

HBeAg NEGATİF, ANTI-HBe POZİTİF KRONİK HEPATİT B OLGULARINDA PREKOR/KOR BÖLGE MUTASYONLARININ VE GENOTİP DAĞILIMLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

DETERMINATION OF GENOTYPE DISTRIBUTION AND PRECORE/CORE REGION MUTATIONS IN HBeAg NEGATIVE, ANTI-HBe POSITIVE CHRONIC HEPATITIS B CASES

Uğur ARSLAN¹, İnci TUNCER¹, Duygu FINDIK¹, Onur URAL²

Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi, Konya

¹ Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

² İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Bakteriyoloji Anabilim Dalı

Anahtar Sözcükler: Hepatit B virus, DNA, prekor/kor, mutasyon

Keywords: Hepatitis B virus, DNA, precore/core, mutation

Geliş: 18 Ocak 2008

Kabul: 04 Ağustos 2008

ÖZET

Son yıllarda viral replikasyon kaybı olmaksızın anti-HBe serokonversiyonu gösteren bazı hastalardan izole edilen Hepatit B Virus (HBV) DNA'ların incelenmesi ile prekor/kor geni üzerindeki mutasyonların varlığı ortaya konmuştur. Bu çalışmada anti-HBe ve HBV DNA pozitifliği saptanan hastalarda prekor ve kor bölgesindeki mutasyonlar ile HBV genotip profili arasındaki ilişkinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Hastaların serum örneklerinde HBV DNA düzeyleri gerçek zamanlı PCR yöntemi araştırıldı. Hepatit B virus DNA pozitifliği saptanan örneklerdeki prekor/kor mutasyonları genomun prekor/kor bölgesinin sekans analizleri yapılarak incelendi. Yüz hastaya ait anti-HBe pozitif kronik B hepatitli hastalara ait serum örneğinin 51'inde HBV DNA pozitif bulundu. Hepatit B virus DNA pozitif örneklerde HBV DNA miktarı ise ortalama 4.5×10^7 kopye/mL idi. Olguların tamamında HBV genotipi (%100) genotip D olarak tanımlandı. DNA Sequencing Analysis Software ile yapılan analizde HBV DNA dizilerinin hiçbirinde prekor/kor mutasyonu saptanmadı. Bu sonuçlar, olgularımızın hepsinin D genotipine ait HBV wild (sokak) tip ile infekte olduğunu ve elde edilen HBV DNA viral yük miktarının da bu tipe ait olduğunu göstermektedir. Hepatit B virusunun replikasyon hızı ve kronik HBV enfeksiyonunda HBe oluşumunun kontrolünde önemli rol oynayan prekor ve kor bölgesindeki mutasyonların daha geniş kapsamlı (çok merkezli) ve daha fazla olgu ile araştırılması gerektiği düşünülmektedir.

SUMMARY

In recent years with the investigation of HBV DNA isolated from patients showing anti-HBe seroconversion without the loss of viral replication revealed precore/core gene mutations. In this study, we aimed at investigating the relationship between precore/core mutations and HBV genotype profile in anti-HBe and HBV DNA positive patients. In the sera of these patients HBV DNA levels were investigated by Real-Time PCR method. In the HBV DNA positive specimens precore/core mutations were detected by sequence analysis. Of the 100 anti-HBe positive chronic hepatitis B patients' serum samples HBV DNA was found positive in 51. The median HBV DNA viral load was 4.5×10^7 copies/mL in HBV DNA positive specimens. All of the HBV (100%) genotyped was found in genotype D. There were no precore/core mutations by using DNA Sequencing Analysis Software. These results show that all patients investigated in this study were infected with wild-type HBV and the viral loads obtained belonged to the wild-type HBV virus. Multicenter studies with more cases are needed to investigate the precore/core mutations which play an important role in the replication rate of HBV and in the control of the HBe production in chronic HBV infections.

GİRİŞ

Hepatit B virusu (HBV)'nin neden olduğu infeksiyon, özellikle gelişmekte olan ülkelerde önemli bir sağlık ve ekonomik sorundur (1). Hepatit B virusu tipik bir non-sitopatik virustur, immün sistem aracılı doku hasarı ve hepatosit ölümüne neden olabilir (2). *Hepadnaviridae* ailesinde yer alan HBV, ailenin diğer üyeleri içinde insanlarda infeksiyon oluşturan tek türdür. Ayrıca 'revers transkriptaz' enzimi sayesinde, RNA aracılı replike olan tek DNA virusudur. 'Revers transkripsiyon' ile çoğalma sırasında viral genomda mutasyonlar oluşmakta ve böylece çeşitli mutasyonlar içeren HBV alt-türleri ortaya çıkmaktadır. Bu mutasyonlardan bazıları virus tahrip edici olmakla birlikte, bazıları da virusun yaşamı ile uyumludur. Bu mutasyonların çoğu fonksiyonel olarak belirgin değişikliklere yol açmamakla birlikte, bazıları üst üste binen genler ve onların translasyonel ürünlerinde değişikliklere neden olabilmektedir. Son yıllarda ortaya konan bu HBV mutasyonları klinik ve tanısal olarak gösterdikleri değişikliklerden dolayı ilgi çekmiştir. Hepatit B virusunda ilk saptanan ve üzerinde en çok durulan mutasyonlar prekor/kor mutasyonlarıdır (3). Bu mutasyonlar HBeAg ekspresyonunu azaltan ya da bloke eden mutasyonlardır. Prekor mutasyonları prekor gen bölgesinde (c1814 - c1901 sıralı nükleotitler) translasyonel stop-kodon mutasyonu sonucu meydana gelmektedir. Prekor genini epsilon (ϵ) yapısında iken 1896 sıralı nükleotitte tek baz değişimi ile TGG, TAG'ye dönüşür ve TAG stop-codon fonksiyonunu üstlenir. Böylece HBeAg üretimi baskılanır. Nükleotit (nt) c1896 halka oluşumunda c1858 ile baz çifti oluşturur ve viral replikasyonda kritik öneme sahiptir. Nükleotit 1896 sayılı amino asit düzeyinde oluşan bu mutasyon kronik karaciğer hastalığının inaktivasyonuna katkı sağlamaktadır. Diğer bir mutasyon grubu olan kor mutasyonu, c1742 - c1849 nükleotit grubunu içeren bazal core promoter'i (BCP) etkilemekte ve transkripsiyonel prekor ve kor mRNA azalmasına neden olmaktadır. Kor mutasyonları çoğunlukla c1762 (A-T) (cA1762T) ve c1764 (G-A) (cG1764A) şeklinde olmaktadır ve genotipler ile yakın ilişkilidir. Bu mutasyonlar genotip A, B ve C'de sık görülür iken diğer genotiplerde henüz tanımlanmamıştır. Her iki noktada (nt1762/nt1764) mutasyonun birlikte olması viral yükü artırırken, HBeAg üretimini azaltmaktadır. Ancak HBeAg üretimini tamamen durdurmamaktadır (4).

Bu çalışmada viral replikasyon kaybı olmaksızın anti-HBe serokonversiyonu gösteren hastalarda, HBV'nin replikasyon hızı ve kronik HBV infeksiyonunda HBe

oluşumunun kontrolünde önemli rol oynayan prekor ve kor bölgesindeki mutasyonlar ile HBV genotip profili arasındaki ilişkinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

A) Serum örneklerinin toplanması: Çalışmaya HBsAg ve anti-HBe pozitif olup, HBeAg negatifliği saptanan kronik B hepatitli 100 hasta alındı. Hasta serumlarında HBsAg, anti-HBe ve HBeAg varlığı üretici firma kitleri (Dade Behring, Almanya) kullanılarak mikro ELISA yöntemi ile araştırıldı. Seçilen serum örnekleri araştırma başlayana kadar -65° C'de derin dondurucuda saklandı.

B) Gerçek zamanlı (real-time) polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction=PCR) yöntemi ile viral yük miktarının saptanması: HBV DNA'nın eldesi için ekstraksiyon kiti (Invisorb, Instant Spin DNA/RNA Virus Mini Kit, Almanya) kullanılarak, kitte belirtilen protokole göre yapıldı. Örnek serumlarından elde edilen HBV DNA'nın viral yük tayini Taq Man (Roboscreen, Almanya) prosedürüne göre gerçek zamanlı PCR tekniği uygulanarak araştırıldı. Gerçek zamanlı PCR için 5 μ L'si örneğe ait olmak üzere toplam hacim 25 μ L olacak şekilde karışım hazırlandı. Standartlar 2×10^8 , 2×10^7 , 2×10^6 , 5×10^5 , 2×10^5 , 5×10^4 , 1×10^4 ve 2×10^3 kopya/mL olmak üzere sekiz tane standart kullanıldı. Viral yük ABI PRISM 7700 Sequence Detector cihazında Real-Time PCR ile saptandı. Çalışmada cihaz Stage 1 (hold)'de 95° C'de 10 dakikalık tek bir döngüden sonra Stage 2'de (Cycle) 95° C'de 15 sn. ve 59° C'de 1 dak. olmak üzere 40 kez döngü yapıldı. Döngü sonunda sonuçlar standartların siklus sayısı ile birlikte artan floresan ışığa göre çizilen logaritmik eğriye göre değerlendirildi. Eğride 1×10^3 kopya/mL ve altındaki değerler negatif olarak kabul edildi.

C) Nested PCR ile DNA amplifikasyonu: HBV genotiplendirme ve prekor/kor mutasyonu için Nested PCR yöntemi kullanıldı. Nested PCR, iki aşamalı bir amplifikasyon yöntemidir. İlk PCR sonucu elde edilen ürünler ikinci PCR için kalıp DNA olarak kullanılır. PCR'da S bölgesine yönelik kendi dizaynımız olan pol1 (5'-CACCTGCAGCCTCATTTTGTGGGTCACCATA-3') ve pol2 (5'-ATTGGAAAGTCTGTCAACGTATTGTG-3) dış primerleri ve OP1 (5'-CTGCGCTGAACATGGAGAAC-3') ve NP2 (5'-CCTTTTACCCTGTTACCA-3) iç primerleri Nested PCR analizi için kullanıldı. Primerler ticari bir kaynaktan (Makro Sağlık A.Ş) elde edildi. İlk amplifikasyon 50 μ L'lik reaksiyon hacminde gerçekleştirilmiş olup reaksiyon karışım örneği; 10 μ L genomik DNA, 25 pmol

pol1 ve pol2 primerleri, 2mM dNTP, 25mM MgCl₂, 10X PCR buffer ve 1 ünite Taq DNA polimeraz olacak şekilde düzenlendi. Birinci tur PCR reaksiyonu için program, 94° C'de 5 dak. bekletildikten sonra bir siklusu 94° C'de 1 dak., 45° C'de 2 dak. ve 72° C'de 2 dak. olmak üzere toplam 35 döngü yapıp 72° C'de 7 dak. Gene Amp 9700 PCR (Applied Biosystems, ABD) cihazı ile istenilen ürün amplifiye edildi. İkinci tur PCR reaksiyonu için ilk PCR reaksiyonundan elde edilen üründen 3 µL alınarak reaksiyon karışımı hazırlandı ve 94° C'de 5 dak. bekletildikten sonra bir siklusu 94° C'de 1 dak., 55° C'de 2 dak. ve 72° C'de 90 sn. olmak üzere toplam 35 siklus yapıp 72° C'de 7 dak. olacak şekilde PCR programı uygulanarak S gen fragmenti amplifiye edildi. Amplifiye edilmiş PCR ürünlerinin her birinden 10 µL alınıp etidyum bromür (0.5 µg/mL) ile boyanmış %1'lik agaroz jele yüklendi. Daha sonra agaroz jel elektroforezi gerçekleştirildi. Polimeraz zincir reaksiyonu sonrası pürifikasyon için Invisorb Spin PCRapid Kiti (Almanya) kullanıldı.

D) Cycle Sequencing PCR: Nested PCR reaksiyonu ile çoğaltılan ve pürifiye edilen DNA floresan işaretli dideoksinükleotitler içeren BigDye Terminatör v3.1 Cycle Sequencing Kiti (Applied Biosystems, Foster City, CA, ABD) kullanılarak CycleSequence PCR'ı yapıldı.

PCR reaksiyonu: 8 µL Ready Reakction Miks, 0.5 µL(3.2 pmol) Sequencing Primer, 6 µL ddH₂O, 4 µL PCR ürünü kullanılarak 96° C'de 10 sn. denatürasyon, 50° C'de 5 sn. bağlanma ve 60° C'de 4 dak. uzama reaksiyonlarını içeren 25 döngü olarak gerçekleştirildi. Cycle sequencing pürifikasyonu 50 µL %95'lik etanol, 2 µL (pH:4.6) NaAC/EDTA ve 10 µL ddH₂O kullanılarak yapıldı. Kurutulan örnekler, örnek başına 20 µL formamit eklenerek ABI PRISM 310 Genetic Analyzer cihazında (PE Biosystems, Foster City, CA, ABD) 47 cm'lik kapillerde 50° C'de 36 dak. elektroforez işlemi gerçekleştirildi. Toplanan veriler Molecular Evolutiona Genetics Analysis 2.1 (MEGA 2.1) bilgisayar programı kullanılarak DNA dizilerinin genotip tayini ve prekor/kor mutasyon analizi değerlendirildi.

BULGULAR

HBsAg ve anti-HBe pozitif olup, HBeAg negatifliği saptanan kronik B hepatitli 100 hastaya ait hastaların serum örneklerinin 51'inde HBV DNA düzeyi pozitif saptanmıştır. Araştırmaya alınan serum örneklerinde en düşük HBV DNA düzeyi 2×10^2 kopya/mL ve en yüksek 1.1×10^9 kopya/mL olarak bulunmuştur. Ellibir örneğe ait ortalama HBV DNA miktarı ise 4.5×10^7 kopya/mL'dir.

Çalışmada elde edilen HBV DNA dizilerinde prekor/kor mutasyon varlığını araştırmak için DNA Sequencing Analysis Software ile analiz edilerek değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonucunda hem düşük viral yüke sahip hem de yüksek viral yüke sahip hastalara ait örneklerde prekor mutasyonları için 1896. ve 1899. kodonlarda herhangi bir mutasyon saptanmamıştır. Kor mutasyonu için önem taşıyan 1762-8. kodonlarda da mutasyon belirlenememiştir.

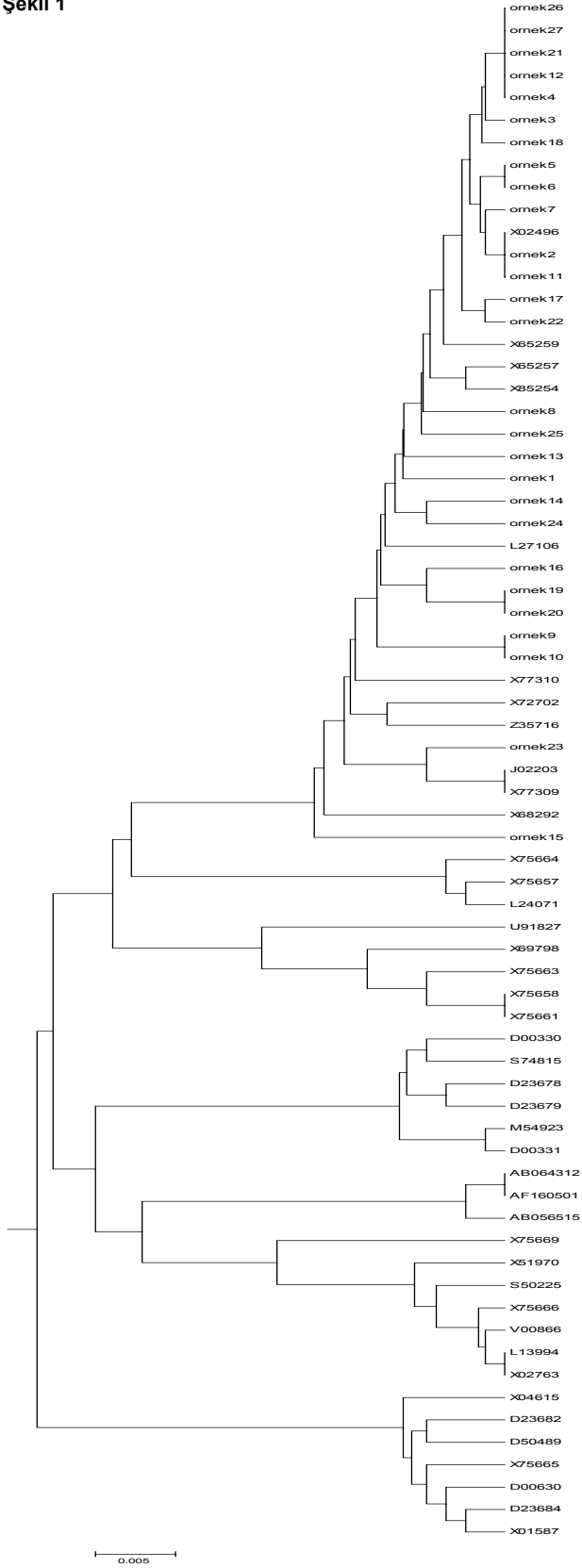
GenBank'tan sağlanan genotipleri belli HBV DNA dizileri ile bu çalışmada elde edilen hizalanmış dizilerden MEGA versiyon 2.1 yazılımı kullanılarak filogenetik ağaç oluşturulmuştur (Şekil 1 ve 2). Filogenetik analiz sonucunda incelenen 51 örneğin tamamı (%100) genotip D bulunmuştur.

TARTIŞMA

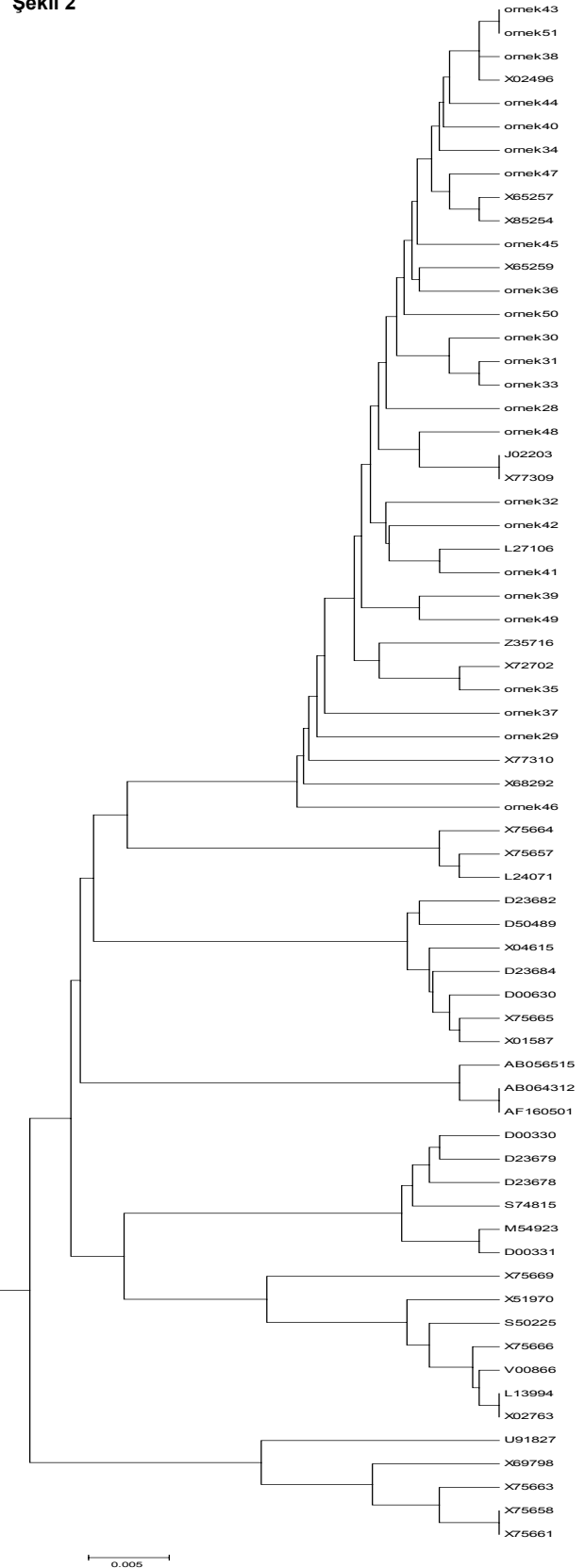
Hepatit B virusunda genetik değişimlerin HBV infeksiyonunun doğal seyrinde önemli rol oynadığı ve ilerlemesine katkıda bulunduğu inanılmaktadır. Mutant suşlar kronikleşmede, hepato-karsinogenezde, fulminan hepatit gelişmesinde veya asemptomatik seyrinde önemli rol oynayabilir. Hepatit B virus yüzey antijen varyantlarının klinik önemi, birkaç çalışmada vurgulanmıştır (3). Çin'de Du ve ark. (5) kor bölgesindeki nt1762/1764 mutasyonlarının HBV kronikleşmesinde önemli rol oynadıklarını bildirmişlerdir. İki farklı çalışmada (6, 7) ise prekor stop kodon mutantlarıyla infekte sirozlu hastalarda karaciğer transplantasyonu sonrası B hepatiti rekürrensi ve buna bağlı graft kaybı, sokak tipi ile infekte olanlara göre daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Chu ve ark. (8) yaptıkları çalışmada, prekor mutasyonların kronik hepatit B'li HBeAg pozitif hastalarda olma olasılığının yüksek olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca çalışmada prekor mutant oranının anti-HBe ve serum ALT düzeyleri ile uyumlu olduğu ve yüksek prekor mutasyon oranının anti-HBe serokonversiyonu sonrası gelişen persistant hepatitle birlikte siroz riskinin yüksek olduğu bildirilmiştir (8). Fakat bugün için henüz HBeAg negatif mutantlar ile hastalığın kliniği arasında ilişki tam olarak anlaşılamamıştır. Muhtemelen HBeAg'ninin immün hedef antijen olma özelliği ve immün toleransa olan etkisi ile arasındaki denge hastalığın aktivitesini belirlemektedir. Hastalığın başlangıç evrelerinde tamamıyla HBeAg pozitif suşların varlığında immün toleranstan dolayı genellikle hastalık aktivitesi azdır. Bu dönemde karaciğer hasarı olmadığından transaminaz düzeyleri düşük kalmaktadır. Buna karşın sokak tipin temizlendiği HBeAg

Şekil 1



Şekil 2



Şekil 1 ve Şekil 2. Hepatit B virus S bölgesine ait dizilerin filogenetik ağacı . Referans diziler Gen-Bank erişim numaraları ile, bu çalışmada elde edilenler "örnek" ön eki ile gösterilmiştir.

negatif mutantların hakim olduğu dönemde ve HBeAg pozitif virüslerdeki replikasyon artışları dönemlerinde, zeminde immün tolerojen bu maddenin bulunmaması, fakat HBeAg'nin hepatositlerin yüzeyinde salınması yeni bir immün saldırıya neden olmaktadır. Bu saldırının arkasından HBeAg negatif virüsler var olmaya devam etmekte ve tüm populasyona hakim olduğunda hastalık genellikle inaktif veya hafif transaminaz yüksekliği ile seyretmeye devam etmektedir (9).

1980'li yıllarda prekor stop kodon mutasyonlu virus ile infeksiyonun Akdeniz ülkeleri (Yunanistan, İsrail ve İtalya'da %50-80) ve Uzak Doğu'yla (Hong Kong, Taiwan ve Japonya'da %40-55) sınırlı olduğuna inanılıyordu (10). Bu HBV'nun genotiplerinin coğrafik dağılımının farklılığı ile ilişkilendirilmiştir. Çünkü prekor stop kodon mutasyonu ancak virus genomunun 1858. nükleotidinde timin bulunan genotiplerde (genotip C ve D) meydana gelebilmektedir. Buna karşılık, aynı numaralı nükleotit de yani virus genomunun 1858. nükleotidinde sitozin bulunduran genotip A'da C1858T mutasyonu olmadıkça hiçbir zaman stop kodon mutasyonu meydana gelmemektedir. Genotip A'da eğer stop kodon mutasyonu meydana gelirse C1858 ile G1896 arasındaki varolan baz eşleşmesinin kırılması gerekmektedir. Bu da sekonder yapının stabilitesini bozmakta ve virus için avantaj kaybına neden olmaktadır. Halbuki 1858'de T bulunduran genotip C ve D'de G1896A mutasyonu iki nükleotit arasındaki baz eşleşmesini sağlayıp yapıyı daha stabil hale getirmektedir (11).

Bu konuda yapılan çalışmaların artması ile prekor mutantlara bağlı HBV infeksiyonunun geniş bir coğrafik dağılıma sahip olduğu anlaşılmıştır (10). Brezilya'da Rezende ve ark. (10) yaptıkları çalışmada, 50 kronik B hepatit'li iki grup hastada, HBeAg pozitif hasta grubunun %4.8'inde ve HBeAg negatif hasta grubunun %58.6'sında prekor mutasyonu bulmuşlardır. Hastaların %56.5'i genotip D, %41.3'ü genotip A ve %2.2'si genotip F olarak sınıflandırılmış ve ayrıca prekor mutasyonun karaciğer hasarı ile ilişkili olduğu saptanmıştır (10). Vietnam'da Huy ve ark. (12) 39 akut ve 76 kronik hepatit B'li hastayla yaptıkları çalışmada; kor mutasyon oranını %38.4 ve prekor mutasyon oranını %25.6, kronik grupta ise bu oranları, sırasıyla, %61.7 ve %32.8 olarak bulmuşlardır. Çalışmada akut grubun %74.3'ünü genotip B ve kronik grubun ise %51.3 genotip B saptamışlardır (12). Singapur'da 776 hastada yapılan geniş kapsamlı bir epidemiyolojik çalışmada (13), en yaygın HBV genotipleri, genotip B (%32.5) ve genotip C (%62.5) olarak saptanmış ve genotipler arasında HBV DNA viral

yük miktarı arasında farklılık olmadığını gösterilmiştir. Aynı çalışmada (13), ayrıca genotip B'lerin %38.6'sında kor ve %83.6'sında ise prekor mutasyonu, genotip C'de ise bu oranları, sırasıyla, %87.9 ve %29.1 olarak saptamışlardır. Yuen ve ark. (14) anti-HBe pozitif kronik hepatit B'li Çinli hastalarda prekor mutasyon oranını HBeAg pozitif olanlara göre daha yüksek bulmuşlardır (sırasıyla, %56.5 ve %44.2). Çalışmadaki ortalama HBV DNA viral yük miktarı ise 1.5×10^6 olarak saptanmıştır (14). Sitnik ve ark. (15) 103 hasta üzerinde yaptıkları genotiplendirme çalışmasında; genotip A, B, C, D ve F oranlarını, sırasıyla, %49.5, %2.9, %13.6, %24.3 ve %9.7 olarak, ayrıca çalışmada prekor mutasyon oranını ise %31.7 bulmuşlardır. Hepatit B virus genotip dağılımı aynı ülkede bölgeler arasında da farklılıklar göstermektedir. Örneğin, Yuan ve ark. (16) yaptıkları çalışmada; HBV genotip dağılımında Kuzey Çin'de %78 oranında C₂ subgenotipi saptamışlar, buna karşılık Güney Çin'de %73 oranında B₂ subgenotipi bulmuşlardır. Araştırmacılar ayrıca C₁ subgenotipi HBV ile infekte kişilerde bazal kor promotor bölgede T1762/A1764 mutasyonu ile birlikte V1753 mutasyonu eşlik ettiği takdirde hepatoselüler karsinom gelişme riski ile ilişkilendirmişlerdir (16).

Araştırmamızdaki tüm olgulara ait HBV'ler genotip D olarak sınıflandırıldı. Olgularımızda A, B, C, E, F, G ve H genotipleri saptanamadı. Ayrıca 51 olgunun hiç birinde prekor/kor mutant bulunmadı. Ülkemizde Bozdayı ve ark. (17) 67 HBV infekte kişi ile yaptıkları çalışmada, olguların hepsinde (%100) HBV genotip D saptamışlardır. Serin ve ark. (18) çalışmalarında, olguların %94'ünü genotip D ve %6'sını genotip D'nin alt grubu olarak bulmuşlardır. Yine ülkemizden Sünbül ve Leblebicioğlu (19)'nun yaptığı çalışmada, olgularının %88.7'sini genotip D ve geri kalanını ise yine D'nin alt grubu olarak sınıflandırılmıştır. Onganer ve ark. (20) 50 hastanın genotiplendirmesinde olguların %84'ünde genotip D, %12'sinde genotip A ve %4'ünde genotip F bulmuşlar ve olguların %61'inde 1858 (sitozin-timin değişimi) mutasyonu ve %2'sinde 1896 (guanin-adenin değişimi) prekor mutasyonu gözlemlemişlerdir.

Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan çalışmalarda (21, 22) fulminan B hepatitli hastalarda prekor/kor mutantlarının seyrek olarak bulunduğu bildirilmiştir. Bu durumda hastalığın klinik süreci ile prekor/kor mutantının ilişkili olduğu görüşü tehlikeye girmiştir. Çeşitli araştırmalar (23, 24) bu mutasyonun hastalığın immün temizlenme dönemlerinde seçildiğini ve muhtemelen bu nedenle aktif hastalığı olanlarda daha fazla saptandığını belirtmişlerdir. "Prekor/kor mutasyonu ağır klinik tablonun nedeni

değil, sonucudur" görüşü konuşulmaya başlanmıştır. Bazı araştırmacılar (25, 26) ise bu tür mutant suşların kronik hepatit B'nin doğal seyrinde ortaya çıktığını belirtmişlerdir. Hatta mutantlarla infekte hastalarda akut alevlenmeler geliştiğinde, yükselen HBV DNA titresinden çoğunlukla wild tip sorumlu tutulmuştur (11). Araştırmamızda 51 olgunun hiç birinde prekor/kor mutanti belirlenemedi, tamamı sokak tipi idi. Elde edilen HBV DNA düzeyleri de muhtemelen bu tiplere aitti. Fakat prekor ve kor bölgesindeki nükleotit değişikliklerinin

hepatit B hastalığının aktivasyonu ile ilişkili bir risk faktörü olabileceği unutulmamalıdır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü tarafından desteklenen (BAP Proje No: 2003/83) proje kapsamında gerçekleştirilmiştir. Katkılarından dolayı teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. **Dündar İH, İnal AS.** Geçmişten günümüze viral hepatitler. Tabak F, Balık İ, Tekeli E, ed. *Viral Hepatit 2005*'te. Ankara: Viral Hepatitle Savaşım Derneği, **2005**: 10-20.
2. **Çınar K.** Hepatit B virüsünün immunopatogenezi. Çakalloğlu Y, Ökten A, ed. *Hepatit B Ulusal Uzlaşma Toplantı Metinleri*. İstanbul: Medikal Yayıncılık, **2003**: 57-64.
3. **Tekeli A.** Hepatit B virüsünde mutasyon ve önemi. Tabak F, Balık İ, Tekeli E, ed. *Viral Hepatit 2005*'te. Ankara: Viral Hepatitle Savaşım Derneği, **2005**:160-8.
4. **Eyigün CP.** Hepatit B virüsü mutasyonlarının klinik önemi ve tedaviye etkileri. Tabak F, Balık İ, Tekeli E, ed. *Viral Hepatit 2007*'de. Ankara: Viral Hepatitle Savaşım Derneği, **2007**:131-44.
5. **Du H, Li T, Zhang HY, et al.** Correlation of hepatitis B virus (HBV) genotypes and mutations in basal core promoter/precore with clinical features of chronic HBV infection. *Liver Intern* **2007**; **27**: 240-6.
6. **Angus PW, Locarnini SA, McCaughan GW, Jones RM, McMillan JS, Bowden DS.** Hepatitis B virus precore mutant infection is associated with severe recurrent disease after liver transplantation. *Hepatology* **1995**; **21**: 14-8.
7. **McMillan JS, Bowden DS, Angus PW, McCaughan GW, Locarnini SA.** Mutations in the hepatitis B virus precore/core gene and core promoter in patients with severe recurrent disease following liver transplantation. *Hepatology* **1996**; **24**: 1371-8.
8. **Chu CM, Yeh CT, Lee CS, Sheen IS, Liaw YF.** Precore stop mutant in HBeAg-positive patients with chronic hepatitis B: Clinical characteristics and correlation with the course of HBeAg-to-AntiHBe seroconversion. *J Clin Microbiol* **2002**; **40**: 16-21.
9. **Brunetto MR, Rodriguez UA, Bonino F.** Hepatitis B virus mutants. *Intervirology* **1999**; **42**: 69-80.
10. **Rezende REF, Fonseca BAL, Ramalho LNZ, et al.** The precore mutation is associated with severity of liver damage in Brazilian patients with chronic hepatitis B. *J Clin Virol* **2005**; **32**: 53-9.
11. **Akarca US.** Hepatit B virüsü mutasyonları. www.vhsd.org
12. **Huy TTT, Ushijima H, Quang VX, et al.** Characteristics of core promoter and precore stop codon mutants of hepatitis B virus in Vietnam. *J Med Virol* **2004**; **74**: 228-36.
13. **Yuen MF, Sablon E, Tanaka Y, et al.** Epidemiological study of hepatitis B virus genotypes, core promoter and precore mutations of chronic hepatitis B infection in Hong Kong. *J Hepatol* **2004**; **41**: 119-25.
14. **Yuen MF, Sablon E, Yuan HJ, et al.** Relationship between the development of precore and core promoter mutations and hepatitis B e antigen seroconversion in patients with chronic hepatitis B. *J Infect Dis* **2002**; **186**: 1335-8.
15. **Sitnik R, Pinho JRR, Bertolini DA, Bernardini AP, Silva LC, Carrilho FJ.** Hepatitis B virus genotypes and precore and core mutants in Brazilian patients. *J Clin Microbiol* **2004**; **42**: 2455-60.
16. **Yuan J, Zhou B, Tanaka Y, et al.** Hepatitis B virus (HBV) genotypes/subgenotypes in China: Mutations in core promoter and precore/core and their clinical implications. *J Clin Microbiol* **2007**; **39**: 87-93.
17. **Bozdayı AM, Bozkaya H, Türkyılmaz AR, et al.** Nucleotide divergences in the core promoter and precore region of genotype D hepatitis B virus in patients with persistently elevated or normal ALT levels. *J Clin Virol* **2001**; **21**: 91-101.
18. **Serin MS, Akkız H, Abalı B, Öksüz M, Aslan G, Emekdaş G.** Genotyping of hepatitis B virus isolated from chronic hepatitis B patients in the south of Turkey by DNA cycle-sequencing method. *Diag Microbiol Infect Dis* **2005**; **53**: 57-60.
19. **Sünbül M, Leblebicioğlu H.** Distribution of hepatitis B virus genotypes in patients with chronic hepatitis B in Turkey. *World J Gastroenterol* **2005**; **11**: 1976-80.

20. **Onganer PU, Oğuzoğlu N, Özer A.** Mutation and genotype analysis of hepatitis B on acute and chronic infected selected patients in Turkey. *J Cell Mol Biol* **2006**; 5: 33-42.
21. **Tong S, Kim K, Chante C, Wands J, Li J.** Hepatitis B virus e antijen variants. *Int J Med Sci* **2005**; 2: 2-7.
22. **Fung SK, Lok AS.** Viral hepatitis in 2003. *Curr Opin Gastroenterol* **2004**; 20: 241-7.
23. **Aritomi T, Yatsuhashi H, Fujino T, et al.** Association of mutations in the core promoter and precore region of hepatitis virus with fulminant and severe acute hepatitis in Japan. *J Gastroenterol Hepatol* **1998**; 13: 1125-32.
24. **McMillan JS, Bowden DS, Angus PW, McCaughan GW, Locarnini SA.** Mutations in the hepatitis B virus precore/core gene and core promoter in patients with severe recurrent disease following liver transplantation. *Hepatology* **1996**; 24: 1371-8.
25. **Fujise K, Suzuki K, Naito Y, et al.** Hepatitis B virus variants in patients with acute hepatitis in whom various clinical forms develop. *Kansenshogaku Zasshi* **1998**; 72: 67-74.
26. **Zheng X, Yang D, Tang Z.** The clinical and pathology study of HBV precore mutant infection in chronic HBV patients. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* **1999**; 7: 17-9.

İLETİŞİM

Prof. Dr. İnci TUNCER
Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
KONYA
e-posta: incituncer@yahoo.com