/74)
<b>Başlangıç ALT</b>	79 (61,5/143)	20 (16/33)	83 (37/137)
<b>Başlangıç HBsAg (S/Co)</b>	1681,5 (840,5/2305,5)	3827 (2290/5032)	3539 (2839/4565)
<b>Başlangıç qHBsAg (IU/ML)</b>	25405 (10071/42781)	964,6 (143,2/3092)	4797 (2333/7431)
<b>HBeAg (S/Co)</b>	790 (183,4/11929)	0,381 (0,35/0,41)	0,2945 (0,10/0,40)
<b>Başlangıç HBV DNA</b>	41350000 (14100000/128000000)	68 (30/425)	49100 (13400/251000)
<b>1.yıl AST</b>	22 (20/28)	20 (15/24)	25 (21/36)
<b>1.yıl ALT</b>	32 (24/36)	21 (15/31)	27 (22/36)
<b>1.yıl HBsAg (S/Co)</b>	1652 (1320/2658)	3651 (2150/4454)	3979 (3088/4513)
<b>1.yıl qHBsAg (IU/ML)</b>	18970 (8293/38678)	835,1 (174/2975)	3789 (946,8/5623)
<b>1.yıl HBeAg (S/Co)</b>	23,06 (2,64/139,1)	0,433 (0,40/0,49)	0,355 (0,28/0,42)
<b>1.yıl HBV DNA</b>	42 (0/2130)	44 (0/276)	0 (0/0)

İnaktif HBsAg taşıyıcıları ve KHB hastalarını ayırmada serum qHBsAg düzeylerinin tanı koymadaki etkinliği ROC (receiver operating characteristic) analizi ile test edildi. AUC (eğri altında kalan alan): 0.833 (iyi derecede), sensitivite %80, spesifite %76.92,  $p<0.0001$  saptandı. qHBsAg için cut off değeri bu analize göre 3092 IU/mL olarak belirlendi (Şekil 2).



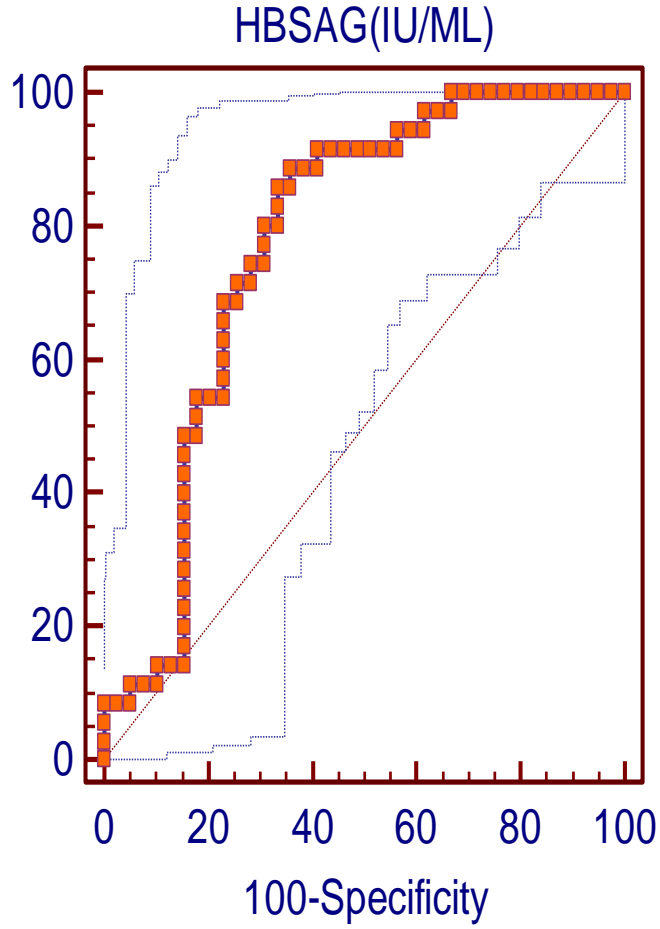


**Şekil 2:** İnaktif HBsAg taşıyıcıları ve kronik hepatit B hastalarını ayırmada qHBsAg'nin tanı koymadaki etkinliği. ROC analizi ile test edildiğinde AUC: 0.833, sensitivite %80, spesifite %76.92, HBsAg için cut off değeri 3092 IU/mL,  $p < 0.0001$ .

Not: AUC için

0.90-1.00 = Mükemmel
0.80-0.90 = İyi
0.70-0.80 = Orta
0.60-0.70 = Zayıf
0.50-0.60 = Başarısız

İnaktif HBsAg taşıyıcıları ve HBeAg negatif KHB hastalarını ayırmada serum qHBsAg düzeylerinin tanı koymadaki etkinliği ROC analizi ile test edildi. AUC: 0.733 (iyi derecede), sensitivite %80, spesifite %69,2,  $p < 0.0001$  saptandı. qHBsAg için cut off değeri bu analize göre 2188 IU/mL olarak belirlendi (Şekil 3).



**Şekil 3:** İnaktif HBsAg taşıyıcıları ve HBeAg negatif kronik hepatit B hastalarını ayırmada qHBsAg'nin tanı koymadaki etkinliği. ROC analizi ile test edildiğinde AUC: 0.733, sensitivite %80, spesifite %69,2, HBsAg için cut off değeri 2188 IU/mL,  $p<0.0001$ .

Çalışmada verilerin korelasyon analizinde normal dağılıma uymadığı için Spearman korelasyon testi kullanıldı. Korelasyon katsayısı için 0.70-1.00 yüksek ilişki, 0.30-0.70 orta ilişki, 0.30-0 düşük ilişki olarak yorumlandı,  $p<0.01$  düzeyinde anlamlı kabul edildi.

Başlangıç değerleri için yapılan korelasyon analizlerinde, tedavi alan hastaların tamamı ele alındığında ( $n=55$ ) HBsAg (S/Co) ile hem qHBsAg hem de HBV DNA arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif bir korelasyon saptandı ( $r=-0.754/-0,590$ ;  $p=0.000$ ). Tedavi alan hastalarda ( $n=55$ ) başlangıç qHBsAg ile HBV DNA arasında istatistiksel olarak anlamlı orta düzeyde korelasyon olduğu görüldü ( $r=0,619$ ,  $p=0,000$ ). Kontrol grubunda ( $n=39$ ) başlangıç HBsAg (S/Co), qHBsAg ve HBV DNA

değerleri için korelasyon analizi yapıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptanmadı.

Hastalar fibroza göre gruplandırıldığında hem fibroz sloru <4 olan grupta (n=29) hem de =>4 olan grupta (n=24) başlangıç HBsAg (S/Co) ile hem qHBsAg hem de HBV DNA arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif bir korelasyon saptandı (Fibroz skoru <4 olanlarda  $r=-0.804/-0,611$ ,  $p=0.000$ ; fibroz skoru =>4 olanlarda  $r=-0.533/-0,553$ ,  $p=0.007/0,005$ ). Fibroz skoru <4 olan grupta başlangıç qHBsAg ile HBV DNA arasında istatistiksel olarak anlamlı yüksek düzeyde bir ilişki olduğu görüldü ( $r=0,759$ ,  $p=0,000$ ). Fibroz skoru => 4 olan grupta ise başlangıç qHBsAg ile HBV DNA arasında istatistiksel olarak anlamlı orta düzeyde bir ilişki olduğu görüldü ( $r=0,661$ ,  $p=0,000$ ).

Tedavi alan hastalar peg-IFN (n=15) ve NA alanlar (n=40) olarak gruplandırılarak başlangıç değerlerinin korelasyonu bakıldığında ise peg-IFN alan grupta HBsAg (S/Co), qHBsAg ve HBV DNA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptanmadı. Ancak NA alan grupta HBsAg (S/Co) ile hem qHBsAg hem de HBV DNA arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif bir korelasyon saptandı ( $r=-0.886/-0,712$ ,  $p=0.000$ ).

Hastalar HBeAg pozitif (n=20) ve HBeAg (n=35) negatif olarak gruplandırılarak yapılan korelasyon analizlerinde başlangıç qHBsAg ve HBV DNA değerleri arasında her iki grupta da korelasyon saptanmadı. Ancak tedavinin birinci yılında yapılan korelasyon analizlerinde HBeAg pozitif hasta grubunda qHBsAg ile HBV DNA arasında istatistiksel olarak anlamlı yüksek bir ilişki saptandı ( $r=0.736$ ,  $p=0.000$ ).

Hastaların birinci yıl değerleri için yapılan korelasyon analizlerinde ise, tedavi alan hastaların tamamı ele alındığında (n=54) HBsAg (S/Co) ile hem qHBsAg hem de HBV DNA arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif bir korelasyon saptandı ( $r=-0.588/-0,432$ ;  $p=0.000/0,001$ ). Tedavi alan hastalarda birinci yıl qHBsAg ile HBV DNA arasında istatistiksel olarak anlamlı orta düzeyde korelasyon olduğu görüldü ( $r=0,512$ ,  $p=0,000$ ). Kontrol grubu (n=39) birinci yıl değerleri için korelasyon analizi yapıldığında HBsAg (S/Co) ile qHBsAg ve HBV DNA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptanmazken, qHBsAg ile HBV DNA arasında birinci kontrolün tersine istatistiksel olarak anlamlı düşük düzey bir korelasyon olduğu görüldü ( $r=0,418$ ,  $p=0,008$ ).

Hastalar fibroz skoruna göre gruplandırıldığında fibroz skoru <4 olan grupta (n=29) hem birinci yıl HBsAg (S/Co) ile qHBsAg ve HBV DNA arasında hem de birinci yıl qHBsAg ile HBV DNA arasında pozitif bir korelasyon saptanmadı. Fibroz skoru => 4 olan grupta ise (n=24) birinci yıl qHBsAg ile HBV DNA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmazken birinci yıl HBsAg (S/Co) ile qHBsAg arasında istatistiksel olarak anlamlı orta düzeyde bir ilişki saptandı ( $r=0,605$ ,  $p=0,002$ ). Tedavi alan hastalar peg-IFN (n=14) ve NA (n=40) alanlar olarak gruplandırılarak birinci yıl değerlerinin korelasyonu bakıldığında ise peg-IFN alan

grupta HBsAg (S/Co) ile qHBsAg ve HBV DNA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptanmadı, qHBsAg ile HBV DNA arasında istatistiksel olarak anlamlı orta düzey bir ilişki saptandı ( $r=0,669$ ,  $p=0,009$ ). NA alan grupta HBsAg (S/Co) ile hem qHBsAg hem de HBV DNA arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif bir korelasyon saptandı ( $r=-0,883/-0,442$ ,  $p=0,000/0,004$ ). NA alan hastalarda qHBsAg ile HBV DNA arasında istatistiksel olarak anlamlı orta düzey bir ilişki olduğu saptandı ( $r=0,503$ ,  $p=0,001$ ).

Tedaviye yanıt kriteri olarak qHBsAg değerinin  $<1500$  IU/mL kabul edildiğinde üçüncü ayda peg-IFN grubunda dört hastada (%26,7) yanıt alınırken, TDF grubunda bir hastada (%5,9), ETV grubunda bir hastada (%6,7) ve LdT grubunda ise iki hastada (%25) yanıt alındı. Sonuç olarak tedavinin üçüncü ayında tedavi alan 55 hastanın sekizinin tedaviye yanıt verdiği görüldü. Bu sekiz hastanın dördü peg-IFN grubunda (%50), biri TDF (%12,5), biri ETV (%12,5), ikisi LdT (%25) grubunda yer almaktaydı. Birinci yılda ise peg-IFN grubunda altı hastada (%42,9) yanıt alınırken, TDF grubunda bir hastada (%5,9), ETV grubunda iki hastada (%13,3) ve LdT grubunda ise iki hastada (%25) yanıt alındı. Birinci yılda toplam 11 hastada tedaviye yanıt alındı. 11 hastanın altısı peg-IFN (%54,5) grubunda, biri TDF (%9,1), ikisi ETV (%18,2), ikisi LdT (%18,2) grubunda yer almaktaydı.

Çalışmaya alınan 94 naif hastanın 71'nde tedavi başlamadan önce alınan serumlarından HBV DNA sekanslama analizi yapılabildi. Hastaların tamamının genotip D ile infekte olduğu görüldü. HBV subgenotiplemesine göre 71 hastanın 65'i D1, dördü D2 ve ikisi D3 ile infekte olduğu saptandı. Hastalarda, HBV *pol* geni bölgesi, ilaç direnci mutasyonları yönünden analiz edildi. Bu amaçla primer ilaç direnci, parsiyel ilaç direnci ve kompensatuvar mutasyonlar ele alındı (Tablo). Yapılan analizlerde LdT ve LAM direncine neden olan M204I mutasyonu ile ADV direnci ve TDF için duyarlılığı azaltan N236T mutasyonu olmak üzere iki hastada primer ilaç direnci mutasyonu saptandı. Bir hastada parsiyel ETV direncine neden olan M204I mutasyonu saptandı. Çalışmamızda saptanan viral fitnessi onaran kompensatuvar mutasyonlar ise LdT ile ilişkili L91I mutasyonu ( $n=3$ ), ADV ile ilişkili N238D mutasyonu ( $n=1$ ) ile LAM ve ADV ile ilişkili olarak Q149K ( $n=1$ ), N139K ( $n=1$ ), V214A ( $n=2$ ), Q215S ( $n=3$ ), Q215H ( $n=1$ ) mutasyonlarıdır (Tablo 10).

**Tablo 10:** HBV DNA Sekanslama Analizi Yapılabilen Hastalarda HBV Polimeraz Geni Mutasyonları ve İlaç Direnci Durumu.

HBV polimeraz geni mutasyonu karakteri	Analiz yapılan hastalar (n=71)	Klinik Önemi	Verilen Tedavi
	Mutasyon paterni, (n)		
Primer ilaç direnci Mutasyonu	M204I (1)	LdT ve LAM direnci	Peg-IFN
	N236T (1)	ADV direnci, TDF için duyarlılığı azaltıcı mutasyon	TDF
Parsiyel ilaç direnci Mutasyonu	M204I (1)	ETV direnci	Peg-IFN
Kompansatuvar Mutasyon	L91I (3)	LdT ile ilişkili	TDF
	Q149K (1)	LAM ve ADV ile ilişkili	TDF
	N139K (1)		TDF
	V214A (2)	LAM ve ADV ile ilişkili	TDF/Kontrol
	Q215S (3)	LAM ve ADV ile ilişkili	TDF/LdT/Kontrol
	Q215H (1)	LAM ve ADV ile ilişkili	Kontrol
	N238D (1)	ADV ile ilişkili	Kontrol

Hepatit B virus genomunun çembersel organizasyonda olması ve *pol/S* genlerinin üst üste çakışması nedeniyle HBV DNA sekanslama analizi yapılan 71 hastada HBsAg kaçış mutasyonları da analiz edilebildi. Tipik HBsAg kaçış mutasyonları HBIg kaçağı, aşı kaçağı, HBsAg tanı testi kaçağı ve bağışık yanıt kaçağı olmak üzere 4 ayrı kategoride ele alındı. Hastalarda saptanan HBsAg kaçış mutasyonları tablo 11’de gösterildi.

**Tablo 11:** HBV DNA Sekanslama Analizi Yapılabilen Hastalarda HBV S geninde tipik HBsAg Kaçış Mutasyonları.

HBV S geni mutasyonu karakteri	Analiz yapılan hastalar (n=71)
	Mutasyon paterni (n)
HBİg kaçığı	T123N (1), P142S (1), G145R (1), P120T (1), G119R (2), T126I (1), C124 (1), C139S (1), K141I (1), Q129H (1), L126I* (1).
Aşı kaçığı	P142S (1), G130R (1), S143L (1), G145R (1), Q129H (1), L109R (1), Q129R (1), T126I (1), P120T (1), L126I* (1).
Tanı testi kaçığı	R122K (1), T123N (1), P142S (1), G130R (1), M133T (1), S143L (1), G145R (1), P120T (1), G145L (1), Q129R (1), T131N (2).
Bağışık yanıt kaçığı	I110L (1), S132F (1), I110L (1), P120R (1).

\* Breakthrough geliştiğinde yapılan analizde tespit edilen mutasyon.

HBV DNA sekanslama analizi yapılabilen hastalarda ADAPVEM analizi yapıldı. Hastalarda W196\*/L/S (Peg-IFN tedavisi aldı) ve S193L (LdT tedavisi aldı) olmak üzere toplam iki doğal gelişen ADAPVEM paterni saptandı.

Peg-IFN tedavisi alan gruptaki hastalardan birinde 48 hafta IFN tedavisini tamamladıktan bir yıl sonra HBsAg kaybı geliştiği görüldü. Aynı hastanın tedavi başlamadan önce alınan serumunda yapılan HBV DNA sekanslama analizi sonucunda S geninde I110L bağışıklık sistemi kaçığı tespit edildi.

TDF alan 17 hastanın üçünde tedavi altında iken breakthrough gelişmesi üzerine HBV DNA sekanslama analizi yapıldı. Bu üç hastadan ikisinde hem tedavi öncesinde hem de breakthrough geliştiğinde (bir hastada ikinci yılda birinde de birinci yılda) yapılan analizlerde mutasyon saptanmadı. Tedavinin ikinci yılında breakthrough gelişen hastanın tedavisine devam edildiğinde virus yükünün tekrar negatifleştiği ve üçüncü yılın sonunda HBeAg serokonversiyonu geliştiği görüldü. TDF grubundaki breakthrough gelişen diğer üçüncü hastada ise tedavi öncesi yapılan analizlerde D2 alt tipi ve *pol* geninde N236T mutasyonu saptanırken; tedavinin birinci yılında breakthrough geliştiğinde yapılan analizlerde ise S geninde L126I mutasyonu saptandı. TDF grubunda yer alan bir diğer hastada ise tedavinin birinci yılında HBV DNA pozitifliği devam ettiği halde HBeAg serokonversiyonu geliştiği görüldü.

ETV grubundaki hastalardan birinde tedavi öncesi yapılan analizlerde mutasyon saptanamadığı halde tedavinin birinci yılında yanıtızsız olması nedeniyle tedavisi kesildi. ETV alan 15 hastanın ikisinde tedavinin ikinci yılında iken HBeAg kaybı

meydana geldi, her iki hastanın da tedavi öncesi yapılan analizlerinde mutasyon saptanmadı.

Kontrol grubunda yer alan üç hastada ilk kontrolden bir yıl sonraki ikinci kontrolde bakılan HBV DNA virus yüklerinin  $>2000$  IU/mL saptanması sonucunda yeniden viral replikasyonun başladığı ve bu üç hastanın reaktivasyon dönemine geçtiği görüldü. Ayrıca kontrol grubunda yer alan iki hastada HBsAg ve anti HBs birlikte pozitifliği saptanmasına rağmen, iki hastasında HBV DNA virus yüklerinin negatif olması nedeniyle mutasyon analizi yapılamadı.



## 5. TARTIŞMA

KHB infeksiyonunda antiviral tedaviye başlama kararı verilmesi, tedaviye yanıtın izlenmesi ve antiviral direncin saptanması pahalı ve deneyim gerektiren bir yöntem olan HBV DNA düzey tayini ile yapılmaktadır. HBsAg ise 1965 yılında Blumberg tarafından keşfedildiğinden bu yana HBV infeksiyonunun tanısında kullanılan güvenilir bir belirteçtir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, qHBsAg ile HBV DNA düzeyi arasındaki ilişki araştırılmaktadır. HBsAg düzey tayininin hastalığın seyri ve tedavinin takibinde etkili olarak kullanılabilmesi düşünülmekle birlikte, klinik önemi henüz aydınlatılamamıştır.<sup>129,130,131</sup>

HBsAg, konak genomuna integre olan HBV DNA molekülünden konak enzimleri kullanılarak ya da transkripsiyonel aktif cccDNA molekülünün translasyonu ile üretilmektedir. Serum HBsAg seviyelerinin intrahepatik cccDNA seviyeleri ile korele olduğu ve kantitasyonun infekte karaciğer hücrelerini yansıtan bir belirteç olarak kullanılabilmesi düşünülmektedir.<sup>132</sup> Chan ve ark. yaptıkları bir çalışmada qHBsAg düzeyi ile HBV DNA ve cccDNA arasındaki ilişkinin hastalığın fazlarına göre değişiklik gösterdiğini bildirmiştir. Bu çalışma ile HBeAg pozitif hasta grubunda HBsAg titresi ile HBV DNA ve cccDNA arasında pozitif bir korelasyon saptanırken, HBeAg negatif grupta bir korelasyon olmadığı bildirilmiştir.<sup>133</sup> Lee ve ark.'nın yaptıkları bir çalışmada ise HBeAg pozitif hastalarda tedavinin üçüncü ayında HBsAg seviyesi <3000 IU/mL saptanırsa tedavinin birinci yılında HBV DNA negatifleşmesi ve HBeAg serokonversiyonunu tahmin etmede qHBsAg'nin bağımsız tahmin edici faktör olarak kabul edilebileceği bildirilmiştir. HBeAg negatif grupta ise tedavi sırasında HBsAg titresi sürekli arttığından qHBsAg düzeyinin tedavi takibinde kullanılamayacağı sonucuna varılmıştır.<sup>134</sup> Bizim çalışmamızda tedavi alan hastalar HBeAg durumuna göre gruplandırıldığında hem HBeAg pozitif hem de HBeAg negatif hastalarda başlangıç qHBsAg ile HBV DNA değerleri arasında bir korelasyon saptanmadı. Tedavinin birinci yılı değerleri ile yapılan korelasyon analizlerinde HBeAg pozitif hasta grubunda qHBsAg ile HBV DNA arasında istatistiksel olarak anlamlı yüksek bir ilişki saptandı ( $r=0.736$ ,  $p=0.000$ ).

KHB infeksiyonunun doğal seyri boyunca qHBsAg düzeyleri HBV DNA ile benzer şekilde immüntoleran dönemden, düşük replikatif faza doğru giderek azalma göstermektedir. 2010 yılında Jaroszewicz ve ark. yaptıkları çalışmalarında qHBsAg'nin median değeri immüntoleran fazda 90881, immünlirens fazında 23371, inaktif fazda 1230 ve HBeAg negatif KHB grubunda 7545 IU/mL olarak bildirilmiştir.<sup>135</sup> Bizim çalışmamızda da benzer şekilde HBeAg pozitif hastalarda ( $n=20$ ) qHBsAg'nin median değeri 25405 IU/mL, inaktif HBsAg taşıyıcılarında ( $n=39$ ) 964,6 IU/mL, HBeAg negatif hastalarda ( $n=35$ ) ise 4797 IU/mL saptandı (Tablo 9).

HBsAg düzeyleri ile virolojik ve histopatolojik bulguların ilişkisinin araştırılması amacıyla 198 HBeAg pozitif KHB hastasının alındığı bir çalışmada



fibroz skoru 4-6 olan hastalarda qHBsAg düzeyinin daha düşük olduğu saptanmıştır. Bu çalışmada aynı zamanda qHBsAg ile HBV DNA arasında güçlü bir korelasyon olduğu gösterilmiştir.<sup>136</sup> Bu doğrultuda yapılan bir başka çalışmada HBeAg pozitif KHB infeksiyonunda HBsAg seviyesi ile fibroz derecesi arasında negatif bir korelasyon tespit edilmiştir. Bu çalışmada immüntoleran fazda normal ALT seviyesi ve minimal fibroz ile karşılaştırılırken, hepatositlerin immuno histokimyasal boyamasında yüksek oranda HBsAg olduğu, immünlirens fazda ise ALT ve fibroz derecesi artarken viral baskılanma ile HBsAg seviyesinin düştüğü gösterilmiştir.<sup>137</sup> Bizim çalışmamızda da benzer şekilde fibroz skoru dört ve üzerinde olan HBeAg pozitif hastalarda (n=6) qHBsAg seviyeleri hem başlangıç, hem tedavinin üçüncü ayı hem de tedavinin birinci yılında fibroz skoru dördün altında olan gruptan (n=13) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha düşük saptandı (Tablo 7). HBeAg negatif hasta grubunda ise fibroz skoru dört ve üzerinde olanlar ile fibroz skoru dördün altında olan hastalar arasında hem tedavi öncesinde, hem tedavinin üçüncü ayında hem de birinci yılında qHBsAg ve HBV DNA açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı (Tablo 6).

Son yıllarda yapılan birçok çalışmada HBV DNA ile serum qHBsAg düzeyleri arasında bir korelasyon olduğu gösterilmiştir.<sup>134,135,138</sup> Çalışmamızda tedavi alan hastaların (n=55) tamamı ele alınarak yapılan korelasyon analizlerinde başlangıç qHBsAg ve HBV DNA seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı orta düzeyde bir korelasyon olduğu görüldü (r=0.619, p=0,000). İnaktif HBsAg taşıyıcılarında (n=39) ise başlangıç qHBsAg ile HBV DNA seviyeleri arasında anlamlı bir korelasyon saptanmadı. Hastalar fibroz durumuna göre gruplandırıldığında ise fibroz skoru dördün altında olan hastalarda (n=29) başlangıç qHBsAg ile HBV DNA arasında istatistiksel olarak anlamlı yüksek düzeyde bir ilişki olduğu görüldü (r=0.759, p=0.000). Fibroz seviyesi dört ve üzerinde olan hastalarda ise başlangıç qHBsAg ile HBV DNA arasında istatistiksel olarak anlamlı orta düzeyde bir ilişki saptandı (r=0.661, p=0,000).

Çalışmamızda elde edilen sonuçlara göre ALT, qHBsAg ve HBV DNA değerlerinde tedavi ile bir yıl sonra istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu görülürken (sırasıyla p<0.0001, p=0.004, p<0,0001), HBsAg (S/Co) değerlerinde tedavi ile bir azalma saptanmamıştır (p=0.106) (Tablo 8). Ayrıca çalışmamızda HBsAg (S/Co) ile qHBsAg ya da HBV DNA arasında bir korelasyon olmadığı görülmüştür. Çalışmamızda HBsAg (S/Co) cinsinde olan değerlerinin tedaviyi izlemde kullanılamayacağı sonucuna varılmıştır.

Serum ALT ve HBV DNA düzeylerinin inaktif HBsAg taşıyıcıları ile aktif KHB infeksiyonu olan hastaları ayırmada yetersiz kaldığı durumlarda da qHBsAg'nin kullanılabilirliği önemli bir diğer araştırma konusudur.<sup>139</sup> Brunetto ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada qHBsAg seviyesinin HBV DNA miktarı ile kombine değerlendirildiğinde özellikle HBeAg negatif KHB ile inaktif HBsAg taşıyıcı grubu

birbirinden ayırt etmede kullanılabilceği sonucuna varılmıştır.<sup>140</sup> Çalışmamızda inaktif HBsAg taşıyıcıları ile KHB hastalarını ayırmada serum qHBsAg düzeylerinin tanı koymadaki etkinliği ROC analizi ile test edildiğinde, qHBsAg'nin tanı koymadaki etkinliği iyi derecede, sensitivitesi %80 ve spesifitesi %76.92 olarak saptandı (p<0.0001). qHBsAg için cut off değeri bu analize göre 3092 IU/mL olarak belirlendi (Şekil 2). Serum qHBsAg düzeylerinin inaktif HBsAg taşıyıcıları ile HBeAg negatif KHB hastalarını ayırmada ise yine benzer şekilde tanı koymadaki etkinliği iyi derecede, sensitivite %80 ve spesifite %69.2 saptandı (p<0.0001). qHBsAg için cut off değeri bu analize göre 2188 IU/mL olarak belirlendi (Şekil 3).

Yapılan bazı çalışmalar peg-IFN tedavisinde kalıcı virolojik yanıtı (HBV DNA <2000 IU/mL) öngörmeye qHBsAg seviyesinin HBV DNA'dan daha güvenilir olduğunu desteklemektedir.<sup>141</sup> Peg-IFN ile tedavi edilen HBeAg pozitif KHB hastalarında uygun HBsAg ölçümünün yapıldığı üç global çalışmanın sonuçlarının analiz edildiği bir çalışmada 12. haftada HBsAg düzeyi <1.500 IU / ml olan hastalarda % 45 cevap elde edildiği (6 ay tedavi sonrası HBV DNA <2000 IU / ml ile HBeAg kaybı) görülmüş. Peg-IFN monoterapisi alan 465 hastanın incelendiği bu çalışmada 12. haftada HBsAg seviyesinde düşüş olmayan genotip A ya da D hastalarında yanıt oranları daha düşük bulunmuş<sup>142</sup>. HBeAg pozitif KHB hastalarında tedaviye yanıt kriteri olarak HBsAg ölçümünün araştırıldığı bir diğer çalışmada 12. ve 24. haftada HBsAg seviyeleri <1500 IU/mL olan hastalarda altı ay tedavi sonrası HBeAg serokonversiyon oranları anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur<sup>143</sup>. Bizim çalışmamızda ise tedaviye yanıt kriteri olarak qHBsAg değerinin <1500 IU/mL kabul edildiğinde üçüncü ayda peg-IFN grubunda dört hastada (%26,7) yanıt alınırken, TDF grubunda bir hastada (%5,9), ETV grubunda bir hastada (%6,7) ve LdT grubunda ise iki hastada (%25) yanıt alındı. Sonuç olarak tedavinin üçüncü ayında tedavi alan 55 hastanın sekizinin tedaviye yanıt verdiği görüldü. Birinci yılda ise peg-IFN grubunda altı hastada (%42,9) yanıt alınırken, TDF grubunda bir hastada (%5,9), ETV grubunda iki hastada (%13,3) ve LdT grubunda ise iki hastada (%25) yanıt alındı. Birinci yılda tedaviye yanıt alınan 11 hastanın altısı peg-IFN (%54,5) grubunda, biri TDF (%9,1), ikisi ETV (%18,2), ikisi LdT (%18,2) grubunda yer almaktaydı. Çalışmamızda peg-IFN tedavisi ile qHBsAg seviyelerinde ki azalmanın daha hızlı olduğu ve daha yüksek oranda tedaviye yanıt alındığı görüldü. Ancak bizim çalışmamızda peg-IFN tedavisi alan hastaların dördü HBeAg pozitif olup bu hastalarda HBeAg serokonversiyonu görülmedi, hastaların dördünde 12. haftada HBsAg seviyesi >20000 IU/mL saptandı. Peg-IFN grubunda tedavinin 12. haftasında HBsAg seviyesi <1500 IU/mL olan dört hasta ise HBeAg negatif grupta yer almaktaydı. Bu dört hastanın birinde tedavisi tamamlandıktan bir yıl sonra HBsAg kaybı olduğu görüldü. Tedavinin 12. haftasında HBsAg <1500 IU/mL saptanan tüm hastalar HBeAg negatif olup genotip/subtip D1 olan hastalardı.

KHB infeksiyonunun tedavisinde ana hedef HBsAg serokonversiyonu olmakla birlikte bu durum oldukça nadir görülmektedir. Çalışmamızda peg-IFN alan

hastalardan (n=15) birinde 48 hafta peg-IFN tedavisini tamamladıktan bir yıl sonra HBsAg kaybı geliştiği görüldü. Takiplerinde HBsAg kaybı gelişen bu hastanın tedavi sırasında 12. haftada HBsAg seviyesi <1500 IU/mL saptandı. Yine peg-IFN alan hastalardan birinde yanıtız olması nedeniyle tedavi 12. haftada sonlandırıldı. Bu hastanın ise tedavisinin 12. haftasında bakılan HBsAg seviyesi >20000 IU/mL saptandı. TDV alan 17 hastanın birinde tedavinin birinci yılında, diğesinde de tedavinin üçüncü yılında olmak üzere iki hastada HBeAg serokonversiyonu gelişti. HBeAg serokonversiyonu gelişen her iki hastanın da tedavinin 12. haftasında bakılan HBsAg seviyesi 1500-20000 IU/mL saptandı. ETV alan 15 hastanın ikisinde ise tedavinin ikinci yılında HBeAg kaybı meydana geldiği görüldü. HBeAg kaybı olan her iki hastanın da tedavinin 12. haftasında bakılan HBsAg seviyesi 1500-20000 IU/mL saptandı.

Çalışmamıza dahil edilen tüm hastalarda predominant olarak HBV genotip D saptandı. HBV genotiplerinin coğrafik farklılıklar gösterdiği ve bulunduğu popülasyonlara bağlı olarak değişken olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalara göre; HBV genotip B ve C Asya popülasyonlarında fazla görülürken, genotip A ve D Kuzey Amerika ve Avrupa ülkelerinde daha fazla görülmektedir. Akdeniz havzasında ise genotip D hâkimiyeti bulunmaktadır<sup>144</sup>. Yapılan çalışmalara göre Türkiye’de HBV genotip D’nin baskın olduğu anlaşılmaktadır<sup>145,146,147</sup>. Ülkemizde HBV subgenotip D1 – D4 çeşitliliğine rastlanmaktadır<sup>148</sup>. Bu nedenle Türkiye’de HBV genotipleme yerine subgenotipleme ile hasta takibinin daha anlamlı olduğu sonucuna varılabilir<sup>147, 148</sup>. Çalışmamızda, yüksek oranda HBV subgenotip D1 tespit edildi ancak D2 ve D3 subgenotiplerin de rastlandı (subgenotipleme yapılan 71 hastanın 65’inin D1, dördünün D2 ve ikisinin D3 olduğu saptandı).

KHB tedavisinde kullanılan NA’ları pol geni üzerinde nokta mutasyonlara neden olabilmektedir. Nokta mutasyonlarının oluşmasıyla kullanılan ilaca karşı direnç gelişebilmektedir<sup>149</sup>. Bu mutasyonlar esas olarak kullanılan ilaca yanıtızlığa yol açan primer ilaç direnci mutasyonları ve viral fitness (viral yükü arttırıcı ve replikasyon kapasitesini onarıcı) etkileyen kompensatuar mutasyonlar olarak iki gruba ayrılmaktadır. Çalışmamızda naif dönemde hastalarda LdT ve LAM direncine neden olan M204I mutasyonu ile ADV direnci ve TDF için duyarlılığı azaltan N236T mutasyonu olmak üzere iki hastada primer ilaç direnci mutasyonu saptandı (Tablo 10). Bir hastada naif dönemde parsiyel ETV direncine neden olan M204I mutasyonu saptandı. Doğal olarak gelişen N236T mutasyonu saptanan hasta TDF tedavisi almakta iken tedavinin birinci yılında breakthrough gelişmesi sonucu yeniden HBV DNA sekanslama analizi yapıldığında hastada S geninde L126I mutasyonu saptandı. D2 subgenotipindeki bu hastada doğal gelişmiş TDF için duyarlılığı azaltıcı N236T mutasyonu saptanması, hastada tedavinin birinci yılında gelişen breakthrough açıklamakta ve tedavi öncesinde mutasyon analizi yapılmasının faydalı olabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamızda saptanan doğal gelişen kompensatuar mutasyonlar ise LdT ile ilişkili L91I (n=3) mutasyonu, ADV ile ilişkili N238D (n=1) mutasyonu

ile LAM ve ADV ile ilişkili olarak Q149K (n=1), N139K (n=1), V214A (n=2), Q215S (n=3), Q215H (n=1) mutasyonlarıdır (Tablo 10).

Yapılan bazı çalışmalarda KHB infeksiyonunda NA tedavisine bağlı gelişen primer ilaç direncinin HCC riskini arttırdığı da gösterilmiştir<sup>149</sup>. Yapılan bir çalışmada 141 KHB'li HCC hastasının 8'inde sL21\*, sW156\* ve sW172\* mutasyonlarına bağlı olarak HCC geliştiği belirtilmektedir<sup>150</sup>. Prospektif olarak yapılan diğer bir çalışmada 2 yıl boyunca izlenen dekompanse sirozlu ve NA tedavisi altındaki 198 hastadan (LAM kullanan hasta; 39, ADV; 73; LdT; 36, ETV; 54) primer ilaç direnci tespit edilenlerinde (n=36) kümülatif HCC geliştirme riskinin (%30.6) virolojik yanıt geliştiren hastalara göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir<sup>151</sup>. Çalışmamızda HCC'e progresyonu artıran bir mutasyona rastlanmamıştır.

Kronik hepatit B tedavisinde kullanılan NA, HBV genomunun sirküler organizasyonundan dolayı S geninde tipik HBsAg kaçış mutasyonlarının oluşumuna yol açabilmektedirler. Klinik ve epidemiyolojik önemdeki bu mutasyonlara örnek olarak; sP120T, sM133I, sS143L, sD144A/E, sG145R, sE164D, sW172\* ve sW182\* verilebilir<sup>50,128,152</sup>. Tipik HBsAg kaçış mutasyonları, HBsAg'nin tanı testlerince saptanamamasına, HBIg ile korunmada başarısızlığa, aşı ile korunmada anti-HBs antikorlarında yetersizliğine yol açabilmektedir<sup>50,153</sup>. Hepatit B aşısı/ HBIg kaçığı mutasyonlarından G145R ve P120T mutasyonlarının LAM ile ilişkili direnç mutasyonları ile kombine halde bulunabildiği belirtilmektedir<sup>154</sup>. Ayrıca Türkiye' de KHB'li bir çocukta HBV aşı kaçığına neden olan sT143\* mutasyonu, KHB' li bir hasta ve ailesinde HBsAg kaçış mutasyonlarına neden olan sM125T ve sT127P mutasyonları ve HBV aşısı ile aşılınmamış bir hastada HBsAg tanı testinden kaçışa neden olan sS143L mutasyonu bildirimi yapılmıştır<sup>155,156,157</sup>. Çalışmamızda NA tedavisi alan üç hastada breakthrough gelişmiş olup bu hastalardan ikisinde yapılan analizlerde mutasyon saptanmadı. Bir hastada ise tedavinin birinci yılında breakthrough gelişmesi sonucunda yapılan analizlerde hepatit B aşısı/ HBIg kaçığı mutasyonlarından olan L126I mutasyonu saptandı (Tablo 11).

Türkiye' de, NA tedavisi altında (n=185) ve tedavi naif (n=142) KHB'li hastalarda yapılan geniş kapsamlı bir çalışmada 15 farklı HBsAg kaçış mutasyonu saptandığı (sY100C, sL109I, sI110V, sS117INST, sP120T, sP127T, sG130R, sS132A, sM133I, sY134N, sC137L, sC137G, sD144E, sG145X ve sG145R) bildirilmektedir<sup>127</sup>. Kümülatif olarak KHB'li hastalarda 27/327 (%8.3) oranında tipik HBsAg kaçış mutasyonlarının saptandığı ancak NA tedavisi ile tedavi naif hastalar arasında bir tipik HBsAg kaçış mutasyon prevalansı farkının bulunmadığı anlaşılmaktadır<sup>127</sup>. Bu veriler tipik HBsAg kaçış mutasyonlarının doğal olarak da gelişebildiğini gösterebilir. Türkiye'de hemodiyalize giren hastalarda yapılan bir diğer çalışmada tedavi naif KHB'li toplam 43/94 (%46) hastada tipik HBsAg kaçış mutasyonları saptandığı bildirilmektedir. Bu hastaların 18/43 (%18) oranında HBIg kaçış mutasyonu (sT118A/R, sP120K/Q/T, sT123A, sC124G, sQ129R, sM133L, sY134N, sD144E,

sG145E/K/R), 15/43 (%16) oranında HBV aşı kaçış mutasyonu (sP120S, sT126I, sM133L, sS143L, sD144E, sG145R, sS193L), 8/43 (%8.5) oranında HBsAg tanı testi kaçış mutasyonu (sP120S/T, sT131I, sM133T, sS143L) ve 31/43 (%33) oranında bağışık yanıt kaçağı mutasyonu (sY100C/S, sQ101H/R, sP105A/R, sL109R, sI110L, sS114A/T, sS117G/N, sG119I/R/V, sP120T, sT123A/D/N, sP127T, sA128V, sG130E/K/R, sT131N, sS132C/P, sY134F, sT140I, sS143T, sD144E, sG145R) tanımlanmıştır<sup>158</sup>. Çalışmamızda hastalardan tedavi öncesinde alınan serumlardan yapılan analizlerde 17/71 (%24) hastada tipik HBsAg kaçış mutasyonları saptandı. Çalışmamızda HBIg kaçağı mutasyonları T123N, T126I, P142S, P120T, G145R, G119R, C124, C139S, K141I, Q129H; hepatit B aşı kaçağı mutasyonları P142S, P120T, G130R, G145R, S143L, Q129H/R, L109R, T126I; tanı testi kaçağı mutasyonları R122K, T123N, T131N, P142S, P120T, G145R/L, G130R, M133T, S143L, Q129R, ve bağışık yanıt kaçış mutasyonları ise I110L, I110L, S132F, P120R olarak saptandı (Tablo 11). Bu paternin ülkemizde daha önce yapılmış çalışmalarla uyumlu olduğu anlaşılmaktadır<sup>153,159,160</sup>. Tanımlanan paternlerdeki farklılıklara rağmen NA almayan KHB'li hastalarda da tipik HBsAg kaçış mutasyonlarının bulunması bu türden mutasyonların hem NA tedavisi etkisiyle hem de HBV'nin doğal kinetiği nedeniyle oluşabildiğini düşündürmektedir.

Hepatit B virusunun sirküler yapısı nedeniyle (Şekil 3) pol geni (revers transkriptazı kodlar) ve S geni (HBsAg proteinini kodlar) üst üste çakışır durumdadır<sup>152</sup>. Bu çakışma (pol/S), gelişen primer/kompansatuvar ilaç direnci mutasyonlarının HBsAg proteinini kodlayan bölge üzerinde değişikliklere yol açmaktadır. Son yıllarda elde edilen bulgulara göre bu durum ADAPVEM oluşmasına yol açmaktadır. Öte yandan pol/S gen çakışması, HBV genomu üzerinde halk sağlığını doğrudan etkileyen kimi problemlere de neden olabilmektedir. Bunlara örnek olarak; I. HBV aşısı ile bağışıklık kazanmış kişilerde antiHBs antikorlarından kaçış mutasyonlarının oluşması, II. HBsAg tanı testinden kaçan HBV varyantlarının oluşması, III. HBIg'nin koruyuculuğundan kaçan varyantların oluşması verilebilir<sup>50</sup>. Türkiye' de KHB' li hastalarda yapılan bir çalışmada 6 tip ADAPVEM mutasyon motifi (sE164D, sI195M, sW196L, sW172L, sL175F, s176V) 10/94 (%10.6) tanımlanmıştır<sup>157</sup>. Ülkemizde KHB'li hastalarda yapılmış bir diğer geniş kapsamlı çalışmada yaklaşık 3 yıl boyunca takip edilen hastalarda 7 farklı ADAPVEM (rtM204V/ sI195M, rtM204I/sW196S, rtM204I/sW196L, rtV173L/sE164D, rtA181T/sW172\*, rtA181T/ sW172L ve rtA181V/ sL173F ) mutasyon motifi 46/442 (%24) saptanmıştır<sup>55</sup>. Bu çalışmada NA tedavisi altındaki ve tedavi naif hastalardaki ADAPVEM oranı sırasıyla 44/186 (%24), 2/256 (%0.79) olarak saptanmış ve bu durumun istatistiksel olarak anlamlı olduğu olduğu belirtilmiştir<sup>55</sup>. Bizim çalışmamızda ise naif dönemdeki iki hastada W196\*/L/S ve S193L olmak üzere toplam iki ADAPVEM mutasyon motifi saptandı. Bu bulgular NA tedavisinin ADAPVEM mutasyonlarına neden olabileceği gibi naif hastalarda da bu mutasyonların gelişebildiğini göstermektedir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

KHB infeksiyonun doğal seyri boyunca qHBsAg düzeyleri HBV DNA ile benzer şekilde immüntoleran dönemden, düşük replikatif faza doğru giderek azalma göstermektedir. Çalışmamızda literatürle benzer şekilde qHBsAg seviyelerinin HBeAg pozitif hastalarda HBeAg negatif hastalardan daha yüksek olduğu, en düşük değerlerin ise inaktif HBsAg taşıyıcılarında ise olduğu görüldü.

Çalışmamızda HBsAg düzeyleri ile virolojik ve histopatolojik bulguların ilişkisi incelendiğinde ileri fibrozu olan HBeAg pozitif hastalarda qHBsAg seviyelerinin daha düşük olduğu gözlemlendi. HBeAg negatif hasta grubunda ise fibroz skoru ile qHBsAg ve HBV DNA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı.

Son yıllarda yapılan birçok çalışmada HBV DNA ile serum qHBsAg düzeyleri arasında bir korelasyon olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızda tedavi alan hastaların tamamı ele alınarak yapılan korelasyon analizlerinde başlangıç qHBsAg ve HBV DNA seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı orta düzeyde bir korelasyon olduğu görüldü. İnaktif HBsAg taşıyıcılarında ise başlangıç qHBsAg ile HBV DNA seviyeleri arasında anlamlı bir korelasyon saptanmadı. Hastalar fibroz durumuna göre gruplandırıldığında ise düşük fibrozu olan hastalarda başlangıç qHBsAg ile HBV DNA arasında istatistiksel olarak anlamlı yüksek düzeyde bir ilişki olduğu görüldü. Yüksek fibrozu olan hastalarda ise başlangıç qHBsAg ile HBV DNA arasında istatistiksel olarak anlamlı orta düzeyde bir ilişki saptandı. Çalışmamızda tedavi alan hastalar HBeAg durumuna göre gruplandırıldığında hem HBeAg pozitif hem de HBeAg negatif hastalarda başlangıç qHBsAg ile HBV DNA değerleri arasında bir korelasyon saptanmazken tedavinin birinci yılı değerleri ile yapılan korelasyon analizlerinde ise HBeAg pozitif hasta grubunda qHBsAg ile HBV DNA arasında istatistiksel olarak anlamlı yüksek bir ilişki saptandı ( $r=0.736$ ,  $p=0.000$ ).

Çalışmamızda elde edilen sonuçlara göre ALT, qHBsAg ve HBV DNA değerlerinde tedavi ile bir yıl sonra istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu görülürken HBsAg (S/Co) değerlerinde tedavi ile bir azalma saptanmamıştır. Ayrıca çalışmamızda HBsAg (S/Co) ile qHBsAg ya da HBV DNA arasında bir korelasyon olmadığı da görülmüştür. Çalışmamızda HBsAg (S/Co) cinsinde olan değerlerinin tedaviyi izlemde kullanılamayacağı sonucuna varılmıştır.

Çalışmamızda tedaviye yanıt kriteri olarak qHBsAg değerinin  $<1500$  IU/mL kabul edildiğinde tedavinin üçüncü ayda peg-IFN grubunda dört hastada (%26,7) yanıt alınırken, TDF grubunda bir hastada (%5,9), ETV grubunda bir hastada (%6,7) ve LdT grubunda ise iki hastada (%25) yanıt alındı. Tedavinin birinci yılında ise yanıt alınan 11 hastanın altısı peg-IFN (%54,5) grubunda, biri TDF (%9,1), ikisi ETV (%18,2), ikisi LdT (%18,2) grubunda yer almaktaydı. Çalışmamızda peg-IFN tedavisi ile

qHBsAg seviyelerinde ki azalmanın daha hızlı olduğu ve daha yüksek oranda tedaviye yanıt alındığı görüldü. Peg-IFN grubunda tedavinin 12. haftasında HBsAg seviyesi <1500 IU/mL olan dört hasta HBeAg negatif grupta yer almaktaydı. Bu dört hastanın birinde tedavisi tamamlandıktan bir yıl sonra HBsAg kaybı olduğu görüldü. Çalışmamızda HBeAg negatif hastalarda peg-IFN tedavisine yanıt kriteri olarak qHBsAg seviyelerinin kullanılabileceği ancak bu konuyla ilgili daha çok çalışmanın yapılması gerektiği sonucuna varıldı.

Çalışmamızda inaktif HBsAg taşıyıcıları ile KHB hastalarını ayırmada serum qHBsAg düzeylerinin tanı koymadaki etkinliği ROC analizi ile test edildiğinde, qHBsAg'nin tanı koymadaki etkinliği iyi derecede, sensitivitesi %80 ve spesifitesi %76.92 olarak saptandı (p<0.0001). qHBsAg için cut off değeri bu analize göre 3092 IU/mL olarak belirlendi. Serum qHBsAg düzeylerinin inaktif HBsAg taşıyıcıları ile HBeAg negatif KHB hastalarını ayırmada ise yine benzer şekilde tanı koymadaki etkinliği iyi derecede, sensitivite %80 ve spesifite %69.2 saptandı (p<0.0001). qHBsAg için cut off değeri bu analize göre 2188 IU/mL olarak belirlendi.

HBV genotiplerinin coğrafik farklılıklar gösterdiği ve bulunduğu popülasyonlara bağlı olarak değişken olduğu bilinmektedir. Çalışmamıza dahil edilen tüm hastalarda literatürle benzer şekilde predominant olarak HBV genotip D saptandı. Yüksek oranda HBV subgenotip D1 olduğu ancak D2 ve D3 subgenotiplerin de görüldüğü saptandı. Ülkemizde HBV subgenotip D1 – D4 çeşitliliğine rastlanabilmesi nedeniyle HBV genotipleme yerine subgenotipleme ile hasta takibinin daha anlamlı olduğu sonucuna varılabilir.

Çalışmamızda naif dönemde hastalarda LdT ve LAM direncine neden olan M204I mutasyonu ile ADV direnci ve TDF için duyarlılığı azaltan N236T mutasyonu olmak üzere iki hastada primer ilaç direnci mutasyonu saptandı. Doğal olarak gelişen N236T mutasyonu saptanan hasta TDF tedavisi almakta iken tedavinin birinci yılında breakthrough gelişmesi sonucu yeniden HBV DNA sekanslama analizi yapıldığında hastada S geninde L126I mutasyonu saptandı. D2 subgenotipindeki bu hastada doğal gelişmiş TDF için duyarlılığı azaltıcı N236T mutasyonu saptanması, hastada tedavinin birinci yılında gelişen breakthrough açıklamakta ve tedavi öncesinde mutasyon analizi yapılmasının faydalı olabileceğini düşündürmektedir.

KHB tedavisinde kullanılan NA, HBV genomunun sirküler organizasyonundan dolayı S geninde tipik HBsAg kaçış mutasyonlarının oluşumuna yol açabilmektedirler. Çalışmamızda NA tedavisi alan hastalardan sadece üçünde breakthrough gelişmiş olup bu hastalardan ikisinde yapılan analizlerde mutasyon saptanmadı. Bir hastada ise tedavinin birinci yılında breakthrough gelişmesi sonucunda yapılan analizlerde hepatit B aşısı/ HBIg kaçığı mutasyonlarından olan L126I mutasyonu saptandı.

Çalışmamızda hastalardan tedavi öncesinde alınan serumlardan yapılan analizlerde 17/71 (%24) hastada tipik HBsAg kaçış mutasyonları saptandı. Naif

KHB'li hastalarda da tipik HBsAg kaçış mutasyonlarının bulunması bu türden mutasyonların hem NA tedavisi etkisiyle hem de HBV'nin doğal kinetiği nedeniyle oluşabildiğini düşündürmektedir. Yine naif dönemdeki iki hastada W196\*/L/S ve S193L olmak üzere toplam iki ADAPVEM mutasyon motifi saptandı. Bu bulgular NA tedavisinin ADAPVEM mutasyonlarına neden olabileceği gibi naif hastalarda da bu mutasyonların gelişebildiğini göstermektedir.





## 7. ÖZET

Hepatit B Virusu (HBV), yüksek replikasyon kapasitesinin olması ve ters transkripsiyon işleminde hata düzeltme yeteneğinin olmaması nedeniyle, yüksek mutasyon sıklığına sahip bir virustur. Tedavi öncesinde NA direnci ile ilişkili mutasyonlar meydana gelebileceği gibi, kronik hepatit B (KHB)'nin nükleoz(t)id analogları (NA) ile uzun süreli tedavisinde de antiviral ajana dirençten sorumlu mutasyonlar gelişebilmektedir. Günümüzde KHB infeksiyonunda antiviral tedaviye başlama kararı verilmesi, tedaviye yanıtın izlenmesi ve antiviral direnç saptamada pahalı ve deneyim gerektiren bir yöntem olan HBV DNA düzey tayini ile yapılmaktadır.

Bu çalışmada KHB tedavisinde kullanılan oral antivirallerin pol geni ve S geni üzerinde yaptığı mutasyonların araştırılması ve bu mutasyonların klinik ve epidemiyolojik öneminin saptanması, uzun dönemde ilaç direnci gelişiminin ve bunun yol açacağı sonuçların belirlenmesi amaçlanmıştır. İkincil olarak, kantitatif HBsAg (qHBsAg) titrelerinin ilaç direncini belirlemede erken bir marker olup olmadığının saptanması amaçlanmıştır.

Çalışma Kocaeli Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi'nde 2009 ile 2014 yılları arasında yapıldı. Çalışmaya KHB infeksiyonu olan naif 55 hasta ile 39 inaktif HBsAg taşıyıcısı olmak üzere toplam 94 hasta dahil edildi. Hastaların qHBsAg düzeyleri ile HBsAg (S/Co) ve HBV DNA düzeyleri takip edilerek korelasyon analizleri yapıldı. Tedavi öncesinde ve tedavi sırasında breakthrough gelişen hastalarda HBV DNA sekanslama analizi yapıldı.

Çalışmamızda HBsAg düzeyleri ile virolojik ve histopatolojik bulguların ilişkisi incelendiğinde ileri fibrozu olan HBeAg pozitif hastalarda qHBsAg seviyelerinin daha düşük olduğu gözlemlendi. Tedavi alan hastaların tamamı ele alınarak yapılan korelasyon analizlerinde başlangıç qHBsAg ve HBV DNA seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı orta düzeyde bir korelasyon olduğu görüldü. Hastalar fibroz durumuna göre gruplandırıldığında ise başlangıç qHBsAg ile HBV DNA arasında düşük fibrozu olan hastalarda yüksek düzeyde bir ilişki varken, yüksek fibrozu olan hastalarda ise orta düzeyde bir ilişki olduğu görüldü. Çalışmamızda peg-IFN tedavisi ile qHBsAg seviyelerinde ki azalmanın daha hızlı olduğu ve daha yüksek oranda tedaviye yanıt alındığı görüldü. İnaktif HBsAg taşıyıcıları ile HBeAg negatif KHB hastalarını ayırmada qHBsAg düzeylerinin tanı koymadaki etkinliğinin iyi derecede olduğu sonucuna varıldı, cut off değeri ise 2188 IU/mL olarak belirlendi. HBsAg (S/Co) cinsinde olan değerlerinin ise tedaviyi izlemde kullanılamayacağı sonucuna varıldı.

Yapılan analizlerde iki hastada naif dönemde primer ilaç direnci mutasyonu, iki hastada doğal gelişen ADAPVEM paterni saptandı. Çalışmamızda bu mutasyonların

NA tedavisine bağlı oluşabileceği gibi HBV'nin doğal kinetiği nedeniyle naif hastalarda da oluşabildiği sonucuna varıldı.

**Anahtar kelimeler:** Kantitatif HBsAg, kronik hepatit B, mutasyon, n¼kleoz(t)id analogları, polimeraz geni.



## 8. ABSTRACT

The Hepatitis B Virus (HBV) is a virus having high mutation frequency due to having a high replication capacity and not having error correction capability in reverse transcription. Mutations related to NA resistance can occur prior to the treatment and mutations responsible for the resistance to antiviral agents can develop in the long-term treatment of chronic hepatitis B (CHB) with nucleos(t)ide analogs (NA). Nowadays, the decision of starting antiviral treatment at CHB infections is given by HBV DNA level assay which is an expensive method requiring expertise on monitoring the response to the treatment and determining the antiviral resistance.

In this study, it is aimed to examine the mutations created by the oral antivirals used in CHB treatment on pol gene and S gene, to determine the clinical and epidemiological significance of these mutations, and to specify the development of drug resistance in long terms and the results it may cause. Secondly, it is aimed to determine whether the quantitative HBsAg (qHBsAg) titers are early markers for detecting drug resistance or not.

This study was carried out in Kocaeli University Medical Faculty Hospital between the years 2009 and 2014. 55 naive patients with CHB infection and 39 inactive HBsAg carriers, totally 94 patients, were included in the Study. Correlation analyses were performed with monitoring qHBsAg levels and HBsAg (S/Co) and HBV DNA levels of the patients. HBV DNA sequencing analysis was done at the patients developing breakthrough pre and during the treatment.

During our study, it was monitored that at HBeAg positive patients having severe fibrosis qHBsAg levels were lower when the relations of HBsAg levels and virological and histopathological findings were analyzed. It was seen that in the correlation analysis done by including all patients receiving the treatment, a statistically significant middle level correlation existed between the initial qHBsAg and HBV DNA levels. When the patients are grouped according to the state of fibrosis, it was seen that among the patients with low fibrosis score there was a relation at high level between the initial qHBsAg and HBV DNA, and there was a middle level relation among the patients with severe fibrosis. In the study, it was noted that the decrease in qHBsAg levels was faster with peg-IFN treatment and the response to the medical treatment was at a higher rate. It was concluded that the efficiency of qHBsAg levels on making diagnosis is at a good degree to distinguish inactive HBsAg carriers and HBeAg negative CHB patients, and the cutoff value was determined as 2188 IU/mL. It was concluded that values in terms of HBsAg (S/Co) cannot be used for monitoring the treatment.

In the analyses made, primer drug resistance mutation during the naive period was determined in two patients and naturally developed ADAPVEM pattern was determined in two patients. It was concluded in the study that these mutations can

develop in connection with NA treatment and that they can develop in naive patients due to the natural kinetics of the HBV.

**Key words:** Chronic hepatitis B, quantitative HBsAg, mutation, nucleos(t)ide analogs, polymerase gene



## 9. KAYNAKLAR

---

- 1 Thomas D, Zoulim F. New challenges in viral hepatitis. *Gut*.2012 May;61 suppl 1:i1-5.
- 2 Ott JJ, Stevens GA, Groeger J, Wiersma ST. Global epidemiology of hepatitis B virus infection: new estimates of age-specific HBsAg seroprevalence and endemicity. *Vaccine*. 2012 Mar 9;30(12):2212-9.
- 3 Tosun S. Hepatit B Aşılması ve Ülkemizde Hepatit Aşılama Sonuçları. Ed: Tabak F, Tosun S. *Viral Hepatit 2013*. 1. baskı. İstanbul, 2013:413-37.
- 4 Gish R.G. Hepatitis B treatment: Current best practices, avoiding resistance. *Cleveland Clinic Journal of Medicine* 2009;76(3):14-19.
- 5 Kim W, Benson J.T, Hindman A, et al. Decline in need for liver transplantation for end stage liver disease secondary to hepatitis B in the US. 58th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases 2007 Nov; Abs:12.
- 6 Liaw YF, Gane E, Leung N, et al: 2-year GLOBE trial results: Telbivudin is superior to lamivudine in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2009; 136:486-95.
- 7 Özkan H. Kronik Hepatit B Enfeksiyonunda Fazlar ve HBsAg kuantifikasyonunun Önemi. Ed: Tabak F, Tosun S. *Viral Hepatit 2013*. 1. baskı. İstanbul, 2013:295-9.
- 8 Harrison TJ. Hepatitis B virus: molecular virology and common mutants. *Semin Liver Dis* 2006; 26(2): 87-96.
- 9 European Association For The Study Of The Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol*. 2012; 57: p. 167-85.
- 10 Shaw T, Bartholomeusz A, Locarnini S. HBV drug resistance: mechanisms, detection, and interpretation. *J Hepatol* 2006; 44(3): 593-606
- 11 Clements CJ, Coghlan B, Creati M, et al. Global control of hepatitis B virus: does treatment-induced antigenic change affect immunization? *Bull World Health Organ* 2010; 88(1): 66-73.
- 12 Torresi J. The virological and clinical significans in the overlapping envelope and polymerase genes of hepatitis B virus. *J Clin Virol* 2002; 25: 97-106
- 13 Purcell RH. The discovery of the hepatitis viruses. *Gastroenterology* 1993;104: 955-63.
- 14 Mahoney FJ. Update on diagnosis, management, and prevention of Hepatitis B virus infection. *Clin Microbiol Rev*. 1999; 12(2): p. 351-66.
- 15 Vyas GN, Benedict Yen TS. Hepatitis B virus – Biology, pathogenesis epidemiology, clinical description, and diagnosis. In Specter S, editor. *Viral Hepatitis –Diagnosis Therapy, and Prevention*. New Jersey: Humana Press Inc.; 1999. p. 35-64.
- 16 Strauss JH, Strauss EG. *Viruses and Human Disease*, 2ed.Ed.,Oxford,UK: Elsevier Academic Press, 2008:249.
- 17 Horvat RT, Tegtmeier GE: Hepatitis B and D viruses. Eds: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller A, Tenover FC, Tenover FC. *Manual of Clinical Microbiology*. 8 th edition, Washington DC. ASM, 2003; 1464-94.

- 
- 18 Galibert F, Mandart E, Fitoussi F, Tiollais P, Charnay P. Nucleotide sequence of hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in E.coli. *Nature* 1979; 281(5733): 646-50.
- 19 Kimura T, Ohno N, Terada N, Rokuhara A, Matsumoto A, Yagi S, et al. Hepatitis B virus DNA negative Dane particles lack core protein but contain a 22-kDa precore protein without C terminal arginine-rich domain. *J Biol Chem* 2005; 280(23): 21713-9.
- 20 Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology. *Microb and Mol Bio Rev.* 2000;64: 51-68.
- 21 Kıyan M. Hepatit B virusu. İçinde: Balık İ, Tekeli E (editörler). *Viral Hepatit 2003. Viral Hepatit Savaşım Derneği Yayını 1. Baskı, Ankara 2003;86-118.*
- 22 Ustaçelebi Ş, Ergünay K. Hepatit B Virusunun Moleküler Virolojisi. Tabak F, Balık İ, Tekeli E (Eds). *Viral Hepatit İstanbul, Ohan Matbaası 2007: 96-107.*
- 23 Robinson WS. Hepadnaviridae: Hepatitis B virus and hepatitis delta virus. In Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE, editors. *Principles and Practice of Infectious Disease*. 5th ed. New York: Churchill Livingstone; 2000. p. 1652-85.
- 24 Zarski JP, Ganem D, Wright TL. Hepatitis B virus, pp: 623-57. In: Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG (eds), *Clinical Virology*. 2002, 2nd ed. Washington DC, USA
- 25 Locarnini S. Molecular virology of hepatitis B virus. *Semin Liver Dis* 2004; 24 (Supp1): 3-10.
- 26 Seeger C, Zoulim F, Mason WS. Hepadnaviruses, pp: 2977-3029. In: Knipe DM, Howley PM (eds), *Fields Virology*. 2007, 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- 27 Nassal M. Hepatitis B virus replication: novel roles for virus-host interactions. *Intervirology* 1999; 42(2-3): 100-16.
- 28 Koziel MJ, Siddiqui A. Hepatitis B virus and hepatitis delta virus, in Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Eds: Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practise of infectious disease, 6th ed Philedelphia: Churchill Livingstone, 2005:1864-1890.
- 29 Brown SE, Howard CR, Zuckerman AJ, Steward MW. Affinity of antibody responses in man to hepatitis B vaccine determined with synthetic peptides. *Lancet*. 1984; 2(8396): p. 184-187.
- 30 Milich D, Liang TJ. Exploring the biological basis of hepatitis B e antigen in hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2003; 38(5): 1075-86.
- 31 Hsia CC, Yuwen H, Tabor E. Hot spot mutations in hepatitis B virus X gene in hepatocellular carcinoma. *Lancet*. 1996; 348(9027): p. 625-626.
- 32 Chihara N, Arase Y, Suzuki F, et al. Prolonged hepatitis after acute infection with genotype H hepatitis B virus. *Intern Med* 2007; 46(22): 1847-51.
- 33 Kramvis A, Kew MC. Relationship of genotypes of hepatitis B virus to mutations, disease progression and response to antiviral therapy. *J Viral Hepat* 2005; 12(5): 456-64.
- 34 Kumagai I, Abe K, Oikawa T, et al. A male patient with severe acute hepatitis who was domestically infected with a genotype H hepatitis B virus in Iwate, Japan. *J Gastroenterol* 2007; 42(2): 168-75.
- 35 Ural O, Sayan M, Akhan S, Sümer Ş, Şimşek F. Türkiye'de İlk Saptanan Hepatit B Virus Genotip H Enfeksiyonu Olgusu. *Mikrobiyol Bul* 2013; 47(3): 550-5.
- 36 Valsamakis, A. Molecular Testing in the Diagnosis and Management of Chronic Hepatitis B. *Clinical Microbiology Rev.* 2007; 20: 426-439.

- 
- 37 Erhardt A, Reineke U, Blondin D. Mutations of the core promoter and response to interferon treatment in chronic replicative hepatitis B. *Hepatology*. 2000; 31(3): p. 716-25.
- 38 Kao JH, Wu NH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Hepatitis B genotypes and the response to interferon therapy. *J Hepatol*. 2000; 33(6): p. 998-1002.
- 39 Norder H, Courouce AM, Magnius LO. Molecular basis of hepatitis B virus serotype variations within the four major subtypes. *J Gen Virol*. 1992; 73(12): p. 3141-3145.
- 40 Guidotti LG, Chisari FV. Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. *Annu Rev Pathol* 2006; 1: 23-61.
- 41 Özacar T. Hepatit B virusu. Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M. 3. Baskı. Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri; 2008:1882-901.
- 42 Locarnini S, McMillan J, Bartholomeusz A. The hepatitis B virus and common mutants. *Semin Liver Dis*. 2003; 23(1): p. 5-20.
- 43 Jilbert AR, Burrell CJ, Triatni M, Kann M. Hepatitis B Virus replication. İn: Lai CL, Locarnini S (eds). *Hepatitis B Virus*, London: International Medical Press; 2002: 43-53.
- 44 Dandri M, et al. *Gut* 2012;61(Suppl 1):i6ei17.
- 45 Jazayeri SM, Alavian SM, Carman WF. Hepatitis B virus: origin and evolution. *J Viral Hepat* 2010; 17(4): 229-35
- 46 Carman W. Molecular variants of hepatitis B virus. *Clinics Lab Med* 1996;16: 907-28.
- 47 Tacke F, Gehrke C, Luedde T, Heim A, Manns MP, Trautwein C. Basal core promoter and precore mutations in the hepatitis B virus genome enhance replication efficacy of lamivudine resistant mutants. *J Virol* 2004; 78(16): 8524-35
- 48 Carman WF, Zanetti AR, Karayiannis P, Waters J, Manzillo G, Tanzi E, et al. Vaccine induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet* 1990; 336(8711): 325-9.
- 49 Pawlotsky JM. The concept of hepatitis B virus mutant escape. *J Clin Virol* 2005; 34(Suppl 1): 125-9.
- 50 Sheldon J, Rodes B, Zoulim F, Bartholomeusz A, Soriano V. Mutations affecting the replication capacity of the hepatitis B virus. *J Viral Hepat* 2006; 13(7): 427-34.
- 51 Bozkaya H: Hepatit B virus mutasyonlarının klinik ve tedavi açısından önemleri. Eds: Ökten A, Çakaloğlu Y. *Hepatit B Ulusal Uzlaşma Toplantı Metinleri*.1.baskı. İstanbul, 2003; 29-42.
- 52 Zoulim F, Locarnini S. Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues. *Gastroenterology* 2009; 137(5): 1593-608.
- 53 Warner N, Locarnini S, Kuiper M, Bartholomeusz A, Ayres A, Yuen L, Shaw T. The L80I substitution in the reverse transcriptase domain of the hepatitis B virus polymerase is associated with lamivudine resistance and enhanced viral replication in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51(7): 2285-92.
- 54 Sayan M, Buğdacı MS. Nükleoz(t)id Analogları Tedavisi Altında HBV Aşı Kaçağı Mutasyonları Gelişen Bir Kronik Hepatit B Olgusu. *Mikrobiyol Bul* 2013; 47(3):544-9.
- 55 Sayan M, Akhan SC. Antiviral drug-associated potential vaccine-escape HBV mutants in Turkish patients with chronic hepatitis B. *Int J Infect Dis* 2011; 15(10): e722-6.

- 
- 56 Lu HY, Zheng Z, Xu XY, Zhang NL. Mutations in surface and polymerase gene of chronic hepatitis B patients with coexisting HbsAg and anti-HBs. *World J Gastroenterol* 2006; July 14;12(26):4219-422.
- 57 Teo CG, Locarnini SA. Potential threat of drug-resistant and vaccine-escape HBV mutants to public health. *Antivir Ther* 2010; 15(3 Pt B): 445-9
- 58 Kay A, Zoulim F. Hepatitis B virus genetic variability and evolution. *Virus Research*,2007;127:164-176.
- 59 Uchida T, Saitoh T, Shinzawa H. Mutations of the X region of hepatitis B virus and their clinical implications. *Pathol Int* 1997; 47: 183-93.
- 60 Birengel S, Tekeli E. Kronik hepatitlerin epidemiyolojisi ve patofizyolojisi. In Köksal İ, Leblebicioğlu H, editors. *Kronik Hepatitlerin Tanı ve Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar*. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2009. p. 11-24.
- 61 Bilgic A, Ozacar T. Hepatit B virusu. In: Topcu AW, Soyletir G, Doğanay M (Eds.). *İnfeksiyon Hastalıkları Ve Mikrobiyolojisi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2002: 1350-1370
- 62 Taşyaran MA. HBV enfeksiyonu epidemiyolojisi. Tekeli E, Balık İ, (Ed.). *Viral Hepatit 2003*. İstanbul: Viral Hepatitle Savaşım Derneği, 2003: 121-134.
- 63 Huang CF, Lin SS, Ho YC, Chen FL, Yang CC. The immune response induced by hepatitis B virus principal antigens. *Cellular&Molecular Immunology* 2006; 3: 97-106.
- 64 Wieland SF, Chisari FV. Stealth and cunning: hepatitis B and hepatitis C viruses. *J Virol* 2005; 79(15): 9369-80.
- 65 Baumert TF, Thimme R, von Weizsäcker F. Pathogenesis of hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2007; 13(1): 82-90.
- 66 Guidotti LG, Chisari FV. Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 65-91.
- 67 Maini MK, Boni C, Lee CK, Larrubia JR, Reignat S, Ogg GS, et al. The role of virus specific CD8(+) cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis B virus infection. *J Exp Med* 2000; 191(8): 1269-80.
- 68 Rehmann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol* 2005; 5(3): 215-29.
- 69 Liang TJ. Hepatitis B: The virus and disease. *Hepatology* 2009; 49 (Suppl 5): 13-21.
- 70 Kidd-Ljunggren K, Miyakawa Y, Kidd AH. Genetic variability in hepatitis B viruses. *J Gen Virol* 2002; 83: 1267-80.
- 71 EASL Jury. EASL international consensus conference on hepatitis B. *J Hepatol* 2003; 38: 533-40.
- 72 Balcıoğlu İ, Özdemir S. Kronik hepatitli hastalarda nöropsikiyatrik bulgular. Tabak F, Balık İ, Tekeli E (Yazarlar) *Viral Hepatit 2005*, Ankara, Viral Hepatitle Savaşım Derneği, 2005;76-82.
- 73 Birengel S. Akut Viral Hepatit B'li Olguların klinik ve muhtemel bulaş yolları açısından değerlendirilmesi. *Viral Hepatit Dergisi* 2003;8: 148-51.
- 74 Nair S, Perrillo RP. Hepatitis B and D. In Zakım D, Boyer TD (eds). *A Textbook of Liver Disease*. USA: Elsevier Science, 2003; 2: 959-1016.



- 
- 75 Thompson A, Locarnini S, Visvanathan K: The natural history and the staging of chronic hepatitis B: time for reevaluation of the virus-host relationship based on molecular virology and immunopathogenesis considerations? *Gastroenterology*. 2007;133:1031-5.
- 76 Zanetti AR, Van Damme P, Shouval D. The global impact of vaccination against hepatitis B: a historical overview. *Vaccine* 2008; 26: 6266-73.
- 77 Al-Mahtab M, Rahman S, Akbar SMF, Kamal M, Khan MSI. Clinical use of liver biopsy for the diagnosis and management of inactive and asymptomatic hepatitis B virus carriers in Bangladesh. *J Med Virol* 2010; 82: 1350-4.
- 78 Gigi E, Lalla T, Orphanou E, Sinakos E, Vrettou E, Gigi MR. Long Term Follow-Up of a Large Cohort of Inactive HBsAg (+)/HBeAg (-)/ anti-HBe (+) Carriers in Greece. *J Gastrointest Liver Dis* 2007; 16: 19-22.
- 79 Sharma SK, Saini N, Chwla Y. Hepatitis B virus: Inactive carriers. *Virology* 2005; 2: 82.
- 80 Brunetto MR, Oliveri F, Coco B, et al. Outcome of anti-HBe positive chronic hepatitis B in alpha interferon treated and untreated patients: a long term cohort study. *J Hepatol* 2002;36: 263-270.
- 81 Hadziyannis S, Papatheodoridis GV. Hepatitis B e antigen negative chronic hepatitis: natural history and treatment *Semin Liver Dis* 2006;26: 130-141.
- 82 Chu CJ, Hussain M, Lok AS. Quantitative serum HBV DNA levels during different stages of chronic hepatitis B infection. *Hepatology*. 2002;36: 1408-15.
- 83 Torbenson M, Thomas DL. Occult hepatitis B. *Lancet Infect Dis*. 2002; 2(8): p. 479-86.
- 84 Chaudhuri V, Tayal R, Nayak B, Acharya SK, Panda SK. Occult hepatitis B virus infection in chronic liver disease: full length genome and analysis of mutant surface promoter. *Gastroenterology* 2004; 127(5): 1356-71.
- 85 Afyon M, Avcı İY, Ülçay A, Diktaş H. Occult Hepatitis B Virus Enfeksiyonu. *J Clin Anal Med* 2013;4(5): 435-9.
- 86 Hodinka RL. Laboratory diagnosis of viral hepatitis. In: Specter S. *Viral Hepatitis- Diagnosis, Therapy, and Prevention*. New Jersey: Humana Press; 1999:193.
- 87 Schildgen O. Acute and chronic hepatitis B - Diagnostic tests, pp: 113-8. In: Mauss S, Berg T, Rockstroh J, Sarrazin C, Wedemeyer H (eds), *Hepatology* 2009. Available from: [www.HepatologyTextbook.com](http://www.HepatologyTextbook.com)
- 88 Hatzakis A, Magiorkinis E, Haida C. HBV virological assessment. *J Hepatol* 2006; 44 (1 Suppl): S71-6.
- 89 Bowden S. Serological and molecular diagnosis. *Semin Liver Dis* 2006; 26(2): 97-103.
- 90 Ponde RA, Cardoso DD, Ferro MO. The underlying mechanisms for the „anti-HBc alone” serological profile. *Arch Virol* 2010; 155(2): 149-58.
- 91 Özsan M. HBV Enfeksiyonunda Mikrobiyolojik Tanı. İçinde, Tabak F, Balık İ, Tekeli E (Yazarlar). *Viral Hepatitis 2007, Viral Hepatitis Savaşımı Derneği Yayını İstanbul:2007; 124-34.*

- 
- 92 Keeffe EB, Dieterich DT, Han SH. A treatment algorithm for the management of chronic hepatitis B virus infection in the United States: 2008 update. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2008; **6**(12): p. 1315-41.
- 93 Kerr JR. Modern methods and their utility in clinical virology. *Infect Dis Rev* 2000;2: 2-4.
- 94 Valsamakis A. Molecular testing in the diagnosis and management of chronic hepatitis B. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20(3): 426-39.
- 95 Fung SK, Lok AS. Hepatitis B virus genotypes: do they play a role in the outcome of HBV infection? *Hepatology* 2004; 40(4): 790-2
- 96 Hadzakis A, Magiorkinis E, Haida C. HBV virological assesment, *J Hepatol*. 2006; 44: 71-6.
- 97 Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: 1292-305.
- 98 Sayınır AA. Tanı ve Tedavide Kullanılan Testler ve Standardizasyon (HBV DNA). İçinde, Çakaloğlu Y, Ökten A (Yazarlar). *Hepatit B Ulusal Uzlaşma Toplantı Metinleri*, İstanbul: İstanbul Medikal Yayıncılık, 2003; 43-55.
- 99 Hadziyannis S, Gerber MA, Vissoulis C, et al. Cytoplasmic hepatitis B antigen in "ground-glass" hepatocytes of carriers. *Arch Pathol*. 1973 Nov;96(5):327-30.
- 100 Alonso-Marti C, Moreno A, Barat A, et al. Co-existence of hepatocyte groundglass inclusions from several causes. *Histopathology*. 1990 Mar;16(3):304-7.
- 101 Özbay G. Kronik Viral Hepatitlerde Histopatoloji. Ed: Tabak F, Tosun S. *Viral Hepatit 2013*. 1. baskı. İstanbul, 2013:191-8.
- 102 Rodella A, Galli C, terlenghi L, perandin F, Bonfanti C, Manca N. Quantitative analysis of HBsAg, IgM anti-HBc and anti-HBc avidity i acute and chronic hepatitis B. *J Clin Virol*. 2006 Nov;37(3):206-12.
- 103 Beşışık F. HBV'e bağlı kronik hepatit tedavisinde antiviral direnci-klinik yaklaşım. Ed: Tabak F, Tosun S. *Viral Hepatit 2013*. 1. baskı. İstanbul, 2013:287-91.
- 104 Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B: update 2009 (AASLD). *Hepatology*. 2009; **50**(3): p. 661-2.
- 105 Akarca U, Balık İ, Örmeci N, ve ark. III. Viral hepatitin tanı ve tedavi rehberi. Ankara; Aralık 2011.
- 106 Lok ASF, McMahon BJ. Chronic hepatitis B: Update 2009, AASLD Practice Guidelines *Hepatology* 2009; 50: 1-38.
- 107 İlter T. ve ark. Klinik gastroenteroloji ve atlas cilt 1, İzmir Güven Kitabevi, 2011; 946-972, 1055-8.
- 108 Köksal İ, Leblebicioğlu H. Kronik hepatitlerin tanı ve tedavisinde güncel yaklaşımlar. Bilimsel tıp yayınevi: Ankara 2009;104-16.
- 109 Ghany M, Liang TJ. Drug targets and molecular mechanisms of drug resistance in chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2007; 132(4): 1574-85.
- 110 Liaw YF, Chien RN, Yeh CT et al. No benefit to continue lamivudine therapy after emergence of YMDD muations, *An*

- 
- 111 Lok AS, Lai CL, Leung N et al. Long-term safety of lamivudine treatment in patients with chronic hepatitis B, *Gastroenterology* 2003;125(6):1714-22. *tiviral Ther* 2004;9(2):257-62.
- 112 Yamazhan T. Kronik hepatit b tedavisinde güncel durum. *ANKEM Derg* 2011;25(Ek 2):234-7.
- 113 Fung SK, Chae HB, Fontana RJ et al. Virologic response and resistance to adefovir in patients with chronic hepatitis B, *J Hepatol* 2006;44(2):283-90.
- 114 Colonna R, Rose R, Pokornowski K et al. Four year assesment of ETV resistance in nucleoside naive and lamivudine refractory patients (Abstract), *J Hepatol* 2007;46(10):294.
- 115 Gish RG, Lok AS, Chang TT et al. Entecavir therapy for up to 96 weeks in patients with HBsAg positive chronic hepatitis B, *Gastroenterology* 2007;133(5):1437-44.
- 116 Van Bömmel E, Wünsche T, Schürmann D, Berg T. Tenofovir treatment in patients with lamivudine-resistant hepatitis B mutants strongly affects viral replication, *Hepatology* 2002;36(2):507-8.
- 117 Lai CL, Gane E, Liaw YF et al. Telbivudine versus lamivudine in patients with chronic hepatitis B, *N Engl J Med* 2007;357(25):2576-88.
- 118 Yim HJ, Hussain M, Liu Y. Evolution of multi-drug resistant hepatitis B virus during sequential therapy. *Hepatology*. 2006; **44**(3): p. 703-12.
- 119 Durantel D, Brunelle MN, Gros E, Durantel SC. Resistance of human hepatitis B virus to reverse transcriptase inhibitors: from genotypic to phenotypic testing. *J Clin Virol* 2005; 34: 34-43.
- 120 Zoulim F. Detection of hepatitis B virus resistance to antivirals. *J Clin Virol* 2001;21: 243-53.
- 121 Sablon E, Shapiro F. Advances in molecular diagnosis of HBV infection and drug resistance. *Int J Med Sci* 2005;2: 8-16.
- 122 Gutfreund KS, Williams M, George R, et al. Genotypic mutations of the hepatitis B virus polymerase associated with lamivudine resistance. *J Hepatol* 2000; 33: 469-75.
- 123 Stuyver L, Van Geyt C, Gent SD, et al. Line probe assay for monitoring drug resistance in hepatitis B virus infected patients during antiviral therapy. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 702-7.
- 124 Aberle SW, Kletzmayer J, Watschinger B, et al. Comparison of sequence analysis and the INNO-LiPA HBV DR line probe assay for detection of lamivudine resistant hepatitis B virus strains in patients under various clinical conditions. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 1972-4.
- 125 Whalley SA, Brown D, Teo CG et al. Monitoring the emergence of hepatitis B virus polymerase gene variants during lamivudine therapy using the Lightcycler. *J Clin Microbiol* 2001;39: 1456-9.
- 126 Zhang M, Gong Y, Osiowy C, et al. Rapid detection of hepatitis B virus mutations using Real-Time PCR and melting curve analysis. *Hepatology* 2002;36: 723-28.
- 127 Sayan M, Sentürk O, Akhan SÇ, Hülügü S, Cekmen MB. Monitoring of hepatitis B virus surface antigen escape mutations and concomitantly nucleos(t)ide analog resistance mutations in Turkish patients with chronic hepatitis B. *Int J Infect Dis* 2010; 14(3): 136-41.
- 128 Avellon A, Echevarria JM. Frequency of hepatitis B virus 'a' determinant variants in unselected Spanish chronic carriers. *J Med Virol* 2006; 78(1): 24-36.
- 129 Chan HL., Thompson A., Martinot-Peignoux M., et al., Hepatitis B surface antigen quantification: why and how to use it in 2011 - a core group report, *J Hepatol* 2011; 55: 1121-31.

- 
- 130 Sonneveld MJ., Zoutendijk R., Janssen HL., Hepatitis B surface antigen monitoring and management of chronic hepatitis B, *J Viral Hepat* 2011; 18: 449–57.
- 131 Liaw YF., Clinical utility of hepatitis B surface antigen quantitation in patients with chronic hepatitis B: a review, *Hepatology* 2011; 54: E1–9.
- 132 Hadziyannis EI., Hadziyannis SJ., Hepatitis B surface antigen quantification in chronic hepatitis B and its clinical utility, *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2014 Feb;8(2):185-95.
- 133 Chan HLY, Wong VWS. Serum hepatitis B surface antigen quantitation can reflect hepatitis B virus in the liver and predict treatment response. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2007;5:1462-8.
- 134 Lee JH, Kim SJ, Ahn SH, Lee J, Park Y, Kim HS et al. Correlation between quantitative serum HBsAg and HBV DNA test in Korean patients who showed high level of HBsAg. *J Clin Pathol.* 2010;63:1027–31.
- 135 Jaroszewicz J, Calle Serrano B, Wursthorn K, Deterding K, Schlue J, Raupach R, et al. Hepatitis B surface antigen (HBsAg) levels in the natural history of hepatitis B virus (HBV)-infection: a European perspective. *J Hepatol.* 2010;52:514–22.
- 136 Cheng PN1., Tsai HW., Chiu YC., Ho CH., Wu IC., Chang TT., Clinical significance of serum HBsAg levels and association with liver histology in HBeAg positive chronic hepatitis B, *J Clin Virol.* 2013 Aug;57(4):323-30.
- 137 Mani H, Kleiner DE. Liver biopsy findings in chronic hepatitis B. *Hepatology* 2009;49:61-71.
- 138 [Togo S](#), [Arai M](#), [Tawada A](#), [Chiba T](#), [Kanda T](#), [Fujiwara K](#) et al. Clinical importance of serum hepatitis B surface antigen levels in chronic hepatitis B. [J Viral Hepat.](#) 2011 Oct;18(10):e508-15.
- 139 Larsson SB1., Eilard A., Malmström S., Hannoun C., Dhillon AP., Norkrans G., Lindh M., HBsAg quantification for identification of liver disease in chronic hepatitis B virus carriers, *Liver Int.* 2013 Oct 1.
- 140 Brunetto MR, Oliveri F, Colombatto P, Moriconi F, Ciccorossi P, Coco B, et al. Hepatitis B surface antigen serum levels help to distinguish active from inactive hepatitis B virus genotype D carriers. *Gastroenterology.* 2010;139: 483–90.
- 141 Kayseto W, Ka-Ho Wong D et al. High hepatitis B surface antigen levels predict insignificant fibrosis in hepatitis B e antigen positive chronic hepatitis B. *Plos One.* 2012;126-30.
- 142 Sonneveld MJ, Hansen BE, Piratvisuth T, Jia JD, Zeuzem S, Gane E, Liaw YF, Xie Q, Heathcote EJ, Chan HL, Janssen HL. Response-guided peginterferon therapy in hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B using serum hepatitis B surface antigen levels. *Hepatology* 2013;58(3): 872-80.
- 143 Piratvisuth T, Marcellin P, Popescu M, Kapprell HP, Rothe V, Lu ZM. Hepatitis B surface antigen: association with sustained response to peginterferon alfa-2a in hepatitis B e antigen-positive patients. *Hepatology International* 2013;7(2): 429-36.
- 144 Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastrosoewignjo RI, Imai M, Miyakawa Y, Mayumi M. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol.* 1988;69(Pt 10):2575–2583. [PubMed]
- 145 Bozdayi AM, Aslan N, Bozdayi G, Tu'rkylmaz AR, Sengezer T, Wend U, et al. Molecular epidemiology of hepatitis B, C and D viruses in Turkish patients. *Arch Virol* 2004;149:2115–29.

- 
- 146 Ozdemir FT, Duman D, Ertem D, Avsar E, Eren F, Ozdogan O, et al. Determination of hepatitis B genotypes in patients with chronic hepatitis B virus infection in Turkey. *Turk J Gastroenterol* 2005;16:183-7.
- 147 Yalcin K, Degertekin H, Bahcecioglu IH, Demir A, Aladag M, Yildirim B, Horasanli S, Ciftci S, Badur S. 2004. Hepatitis B virus genotype D prevails in patients with persistently.
- 148 Sayan M, Dogan C. Genotype/subgenotype distribution of hepatitis B virus among hemodialysis patients with chronic hepatitis B. *Annals of Hepatology* 2012;11(6):849-54.
- 149 Warner N, Locarnini S. Can antiviral therapy for chronic hepatitis B enhance the progression to hepatocellular carcinoma? *Antiviral Therapy* 2009; 14:139-42.
- 150 Yeh C-T, Shen C-H, Tai D-I, Chu C-M, Liaw Y-F. Identification and characterization of a prevalent hepatitis B virus X protein mutant in Taiwanese patients with hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2000; 19(46).
- 151 Li L, Liu W, Chen Yh, Fan CL, Dong PL, Wei FL, Li B, Chen Li et al. Antiviral drug resistance increases hepatocellular carcinoma: A prospective decompensated cirrhosis cohort study. *World J Gastroenterol* 2013 December 7; 19(45):8373-81.
- 152 Locarnini S. Primary resistance, multidrug resistance, and cross-resistance pathways in HBV as a consequence of treatment failure. *Hepatology International* 2008 Jun; 2(2):147-51.
- 153 Weber B. Genetic variability of the S gene of hepatitis B virus: clinical and diagnostic impact. *J Clin Virol* 2005; 32: 102-12.
- 154 Bock C, Tillmann H, Torresi J, Klempnauer J, Locarnini S, Manns MP, et al. The hepatitis B virus polymerase mutants with enhanced replication by lamivudine treatment after liver transplantation. *Gastroenterology* 2002; 122: 264-73.
- 155 Kutlu T, Soycan LY, Karataylı E, Turkyılmaz AR, Yurdaydın C, Bozdayı M. The first identified hepatitis B virus vaccine escape mutation in Turkey. Letter to the Editor. *J Clin Virol* 2006; 35: 201-2.
- 156 Ozaslan M, Ozaslan E, Barsgan A, Koruk M. Mutations in the S gene region of hepatitis B virus genotype D in Turkish patients. *J Genetics* 2007; 86:195-201.
- 157 Sayiner AA, Agca H, Sengonul A, Celik A, Akarsu M. A new hepatitis B virus vaccine escape mutation in a renal transplant recipient. *J Clin Virol* 2007; 38: 157-60.
- 158 Sayan M, Cavdar C, Dogan C. Naturally occurring polymerase and surface gene variants of hepatitis B virus in Turkish hemodialysis patients with chronic hepatitis B. *Jpn. J. Infect. Dis* 2012; 65: 495-501.
- 159 Sayan M, Akhan SC, Meric M. Naturally occurring amino-acid substitutions to nucleos(t)ide analogues in treatment naïve Turkish patients with chronic hepatitis B. *Journal of Viral Hepatitis*, 2010; 17: 23-7.
- 160 Pei F, Ning JY, You JF et al. YMDD variants of HBV DNA polymerase gene: rapid detection and clinicopathological analysis with long-term lamivudine therapy after liver transplantation. *World J Gastroenterol* 2005; 11(18): 2714-9.