

**T.C.  
FIRAT ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
ENFEKSİYON HASTALIKLARI VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ  
ANABİLİM DALI**

**KRONİK HEPATİT B ENFEKSİYONLU HASTALARDA  
LAMUVİDİNE DOĞAL DİRENCİN INNO-LİPA YÖNTEMİYLE  
ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ  
Dr. Müge ÖZGÜLER**

**TEZ YÖNETİCİSİ  
Prof. Dr. Ayhan AKBULUT**

**ELAZIĞ  
2012**

## **DEKANLIK ONAYI**

Prof. Dr. İrfan ORHAN

**DEKAN**

Bu tez Uzmanlık tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Ayhan AKBULUT

**Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi**

**Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı**

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden “Uzmanlık Tezi” olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ayhan AKBULUT

**Danışman**

### **Uzmanlık Tezi Değerlendirme Jüri Üyeleri**

Prof. Dr. Ayhan AKBULUT

\_\_\_\_\_

Prof. Dr. Kutbettin DEMİRDAĞ

\_\_\_\_\_

Doç. Dr. Mehmet ÖZDEN

\_\_\_\_\_

## TEŞEKKÜR

Öncelikle; ihtisasım boyunca her türlü desteği gördüğüm ve tezimin hazırlanma sürecinde yardımlarını esirgemeyen Sayın hocam Prof. Dr. Ayhan AKBULUT 'a teşekkürlerimi sunarım.

Hocalarım; Sayın Prof. Dr. Kutbettin DEMİRDAĞ' a ve tezimin hazırlanma aşamasında bana vakit ayıran Sayın Doç. Dr. Mehmet ÖZDEN'e teşekkürlerimi sunarım.

İhtisasıma başladığım ilk üç yıl anabilim dalımızda bulunan fakat çeşitli nedenlerden dolayı aramızdan ayrılmak zorunda kalan Prof. Dr. S.Sırrı KILIÇ hocam, Prof. Dr. Ahmet KALKAN hocam ve Doç. Dr. İlhami ÇELİK hocama teşekkürlerimi sunarım.

İhtisasım boyunca eğitimime katkıları bulunan Prof. Dr. Handan AKBULUT hocama teşekkürlerimi sunarım.

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde görev yapmakta olan tıp eğitimime katkı sağlamış tüm hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamıza destek olan Gilead Sciences İlaç Tic Ltd Sti.'ne ve Düzen Laboratuvarlarına teşekkür ederim.

Asistanlığım boyunca beraber çalıştığım kıdemlilerim sayın Uzm. Dr. Nuran İNCİ, Uzm. Dr. Mehmet ÇABALAK, Uzm. Dr. Arzu ŞENOL, Uzm. Dr. Gülden ESER KARLIDAĞ, Uzm. Dr. Özlem ÇAĞAŞAR, Uzm. Dr. Şafak ÖZER BALİN, Uzm. Dr. Necmettin YILDIRIM, Uzm. Dr. Kürşat KARADABAN a ve beraber çalışmakta olduğum sayın Dr. Meral GÜLBENAT ŞİMŞEK, Dr. Ayşe SAĞMAK TARTAR, Dr. Yasemin KIRIK, Dr. Derya BESLENTİ ve Dr. Birhan AKBAYIR'a teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin hazırlanması esnasında bana destek olan klinik sorumlu hemşiremiz Sayın Nurhan GÜDER'e ve tüm hemşire arkadaşlarıma teşekkür ederim. Bir dönem kliniğimizde beraber çalıştığımız ancak farklı sebeplerden dolayı aramızdan ayrılmış olan hemşire hanımlara teşekkür ederim.

Kliniğimizde görev yapan tüm personellere ve bana emeği geçen herkese teşekkürlerimi sunarım.

Bugüne gelmemde en büyük paya sahip olan ve haklarını asla ödeyemeyeceğim; anneciğim Vahide ERTUĞRUL ve canım babacığım Kadir ERTUĞRUL ‘a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Canım ablacığım Özge ERTUĞRUL KARAÇALI’ ya ve canım kardeşim Dr. Ertuğrul ERTUĞRUL’ a destekleri için teşekkürlerimi sunarım.

Asistanlığım boyunca bana ve eşime hep yardımcı olan, oğluma bakıp bu günlere getiren kayınvalidem Nezihe ÖZGÜLER’e, Kayınpederim Ferdi ÖZGÜLER’e ve kardeşimiz Meriç ÖZGÜLER’e teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman bana destek olan, hep yanımda olan, hayat arkadaşım, Dr. Murat ÖZGÜLER’e, bana annelikten daha güzel bir duygunun olmadığını düşündüren ve yaşatan canım oğlum, her şeyim Şefik Tuğberk ÖZGÜLER’e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## ÖZET

Dünya genelinde iki milyar kişi, Hepatit B virüsü (HBV) ile karşılaşmıştır ve bunların 350 milyonu HBV ile kronik olarak enfektedir. Yenidoğan ve ilk 1 yaşta geçirilen enfeksiyon % 90 oranında kronikleşmekte, bu oran 1-5 yaş arasında % 30'a inmektedir. Daha erişkin yaşlar da ise % 2-5 kronikleşme riski bulunmaktadır. HBV başlıca; vertikal, parenteral, horizontal bulaş, medikal işlemlerin sebep olduğu nozokomiyal bulaş ve korunmasız cinsel ilişki ile bulaşmaktadır. Kronik hepatit B tedavisinde günümüzde; immünmodülatör ve antiviral etkili pegile-interferonlar ve oral antiviral ajanlar kullanılmaktadır. Oral antiviral etkili ajanlardan Lamivudin; HBV replikasyonunu sağlayan “revers transkriptaz (RT)” enzimini bloke etmekte, virüsün replike olmasını engellemektedir. Bu çalışmanın amacı, toplumdaki hepatit B virüsünün günümüzde kronik hepatit B tedavisinde sık olarak kullanılmakta olan lamivudine olan primer direnci saptamak ve tedaviye lamivudinle başlamanın etkinliği ve uygunluğunu değerlendirmektedir.

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na başvuran, herhangi bir antiviral tedavi almamış olan 100 hasta çalışmaya alınmıştır. 78 hasta HBeAg negatif, 22 hasta HBeAg pozitif saptanmıştır. HBeAg pozitifliği, ALT yüksekliği ve HBVDNA arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon saptanmıştır ( $p<0,05$ ). Hastalarda primer lamivudin direnci araştırılmak üzere İNNO-LİPA yöntemi uygulanmıştır. Yalnızca HBeAg pozitifliği olan bir hastada rtM204V ve L180M mutasyonunun olduğu diğer hastalarda herhangi bir mutasyon motifinin olmadığı saptanmıştır.

Yöremizde bulunan hepatit B virüsünün lamivudine dirençli suş olmadığı, tedaviye lamivudin ile başlamanın etkin ve uygun bir tedavi olduğu sonucuna varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Kronik hepatit B, Lamivudin, Primer direnç, İnnolipa

## ABSTRACT

### DETECTION NATURAL LAMIVIDINE RESISTANCE BY INNO-LIPA IN PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS B

Two billion individuals worldwide have exposed to hepatitis B virus (HBV) and 350 millions of them are chronically infected with HBV. Infection experienced in newborn period and during the first one year of life becomes chronic in the ratio of 90%, this ratio reduces to 30% between 1-5 years. Risk of chronicity is about 2-5% in adult age. Main routes for HBV transmission are vertical transmission, parenteral transmission, horizontal transmission, unprotected sexual intercourse and nosocomial transmission caused by medical procedures. Pegylated-interferons with immunomodulatory and antiviral effects and oral antiviral agents are used today for treatment of chronic hepatitis B. Of oral antiviral agents, lamivudine blocks HBV replication providing enzyme, reverse transcriptase (RT) and prevents viral replication. In this study, it was aimed to detect primary resistance to lamivudine which is a drug often used today for chronic hepatitis B treatment and assess effectivity and suitability of initiation lamivudine treatment.

One hundred patients who were admitted to Clinical Microbiology and Infectious Diseases Clinic of Firat University Hospital and who did not receive any antiviral therapies evaluated for investigate lamivudine resistance. We detected 78 patients HBeAg negative and 22 patient HBeAg positive. We detected statistical significance correlations with HBeAg positivity, elevated ALT levels and HBVDNA levels ( $p < 0,05$ ). We used INNO-LIPA test for investigate primary lamivudine resistance. We observed rtM204V and L180M mutations only one patient who have HBe positivity.

It was concluded that the hepatitis B virus which is our region is current virus and lamivudine is effective and suitable drug for treatment of chronic hepatitis B.

**Key Words:** Chronic hepatitis B, Lamivudine, Primary resistance, Innolipa

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
<b>BAŞLIK SAYFASI</b>	<b>i</b>
<b>ONAY SAYFASI</b>	<b>ii</b>
<b>TEŞEKKÜR</b>	<b>iii</b>
<b>ÖZET</b>	<b>v</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>vi</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>vii</b>
<b>TABLO LİSTESİ</b>	<b>x</b>
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b>	<b>xi</b>
<b>KISALTMALAR LİSTESİ</b>	<b>xii</b>
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
1.1. Genel Bilgiler	2
1.2. Epidemiyoloji	3
1.3. Etyoloji	4
1.3.1. HB V Genomu	4
1.3.1.1. HBV Replikasyon Döngüsü	5
1.3.1.2. Tutunma ve Füzyon	5
1.3.1.3. Viral Gen Ekspresyonu	6
1.3.2. HBV Genotipleri	8
1.3.3. HBV Mutantları	8
1.3.3.1. Prekor Mutasyonları	9
1.3.3.2. X Bölgesi Mutasyonları	10
1.3.3.3. S Mutasyonları	10
1.3.3.4. Polimeraz Bölgesi Mutasyonları	11
1.4. Hepatit B'nin Patogenezi	14
1.4.1. İmmün Aracılı Karaciğer Hasarı	14
1.4.2. Direkt Sitopatik Etki	16
1.5. Hepatit B Enfeksiyonunda Klinik	16
1.5.1. Akut Hepatit B	16
1.5.2. Kronik Hepatit B'de Klinik	18
1.5.2.1. İmmün Toleran Faz	18

1.5.2.2. İmmün Reaktif Faz	19
1.5.2.3. İnaktif Taşıyıcı Fazı	19
1.5.2.4. HBeAg Negatif Kronik Hepatit B	19
1.5.2.5. Düşük Replikatif Dönem	20
1.6. HBV İnfeksiyonunda Tanı	20
1.6.1. Serolojik Tanıda Kullanılan Markerlar	20
1.6.1.1. Akut Enfeksiyonda Serolojik Tanı	23
1.6.1.2. Kronik Hepatit B Enfeksiyonunda Serolojik Tanı	25
1.6.2. Moleküler Tanı Yöntemleri	25
1.7. Kronik Hepatit B’de Tedavi	27
1.7.1. Antiviral Tedavi Endikasyonları	27
1.7.2. KHB’ de Tedavi Seçenekleri	29
1.7.2.1. KHB Tedavisinde Pegile İnterferonlar	30
1.7.2.2. KHB Tedavisinde Nükleozid/Nükleotid Analogları	31
1.7.2.2.1. Lamivudin	31
1.7.2.2.2. Adefovir Dipivoksil	33
1.7.2.2.3. Entekavir	34
1.7.2.2.4. Tenofovir	34
1.7.2.2.5. Telbivudin ( L-Deoksitimidin)	35
1.7.2.2.6. Embtrisitabin	35
1.7.3. Tedavinin Sonlanım Noktaları	36
1.7.4. Tedaviye yanıt tanımları	37
1.7.4.1. İnterferon Alfa Tedavisinde	37
1.7.4.2. Nükleozid/Nükleotit analogu tedavisinde	37
1.7.5. Tedaviye Yanıt İçin Ön Görücü Kriterler	38
1.7.5.1. İnterferon Alfa Tedavisine Yanıt İçin Öngörücü Kriterler	38
1.7.5.2. Nükleozid/nükleotit analoglarıyla tedaviye yanıt için öngörücü kriterler;	39
1.7.6. Tedavi Stratejileri	39
1.7.7. KHB’de Tedavi Süresi	41
1.7.7.1. IFN Alfa Tedavisi Alan Hastalarda Tedavi Süresinin Belirlenmesi	41

1.7.7.2. Nükleoz(t)id Analogu Tedavisi Alan Hastalarda Tedavi Süresinin Belirlenmesi;	41
1.7.8. Tedavi Takibi	42
1.7.8.1. Pegile İnterferon Alfa Alan Hastalarda Takip	42
1.7.8.2. Nükleoz(t)id Analogları İle Tedavi Takibi	43
1.8. Kronik Hepatit B’de Genotipik Direnç	44
1.8.1. Antiviral Direncinde Rol Alan Etkenler	44
1.8.2. Genotipik Direnci Araştırma Metodları	44
1.8.3. Lamivudin ve Diğer l-Nükleozitlere Genotipik Direnç Değişiklikleri	46
1.8.4. Asiklik Fosfonatlara Genotipik Direnç Değişiklikleri	46
1.8.5. Entekavire Genotipik Direnç Değişiklikleri	46
<b>2. GEREÇ ve YÖNTEM</b>	<b>47</b>
2.1. Hastalar	47
2.2. Verilerin Toplanması	47
2.2.1. HBV DNA Ekstraksiyonu	47
2.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	49
2.2.3. Akrilamid Jel Elektroforezi	49
2.2.4. İnno Lipa Revers Hibridizasyon	50
2.3 İstatistiksel Analiz	51
<b>3. BULGULAR</b>	<b>52</b>
<b>4. TARTIŞMA</b>	<b>61</b>
<b>5. KAYNAKLAR</b>	<b>72</b>
<b>6. ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>83</b>

## TABLO LİSTESİ

	<b>Sayfa No</b>
<b>Tablo 1.</b> Hastaların Demografik Özellikleri	53
<b>Tablo 2.</b> Hastaların yapılan tetkik sonuçları	55
<b>Tablo 3.</b> Hormonal testlerin sonuçları	56
<b>Tablo 4.</b> Hastaların HBVDNA düzeyleri (kopya/ml)	56
<b>Tablo 5.</b> Hastaların HBe Ag- Anti HBe pozitiflik durumu	56
<b>Tablo 6.</b> Hastaların kolesterol ve tiroid fonksiyon testleri	56
<b>Tablo 7.</b> Hastaların Tiroid fonksiyon testleri sonuçları	57
<b>Tablo 8.</b> Hastaların ultrason bulguları	57
<b>Tablo 9.</b> Hastaların karaciğer biyopsisi sonuçları	57
<b>Tablo 10.</b> ALT nin, HBV DNA, HAI ve Evre arasındaki ilişkisi	58
<b>Tablo 11.</b> HBeAg ile HBV DNA ve ALT ilişkisi	59
<b>Tablo 12.</b> Kolesterol ve TFT'nin HBVDNA, ALT yüksekliği, HAI ve evre arasındaki ilişkisi	60
<b>Tablo 13.</b> Ultrason bulgularıyla HBV DNA, ALT yüksekliği, HAI ve Evre arasındaki ilişki	60

## ŞEKİL LİSTESİ

	<b>Sayfa No</b>
<b>Şekil 1.</b> HBV'nun genomik organizasyonu ve sentezlenen RNA'lar	5
<b>Şekil 2.</b> Viral gen ekspresyonu	7
<b>Şekil 3.</b> Polimeraz proteininin yapısı	11
<b>Şekil 4.</b> Polimeraz geni ve direnç mutasyon noktaları	12
<b>Şekil 5.</b> Polimeraz geninde direnç gözlenen alanlar	13
<b>Şekil 6.</b> Akut HBV serolojisi	25
<b>Şekil 7.</b> Kronik HBV serolojisi	25
<b>Şekil 8.</b> INNO-LiPA HBV DR v2 (Innogenetics, Gent, Belgium) test stribininin ve örnek mutasyon motifinin görünümü	46
<b>Şekil 9.</b> Otomatize Auto-Lipa Cihazı	51
<b>Şekil 10.</b> İNNOLİPA test stribinde M204V ve L180M mutasyonlarının görünümü	59

## KISALTMALAR LİSTESİ

<b>A</b>	: Adenin
<b>AFP</b>	: Alfa fetoprotein
<b>AgNO<sub>3</sub></b>	: Gümüş nitrat
<b>ALT</b>	: Alanin aminotransferaz
<b>ALP</b>	: Alkale fosfataz
<b>APS</b>	: Amonyum peroksit disülfat
<b>AST</b>	: Aspartat aminotransferaz
<b>Au</b>	: Avustralya Antijeni
<b>cccDNA</b>	: Kovalent bağlı sirküler DNA
<b>CEA</b>	: Karsinoembriyjenik antijen
<b>CTL</b>	: Sitotoksik T lenfosit
<b>°C</b>	: Santigrat derece
<b>dk</b>	: Dakika
<b>dl</b>	: Desilitre
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik asit
<b>FDA</b>	: Food and Drug Administration
<b>F.Ü.</b>	: Fırat Üniversitesi
<b>g</b>	: Gram
<b>G</b>	: Guanin
<b>GGT</b>	: Gama glutamil transferaz
<b>HAI</b>	: Histolojik aktivite indexi
<b>HBV</b>	: Hepatit B virüsü
<b>HBcAg</b>	: Hepatit B kor (Core) antijeni
<b>HBsAg</b>	: Hepatit B envelope (zarf) antijeni
<b>HBIG</b>	: Hepatit B İMMÜNglobulin
<b>HBsAg</b>	: Hepatit B yüzey antijeni
<b>HBV DNA</b>	: Hepatit B Virüs DNA'sı
<b>HBx protein</b>	: Hepatit B x proteini
<b>HCC</b>	: Hepatohücrel karsinom
<b>HCV</b>	: Hepatit C virusu
<b>HDV</b>	: Hepatit D virusu

<b>HIV</b>	: Human Immunodeficiency Virus
<b>I</b>	: İsolösin
<b>IgG</b>	: İmmünoglobulin G
<b>IgM</b>	: İmmünoglobulin M
<b>INF<math>\alpha</math></b>	: İnterferon alfa
<b>INF</b>	: İnterferon
<b>INR</b>	: İnternational normalisation ratio
<b>IU</b>	: International Unit
<b>KHB</b>	: Kronik hepatit B
<b>kDa</b>	: Kilo dalton
<b>LDH</b>	: Laktat dehidrogenaz
<b>LİPA</b>	: Line probe assay
<b>M</b>	: Metiyonin
<b>mA</b>	: MiliAmper
<b>MALDI TOF</b>	: Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time of Flight
<b>Mg</b>	: Miligram
<b>ml</b>	: Mililitre
<b>mmol</b>	: Milimol
<b>mIU</b>	: Mili International Unit
<b>ml/dk</b>	: Mililitre/dakika
<b>NA</b>	: Nukleozid/ nukleotid analogları
<b>NaOH</b>	: Sodyum hidroksit
<b>NK</b>	: Naturel killer (doğal öldürücü)
<b>NÜS</b>	: Normalin üst sınırı
<b>ORF</b>	: Open Reading Frame (Açık okuma çerçevesi)
<b>PCR</b>	: Polimerase Chain Reaction (Polimeraz zincir reaksiyonu)
<b>Peg- IFN</b>	: Pegile interferon
<b>PTZ</b>	: Protrombin zamanı
<b>rcDNA</b>	: Pozitif iplikli çembersel DNA ( relaxed circular DNA)
<b>RFLP</b>	: Restriction fragment polymorphism
<b>RNA</b>	: Ribonükleik asit
<b>RNaz</b>	: Ribo Nükleaz

<b>RT</b>	: Revers transkriptaz
<b>RTq-PCR</b>	: Real -time polimeraz zincir reaksiyonu
<b>S</b>	: Sitozin
<b>S geni</b>	: Yüzey antijenini kodlayan gen
<b>Sn</b>	: Saniye
<b>TFT</b>	: Tiroid fonksiyon testleri
<b>TGA</b>	: Timin -Guanin –Adenin
<b>TGG</b>	: Timin -Guanin –Guanin
<b>TNF</b>	: Tümör nekroz faktör
<b>USG</b>	: Ultrasonografi
<b>UV</b>	: Ultraviyole
<b>ÜSYE</b>	: Üst solunum yolu enfeksiyonu
<b>V</b>	: Valin
<b>V</b>	: Volt
<b>YIDD</b>	: Tirozin, izolösin, aspartat, aspartat
<b>YMDD</b>	: Tirozin-metiyonin-aspartat-aspartat
<b>YVDD</b>	: Tirozin, valin, aspartat, aspartat
<b>µL</b>	: Mikrolitre
<b>∞</b>	: Sonsuz

## 1. GİRİŞ

Dünya genelinde iki milyar kişi, Hepatit B virüsü (HBV) ile karşılaşmış olup bunların 350 milyonu HBV ile kronik olarak enfektedir (1,2). Kronik Hepatit B enfeksiyonlu hastalarda hayatı tehdit eden; karaciğer yetmezliği, hepatohüresel karsinom (HCC) gibi hastalıkların görülme insidansı % 40 olarak belirtilmektedir. HCC tanısı alan vakaların %5–10'una karaciğer nakli planlanmakta, her yıl 500 bin kişi HCC nedeniyle kaybedilmektedir (3).

Hepatit B virüsü prevalansı, coğrafi bölgelere göre farklılık göstermektedir. Batı ülkelerinde % 0,1 olan prevalans, bazı Asya ve Afrika ülkelerinde % 15'dir (4). Bu oranın farklı coğrafik alanlarda farklı olması, bulaş şekli ve virüsün alındığı yaşla ilişkilidir.

Hepatit B virüs enfeksiyonunda, bulaş yaşı arttıkça kronikleşme riski azalmaktadır. Yenidoğan ve ilk 1 yaşta geçirilen enfeksiyon % 90 oranında kronikleşmekte, bu oran 1–5 yaş arasında % 30'a inmektedir. Erişkin yaşlar da ise % 2–5 kronikleşme riski bulunmaktadır (5).

Kronik HBV, özellikle gelişmekte olan ülkelerde çok önemli bir halk sağlığı sorunu olmaya devam etmektedir. Ülkemizde HBV taşıyıcılığı; %3,9–12,5 oranındadır. Ülkemiz orta endemisite bölgesi içerisinde yer almaktadır (6,7).

Hepatit B virüsü'nin başlıca bulaş yollarını; vertikal bulaş (anneden çocuğa), parenteral bulaş (kan ve kan ürünleri, intravenöz ilaç kullanımı), horizontal bulaş (hijyen alışkanlıkları, ortak diş fırçası kullanımı), korunmasız cinsel ilişki ve medikal işlemlerin sebep olduğu nozokomiyal bulaş oluşturmaktadır (8,9).

Risk gruplarını; enfekte olan kişiyle korunmasız cinsel ilişkide bulunan kişiler, birden fazla cinsel partneri olan kişiler, cinsel yolla bulaşan başka hastalık öyküsü olanlar, homoseksüel erkekler, intravenöz madde kullanımı öyküsü olanlar, kronik hasta ile aynı evde yaşayanlar, enfekte anneden doğanlar bebekler, sağlık çalışanları ve hemodiyaliz hastaları oluşturmaktadır.

Yapılan çalışmalarda; tükürük, semen, anne sütü, idrar, pankreas ve safra sekresyonlarında hepatit B yüzey antijeni (HBsAg) olduğu gösterilmiş ve horizontal bulaşın önemi vurgulanmıştır (10–14).

Günümüzde Hepatit B'yi önlemek için güvenli aşilar geliştirilmiş ve bu aşilar % 90–95 oranında etkin bulunmuştur. Halen doksandan fazla ülkede, yenidoğanların aşilanması rutin olarak yapılmaktadır (15).

Hepatit B virüsü enfeksiyonu başladıktan sonra hastaların immün sisteminde yeterli ve etkili yanıt gelişmediğinde, virüs karaciğerden temizlenememekte ve kronik hastalık meydana gelmektedir.

Kronik hepatit B tanısı; hastaların uygun anamnez ve fizik muayene bulgularıyla beraber serolojik olarak hepatit B'ye yönelik antijen ve antikorların değerlendirilmesi ile HBV DNA düzeyinin moleküler yöntemlerle saptanmasına dayanmaktadır.

Kronik hepatit B tedavisinde günümüzde; immünomodülatör ve antiviral etkili pegile interferonlar ve oral antiviral ajanlar kullanılmaktadır. Lamivudin (beta- L- 2',3'-dideoksi thiacitidine), kronik hepatit B tedavisinde oral olarak kullanılan ilk nükleozid analogudur. Hastalar tarafından iyi tolere edilir ve kullanımını kısıtlayacak önemli ve sık görülen yan etkileri de yoktur. Lamivudin; HBV replikasyonunu sağlayan 'revers transkriptaz (RT)' enzimini bloke ederek, virüsün replike olmasını engellemektedir. En önemli dezavantajı; tedavi süresinin kesin olmaması ve dirençli suşların oluşmasına neden olmasıdır (16).

Yapılan çalışmalarda; önceden lamivudin tedavisi almamış olan kronik hepatit B (KHB)'li hastalarda, viral genomda tirozin-metiyonin-aspartat-aspartat (YMDD) mutasyonu olduğu gösterilmiştir (17,18). Bu sonuçlar, dirençli mutant suşların toplumda dolaştığını ve bu dirençli suşla yeni enfeksiyonlar gelişebileceğini düşündürmektedir.

Bu çalışmada; Fırat Üniversitesi Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kliniği'ne başvuran, kronik hepatit B ye yönelik herhangi bir antiviral tedavi almamış olan hastalardaki lamivudin direncinin araştırılması amaçlanmıştır.

### **1.1. Genel Bilgiler**

Hepatit B virüsü; hepadnaviridae ailesine ait bir virüstdür. Sadece insan ve şempanzelerin karaciğerinde enfeksiyon yapmaktadır. HBV ilk defa 1965 yılında Blumberg ve arkadaşları tarafından "Avustralya Antijeni-Au" adı verilen bir serum

proteini olarak rapor edilmiştir.1980'li yıllarda serolojik ve moleküler yöntemler tanısal amaçlı kullanılmıştır.

## 1.2. Epidemiyoloji

Dünyanın her yerinde, HBV ile enfekte bireyler bulunuyor olsa da; HBV özellikle Asya Güney Pasifik, Sahra altı Afrika' lılarda, Avustralya'da, Alaska, Kuzey Kanada'da, Güney Amerika ve Orta Doğu da endemiktir (19).

Hepatit B virüsü'nin dört ana bulaş yolu vardır:

**a ) Perkütan bulaş:** Enfekte kan ve kan ürünleri ile meydana gelen bulaş türüdür. HBeAg pozitif olan taşıyıcılar, açık yaralarıyla çevreye  $10^{7-9}$  viral partikül saçarlar ve bu viral partiküller uzun süre dış ortamda canlı kalabilirler (20-21).

**b ) Cinsel temas:** Enfekte kişi ile korunmasız cinsel aktivite ile bulaşır. Birden fazla cinsel partneri olanlar cinsel yolla bulaş için risk oluşturmaktadır.

**c ) Perinatal (vertikal yol - enfekte anneden yenidoğana bulaş):** HBeAg pozitif anneden doğan bebek, %70-90 enfekte olur, enfeksiyon % 90 oranında kronikleşir

**d ) Horizontal bulaş:** Çeşitli vücut sıvılarında HBsAg bulunmuştur. Plevra ve peritonda serumdaki kadar virion vardır. Tükürük ve semende, serumun yarısı kadar virion vardır.

Kronik hepatit B (KHB)'nin Dünya'daki dağılımı coğrafi bölgelere göre farklılık göstermektedir. HBsAg pozitifliği dünya genelinde % 0,1-20 oranındadır. Dünya düşük orta ve yüksek endemisite bölgelerine ayrılmıştır.

**a)Düşük endemisite** bölgesinde, HBsAg pozitifliği oranı %0,1-2 dir. Başlıca bulaş yolu; cinsel ilişki ve perkütan bulaştır.

**b)Orta endemisite** bölgesinde, enfeksiyon riski %2-5 oranındadır. Başlıca bulaş yolu; perkütan ve horizontal yoldur.

**d)Yüksek endemisite** bölgesinde ise; HBsAg pozitifliği oranı % 5-20 oranındadır. Maternal, perinatal ve horizontal bulaş ana bulaş yollarıdır.

Ülkemiz orta endemisite bölgesinde yer almaktadır. Ülkemizde baskın olan genotip ise genotip D'dir (20) .

### 1.3. Etyoloji

#### 1.3.1. HB V Genomu

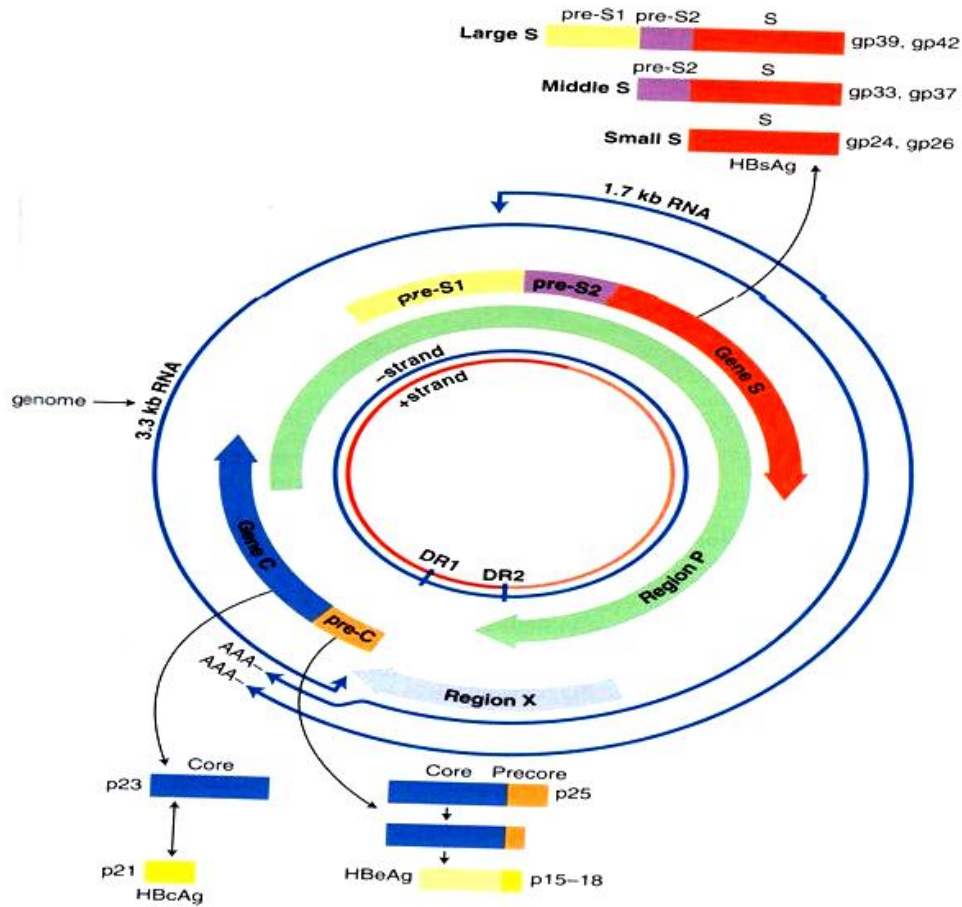
Hepatit B virüsü; küçük zarflı bir DNA virüsüdür. Viral genom 3200 nükleotidden oluşan, kısmen çift sarmallı (~%70) çembersel bir DNA'dan oluşur ve ikozahedral simetrik bir kapsid içinde bulunur. Bunun dışında da, üç farklı yüzey antijeni içeren, lipid yapılı bir zarf bulunmaktadır. Zarflı bir virüs olmasına rağmen eter, düşük pH, ısı, dondurma ve çözmeye oldukça dirençlidir. DNA virüsü olmasına rağmen, Revers transkriptaz (RT) enzimi kodlar ve RNA aracısı üzerinden replike olur (22,23).

Hepatit B virüsü genomunda, dört açık okuma bölgesi (ORF) bulunmaktadır. Bu açık okuma bölgeleri Zarf (pre-S/S), kor (pre-C/C), polimeraz ve X proteinlerini kodlar. HBV genomunun her nükleotidi bir kodlama bölgesidir. Genomun yarısından fazlası bir ORF'den fazla translasyon yapmaktadır. Pre-S/S ORF' de; pre-S1, pre-S2 ve S bölgeleri bulunmaktadır ve sırasıyla büyük (L), orta (M) ve küçük (S) zarf proteinlerini kodlar. L proteini virüs maturasyonu için temel yapılardan biridir ve virüs ile hücre arasındaki etkileşimi sağlar. Her üç zarf proteininin de karboksit terminalindeki 225 aminoasiti ortak olup üçü de, S alaninde yer alan sistein grupları arasında oluşan ve disülfid bağlarıyla stabilize edilen, glikoz ile tip 2 transmembran proteini özelliği gösterirler (24).

42 nm'lik Dane partikülünde her 3 bileşen de yer alır. S bileşeni virion zarfındaki ana protein olup, L ve M bileşenleri virion zarfındaki proteinlerin % 30 kadarını oluşturmakta ve ikisi eşit miktarlarda bulunmaktadır. Bu yüzey antijenleri enfekte olan hücrelerden enfektif virionlarla birlikte, fakat onlardan yaklaşık olarak 100 kat daha fazla salınan non-enfektif filamentöz ve sferik yüzey antijenlerinin de yapısını oluştururlar (22, 23).

Pre-core/core ORF ise; başlangıç kodonuna göre iki gen içermektedir. Translasyon Pre-core kodonundan başladığında, daha sonra modifikasyonla hepatit B virüsü (zarf-envelope) e antijenin (HBeAg) oluştuğu prekor polipeptid oluşur. Sentezlenen ürünün proteolizi ile oluşan HBeAg'nin ilk bölümü, tüm molekülün endoplazmik retikulum salgılanmasında görev alır. Golgi aygıtında, bu molekülün karboksit terminalinden 29 aminoasit ayrılması ile HBeAg olgunlaşır ve kana salınır.

Pre-C/C ORF de ikinci başlangıç kodonundan itibaren translasyon olursa kor proteini (HBcAg) oluşur (24).



**Şekil 1.** HBV'nun genomik organizasyonu ve sentezlenen RNA'lar (46)

1970'li ve 1980'li yıllarda yapılan çalışmalarla; HBeAg'nin, HBV DNA polimeraz aktivitesi ve infektivite ile ilgili olduğu gösterilmiştir. Fakat geçtiğimiz dekatda yapılan hassas tanısal moleküler testlerle, HBeAg negatif hastalarda HBV DNA saptanmıştır. Ayrıca çalışmaların çoğunda prekor stop kodon mutasyonu olduğu gösterilmiştir (22,23).

Polimeraz ORF kor, zarf, X ORF'lerini kapsar. Polimeraz protein primer, bağlantı bölgesi (spacer), revers transkriptaz, DNA polimeraz, RNazH içermektedir. HBx protein ise, güçlü bir transkripsiyon transaktivatörüdür (24-26).

### 1.3.1.1. HBV Replikasyon Döngüsü

### 1.3.1.2. Tutunma ve Füzyon

Replikasyon, virüsün hepatosite tutunması ile başlar. HBV'nin insan karaciğer hücrelerine tutunma ve giriş için kullandığı yüzey proteinleri, henüz

bilinmemektedir. Ancak LHBs Ag'nin amino terminalinde bulunan pre-S1 bölgesinin hedef hücreye tutunmada en önemli göreve sahip epitoplari içerdiği saptanmıştır (26). Ayrıca HBV zarf proteinlerini bağlayan çeşitli hücresele ligandlar da tespit edilmiştir. Viral alt tiplere göre 109 ya da 120 aminoasit büyüklüğünde olan pre-S1 bölgesinde, tutunma aktivitesinden sorumlu kısım 21-47. aminoasitler olarak tanımlanmış ve tutunma için bu bölgenin var olmasının yeterli ve gerekli olduğu anlaşılmıştır. Daha sonra yapılan mutagenез çalışmalarında; LHBs antijeninin içerisinde hücreye tutunmada kritik rol oynayan, QLDPAF dizisi tanımlanmıştır. Bu dizi başka birçok virüs, bakteri ve mikroorganizmanın yapısında olup, aynı amaçla kullanılmaktadır. HBV'nin, doku ve organ özgüllüğünün belirlenmesinde ise, geri kalan pre-S1 kısımlarının etkili olduğu bilinmektedir. X proteininde pre-S1'e benzer bir epitopun bulunması ve bu bölgenin de benzer şekilde QLDPAF dizisi içermesi, X proteininin de tutunmada rol aldığını akla getirmektedir. Ancak in-vitro çalışmalarda virüsün karaciğer hücresine tutunmasında tüm yüzey proteinlerinin aynı derecede aktivite gösterdiği de görülmüştür (24, 27,28).

Bir sonraki aşamada; virüs zarfı ve hücre membranı arasında füzyon meydana gelir ve nükleokapsid sitoplazmaya salınır. Sitoplazmada enzimatik yollarla kapsid parçalanır ve viral genomik DNA ve polimeraz çekirdeğe taşınır. Zarftan soyunma ve nükleer alana ilerleme net olarak bilinmemektedir (24).

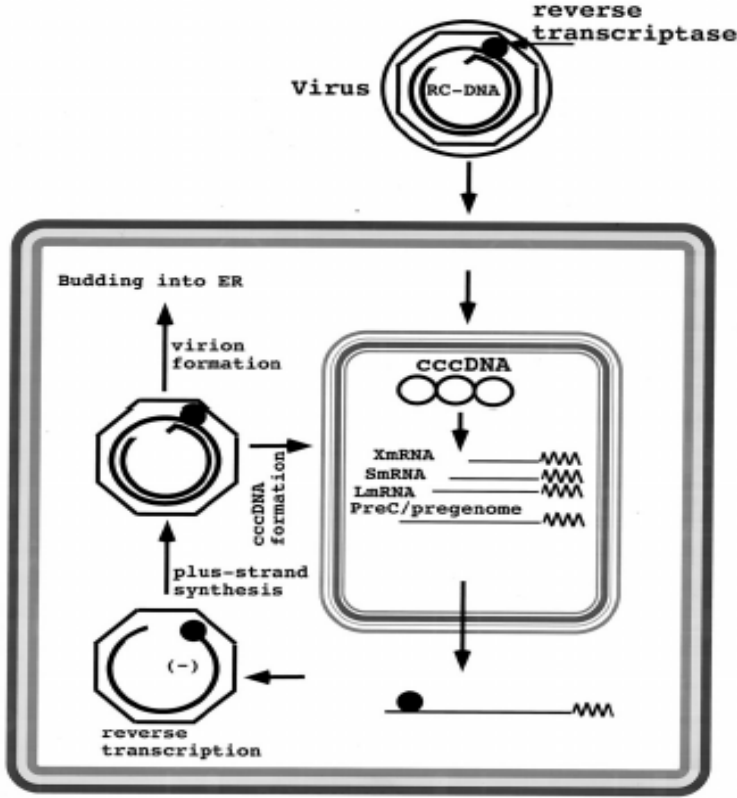
### **1.3.1.3. Viral Gen Ekspresyonu**

Viral genomik DNA'nın sentezi için revers transkriptaz, pre-genomik RNA'nın 5'ucuna bağlanır ve bu kompleks nükleokapsid içine paketlenir; böylece nükleokapsid içinde revers transkripsiyon ve viral DNA'nın sentezi başlar. Revers transkriptaz, bir primer gibi davranır. Negatif iplikli DNA oluştuktan sonra revers transkriptaz enzimi, RNaz H aktivitesi ile pre-genomik RNA'yı parçalar ve pozitif ipliğin sentezine başlar.

Nükleokapsid partikülleri, kısmi çift iplikli DNA molekülü oluştuğunda endoplazmik retikulum içerisinde tomurcuklanarak, zarf yapılarını kazanmalarına imkan sağlayacak olgunlaşma sürecine girerler. Oluşan nükleokapsidlerin bir kısmı hücre çekirdeğine geri dönerek cccDNA kopya havuzunu artırmak için görev alırlar (29,30).

Özyapı(kor) proteinlerinin; LHBs Ag amino terminali kısmına bağlanmaları,

partiküllerin endoplazmik retikulumdan tomurcuklanmasına neden olur. Üç zarf proteinini de içeren virionlar, endoplazmik retikulumdan golgi kompleksine taşınır. Bu esnada, zarf proteinlerinin glikozilasyonu tamamlanır ve olgun virion kan dolaşımına salınır (29, 30).



Şekil 2. Viral gen ekspresyonu (22)

#### 1.3.1.4. cccDNA’NİN Oluşumu ve HBV Enfeksiyonu Persistansındaki Rolü

Hepatit B virüsü virionları, baskın olarak, tüm negatif iplik ve kısmen tamamlanmış olan pozitif iplikli çembersel DNA ( relaxed circular DNA- rcDNA) genomu taşır. Kendi kendine hazırlık mekanizması ile oluşmuş az miktarda lineer DNA’da, virion içerisinde bulunabilir. Replikasyon döngüsünün başlaması ile bu iki form DNA cccDNA’ya dönüştürülür. Genom replikasyonunun ilk ve en önemli aşaması burasıdır. Virüsün hepatosite inokülasyonundan sonraki ilk 24 saatte olmaktadır. Negatif DNA ipliğine kovalent olarak bağlanan revers transkriptaz yerinden ayrılarak pozitif iplikçik tamamlanmakta, daha sonra bu iki zincirin ligasyon reaksiyonu ile birbirine bağlanması ile cccDNA oluşmaktadır (24).

Kovalent bağlı sirküler DNA, HBV’nin hepatositlerde kalışında etkili olan moleküldür ve antiviral tedavi sonrasında izlenen viral reaktivasyonlardan

sorumludur (24, 31). Nükleer membrandan viral DNA'nın çekirdeğe ulaşması sonrasında, virüse ait transkriptazlar ve hücrel RNA polimerazlar tarafından cccDNA oluşumu başlatılmaktadır. cccDNA; pregenomik RNA ve messenger RNA için kalıp olur. 3.5 kb büyüklüğündeki pregenomik RNA; hem HBVDNA'nın negatif iplikçiğinin revers transkripsiyonla tamamlanması için kalıp görevi görür, hem de nükleokapsid proteinlerinin üretimi ve polimeraz proteinlerinin üretimi için messenger RNA gibi görev alır (24).

Kovalent bağlı sirküler DNA oluşumu için iki kaynak bulunmaktadır; bunlardan biri hepatosite yeni virüsün girmesi, diğeri ise hepatosit sitoplazmasında oluşan yeni HBVDNA'dır. cccDNA'nın yarı ömrü çok uzundur ve cccDNA'nın kaybı hepatositlerin kaybıyla ilişkili görünmektedir (32).

Birçok antiviral ajan uzun zamandan beri çalışılmaktadır. Ancak şu ana kadar yapılan çalışmaların sonuçlarına göre; antiviral etkili ajanların, cccDNA üzerine çok az etkisinin olduğu veya hiçbir etkisinin olmadığı tahmin edilmektedir. Bu nedenle antiviral tedavi kesildikten sonra serumda HBVDNA tekrar hızla yükselmektedir.

### **1.3.2. HBV Genotipleri**

A'dan H'ye toplam sekiz hepatit B genotipi bulunmaktadır. Coğrafi bölgelere göre genotipler farklılık göstermektedir. Farklı genotiplerle; farklı klinik seyir ve farklı sonuçlar gözlenmektedir. Örneğin; genotip B ve C Asya'da sık gözlenirken, Genotip A ve D Avrupa, Ortadoğu ve Hindistan'da siktir. HBV genotip C enfeksiyonu olan çocuklarda, genotip B ile enfeksiyonu olanlara göre daha yavaş HBeAg serokonversiyonu gözleendiği bildirilmiştir (33).

### **1.3.3. HBV Mutantları**

Hepatit B virüsü genomu, RNA aracılı revers transkripsiyonla replike olmaktadır. İlaçlar ya da immün sistem tarafından replikasyon baskılanmadığı takdirde, günde yaklaşık  $10^{11}$  virion meydana gelmektedir. Revers transkriptaz enziminin düzeltici fonksiyonunun olmaması ile bu yüksek virion üretimi bir araya geldiğinde, replikasyonda fazla miktarda hatanın oluşabilmesine neden olmaktadır. Hepatit B virüsü polimerazının yıllık hata oranının, nükleotid başına 1,4-5/10.000 olduğu hesaplanmıştır (24). Bu mutasyonlar; mutant virüse, vahşi (wild) tip virüse göre daha fazla immün yanıtı kaçabilme ve daha fazla replikasyon yapabilme yeteneği sağlamasıyla suşun baskın suş haline almasına neden olmaktadır (34).

### 1.3.3.1. Prekor Mutasyonları

Prekor bölgesi, 87 nükleotid (29 aminoasit) içermektedir. En baskın olan mutasyon, 1896. nükleotidde (A1896) triptofan kodlayan 28. kodon olan TGG kodonunda, sondaki guaninin adenine değişimi ile TGA stop kodonunun oluşmasıdır. Bu mutasyonla; prekor protein, 28. kodonda erkenden sonlanır ve HBeAg üretimi engellenir. Bu stop kodonu, HBeAg ekspresyonunu durdurmaktadır. Buna rağmen HBV kor antijen üretimi ve HBV replikasyonu devam etmektedir (34,35).

Diğer bir mutasyon grubu da; bazal kor promotör bölgesini etkilemekte ve prekor ve kor RNA'larının transkripsiyonunda azalma şeklinde ortaya çıkmaktadır. A1762T ve G1764A şeklinde oluşan bu mutasyonların ikisi birlikte olduğunda, HBe antijeni sentezi azalmakta ve viral yükte artış gözlenmektedir. Diğerinin aksine; bu mutasyon tipi, genotip A ile enfekte kişilerde daha sık ortaya çıkmaktadır. Bazal kor promotör bölgesinde oluşan mutasyonlar, daha az prekor ve kor transkriptinin ve kor proteininin oluşmasına neden olmaktadır. Ancak pregenomik RNA transkripsiyonunu ya da polimeraz / kor proteinlerinin translasyonunu etkilemezler (34,35).

A1896 mutasyon prevelansındaki coğrafi farklılık, baskın olan HBV genotipi ile ilgilidir. Çünkü bu mutasyon sadece HBV genotip B, C, D, E bazı C genotiplerinde 1858 (T1858) pozisyonunda T nükleotidi olması durumunda görülmektedir. 1896. nükleotidle aynı bölgede 1858. pozisyonda bulunan nükleotidin baz çifti oluşturdukları, bu yapının da virüsün replikasyonunda görev aldığı bilinmektedir. Mutasyon sonucu oluşan stop kodon, A-T baz çifti oluşturarak fonksiyonel sekonder yapıyı stabilize etmektedir. A, F ve bazı C genotiplerinde ise; bu pozisyonda, timidin yerine sitozin bulunmakta, bu nedenle prekor stop kodonu mutasyonu bu genotiplerde nadiren izlenmektedir (35).

A1896 mutant suşlar; ilk defa kronik aktif ve ya fulminan hepatitli hastalarda saptanmıştır (35). Mutant suşların seçilmesi; başlangıçta mutant olan suşun, Anti HBe antikorlarının immün cevabından kaçma yeteneği olarak değerlendirilse de A1896 mutantlarının asemptomatik taşıyıcılarda da olabildiği gösterilmiştir. Ancak, A1896 mutasyonunun patojenik önemi hala net olarak tanımlanamamıştır (36).

Moleküler viroloji çalışmalarıyla G-A mutasyonunun pregenom, enkapsidasyon dizisinin ikincil güçlenmesini sağladığı, Wild tipe kıyaslandığında,

T1858 içeren HBV genotiplerinde daha etkin replikasyon yaptığı gözlenmiştir. Bununla beraber; yapılan klinik çalışmalarda A1896 mutant suşlarda HBV DNA düzeylerinin, vahşi tip HBV suşlarından yüksek olmadığı saptanmıştır (36).

Kor geninde izlenen mutasyonlar ve prekor stop kodonu mutasyonlarının varlığı; HBe antijeni sentezi ve karaciğerde devam eden hastalığının aktivitesi ile ilişkilidir (37).

Önceleri, HBeAg negatif hastalarda klinik persistans ve aktif karaciğer hastalığının nadir olduğu düşünülmekteyken, son zamanlarda sıklığının artmakta olduğu gözlenmiştir. Avrupa'da birçok araştırmacı, HBeAg negatif KHB'nin, HBeAg pozitif KHB'ye göre daha fazla olduğuna inanmaktadır. Bu da, A1896 mutant suşun, vahşi tipten daha fazla olduğunu düşündürmektedir.

#### **1.3.3.2. X Bölgesi Mutasyonları**

Bazal kor promotor bölgesinin X geni ile çakışmasından dolayı; A1762T ve G1764A kor promotor mutasyonları, X geninde de değişikliklere sebep olur. Bazal kor promotor bölgesinde izlenen tüm delesyon ve insersiyonlar, X geninde çerçeve kayması oluşturarak, dallı ve kısa X proteinlerinin sentezlenmesine sebep olmaktadır. Oluşan mutant X proteinleri, HBx antijeninin gösterdiği transaktivasyon aktivitesini göstermemektedirler (24).

#### **1.3.3.3. S Mutasyonları**

HBV genomunun en yüksek düzeyde heterojenlik izlenen bölgesi, pre-S bölgesidir. Pre-S2 proteinlerini sentezlemeyen virüsler, özellikle asemptomatik taşıyıcılarda, baskın popülasyonlar olarak karşımıza çıkmaktadır. Polimeraz proteininin bağlayıcı, boşluk bırakıcı bölgesiyle çakışan pre-S2 bölgesi nedeniyle, bölgede oluşan mutasyonlar enzim aktivitesinde önemli değişikliklere neden olmaktadır (24).

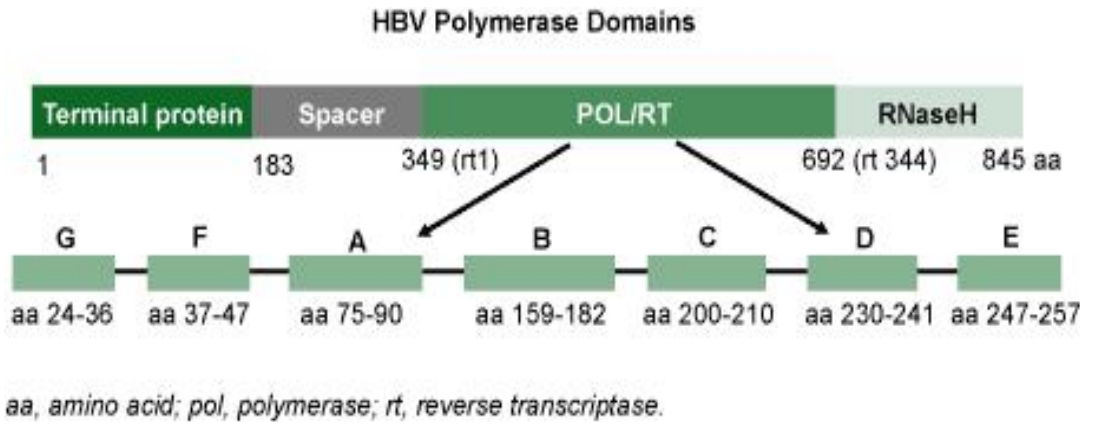
Günümüzde uygulanan birçok Hepatit B aşısı, HBs antijenini taşımakta, proteinin 99-170. pozisyonlarında yerleşen majör hidrofobik bölgeye karşı oluşan immün yanıt, bağışıklığı sağlamaktadır. Yüzey antijeninin 144. ve 145. pozisyonlarında meydana gelen mutasyonlar aşı başarısızlığı ile ilişkilendirilmektedir (24).

Hepatit B virüsü S geni mutasyonu, aşıya rağmen HBV enfeksiyonlu anneden doğan bebeklerde (38,39) ve HBIG ile profilaksiye rağmen HBV reenfeksiyonu gelişen karaciğer transplant alıcılarında gösterilmiştir (40,41).

#### 1.3.3.4. Polimeraz Bölgesi Mutasyonları

Polimeraz geni 3.5 kb RNA' dan sentezlenmektedir. 845 aminoasitten meydana gelmektedir. Polimeraz protein primer, bağlantı bölgesi (spacer), revers transkriptaz, DNA polimeraz, RNazH içermektedir.

Kronik hepatit B tedavisinde nükleotid/nükleozid analoglarının kullanılmaya başlanmasıyla, polimeraz bölgesinin önemi anlaşılmaya başlanmıştır. İlaç tedavisine direnç gösteren bu virüslerde, polimeraz bölgesinde mutasyon olduğu ortaya koyulmuştur. Bu mutasyonla, tedavi sonunda mutant virüsler, diğer virüslerin arasından seçilmekte, baskın tür halini almaktadır (24).



**Şekil 3.** Polimeraz proteininin yapısı

Kronik hepatit B tedavisinde HBV polimeraz/reverse transkriptaz (rt) geni tek hedefdir. Bu nedenle bu hastalarda antiviral direnç önemli sorunlardan biridir.

Kronik hepatit B tedavisi için geliştirilmiş olan antiviraller Nükleoz(t)id analoglarıdır.

Ancak bu antiviral ajanlar kendi içlerinde alt gruplara ayrılmaktadır (42) .

**1. L-nükleozid analogları:** Lamivudin (LMV), Emtrisitabine (FTC), Telbivudin (LdT) ve Klevudin (CLD);

**2. Asiklik fosfanatlar:** Adefovir (ADV) ve Tenofovir (TFV);

**3. Siklopentan halkası içeren grup:** Entekavir (ETV).

Bu kimyasal klasifikasyon etki paterni ve ilaç direnci yolu açısından önemlidir.

İlaç direncinin araştırılması için bazı belirteçler vardır;

1. Tedavisini düzenli alan ve tedaviye yanıt veren bir hastada iki ay arayla alınan iki serum örneğinde viral yükte 1.0 log<sub>10</sub> IU/ml artış olması

2. Nükleoz(t)id analogları bilinen genotipik markerlarının HBV polimeraz geninde gösterilmesi

İki tip mutasyon gösterilmiştir.

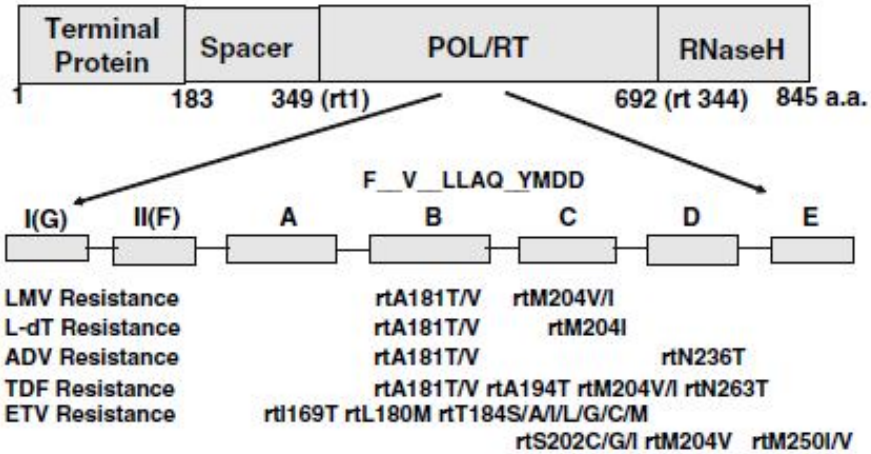
- Primer direnç mutasyonları (rtM204V/I, rtN236T)
- Sekonder/kompensatuvar mutasyonlar (rtL80V/I, rtL180M);

3. Serum ALT düzeyinde artış olması

4. Klinik kötüleşme olması

İlk bulgu virolojik direnci, ikinci bulgu genotipik direnci ve üç ve dördüncü bulgu ise klinik direnci göstermektedir (42).

HBV de tedavi yanıtızlığına yol açan polimeraz genindeki primer direnç mutasyon noktaları Şekil 4’ de gösterilmektedir.



Şekil 4. Polimeraz geni ve direnç mutasyon noktaları (42).

1. **L-nükleozid yolu (rtM204V/I)**; Bu mutasyon viral polimerazın C alanında bulunmaktadır. rtM204V/I; YMDD mutasyonu olarak adlandırılmakta ve lamivudin, embtrisitabin, telbivudin ve klevudin tedavisi ile rtM204V/I mutant suşlar seçilmektedir.

C alanının rt203-rt206 kodonlarını oluşturan tirozin (Y), metiyonin (M), aspartat (D), aspartat (D) motifinde oluşan mutasyonlar ve 204. pozisyondaki metiyonin aminoasitinin başka bir aminoasit ile değişimine sebep olan mutasyonlar YMDD mutasyon motifi içerisinde yer almaktadır. Diğer mutasyon türleri ise YIDD (Tirozin-İzolösin-Aspartat-Aspartat) ve YVDD (Tirozin-Valin-Aspartat-Aspartat) dir.

İkinci mutasyon daha üst taraftaki B alanında bulunan rtL180M, kısmi dirence yol açarken, rtM204V ile beraber daha yüksek dirence sebep olmaktadır. Lamivudin almış olan hastalarda entekavir direnci de gözlenebilir (42).

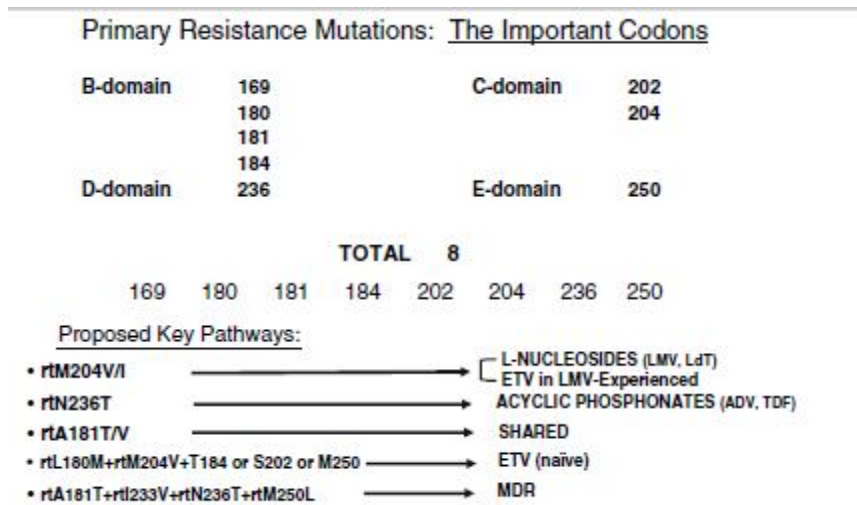
**2. Asiklik fosfanat yolu (rtN236T);** Adefovir ve Tenofovir tedavisi ile rtN236T HBV türümsüleri seçilmektedir. Viral polimerazın D alanında bulunmakta olan rtN236T invitro olarak 5-10 kat direnç artışına yol açmaktadır (42).

Tenofovir için HIV/HBV koenfekte olan hastalarda lamivudin ve emtrisitabine kombine tedavilerle yapılan çalışmalarda, rtA194T mutasyonunun dirence neden olduğu gösterilmiştir. Tek başına tenofovirle yapılan çalışmalarda henüz direnç saptanmamıştır (42).

**3. Ortak yol (rtA181T/V);** Hem L- nükleozid hem de asiklik fosfanatlarla tedavi sonrası rtA181T/V HBV türümsüleri oluşmaktadır. Bu direnç noktası, adefovir tedavi başarısızlığında %40 ve lamivudin tedavi başarısızlığında %5 den az görülmektedir (42).

**4. Naiv entekavir direnç noktası;** Entekavir direncine HBV polimerazın B alanı (rtT184G, rtI169T), C alanı (rtS202G/I) ve E alanındaki (rtM250V) mutasyonlar neden olmaktadır. rtL180M + rtM204V mutasyonlarına ilave olarak rtT184, S202 ve ya M250 kodon değişikliklerinden biri gözlenmektedir. Direncin gelişebilmesi için üç mutasyon gerektiğinden dolayı entekavir çok düşük direnç profiline sahiptir (42).

**5. Çoklu ilaç direnci gelişme yolları;** Kompleks bir patern ve HBV polimerazda mutasyon kümeleri olması gerekmektedir (42).



**Şekil 5.** Polimeraz geninde direnç gözlenen alanlar (42).

## 1.4. Hepatit B'nin Patogenezi

Hepatit B virüsü ilişkili karaciğer hastalığının patogenezi, immün aracılı mekanizmalara bağlı olduğundan dolayı oldukça geniştir. Bununla beraber; bazı durumlarda HBV karaciğere direkt sitopatik etkili olabilir.

### 1.4.1. İmmün Aracılı Karaciğer Hasarı

Hepatit B virüsü direkt sitopatik etkili bir virüs değildir. HBV virüsü, karaciğerde nekroinflamatuvar lenfomononukleer hücre infiltrasyonu ve kupffer hücre hiperplazisine neden olmaktadır (43,44).

Akut viral enfeksiyonlu hastalarda; hepatit B virüsünün; zarf, kor ve polimeraz proteinleri gibi HBV antijenine karşı gelişen, multispesifik, poliklonal, sitotoksik T hücre yanıtı ile viral temizlenmenin başarıyla sağlandığı gösterilmiştir (43-45).

Ayrıca sitotoksik T hücre (CTL) yanıtına ek olarak, hepatit B virüsüne özgül T helper hücre yanıtı da gelişir. Yani; HBV enfeksiyonun seyri güçlü ve etkili hücrel immün yanıtla bağlıdır (46). Bu yanıtın zayıf olduğu ve ya olmadığı durumlarda virüs temizlenemez ve hastalık kronik hale döner (43, 44).

Enfeksiyonun erken fazında; tip 1 IFN alfa üretimi, doğal öldürücü (NK) hücre aktivasyonunda ve IFN gama üreten CD8<sup>+</sup> T hücre sayısında artış olduğu gösterilmiştir (47,48). Tip 1 IFN gama üretimi, direkt olarak HBV ile indüklenir. Akut hepatitte, karaciğerde IFN gama üreten hücre varlığı, HBV'nin Tip 1 IFN gama için güçlü bir uyarıcı olduğunu düşündürmektedir (46).

Akut hepatitin erken döneminde IFN gama ve tümör nekroz faktör alfa (TNF $\alpha$ ) ve NK hücreleri önemli bir role sahiptir. NK-T hücrelerinin; IFN gama üreterek viral replikasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir (49). CTL antiviral aktivitesi, tip 1 inflamatuvar sitokinlerin üretimi ile sitolitik olmayan mekanizmayla başlar (50). Bu sitokinlerin aktivasyonu ile ilk olarak; hepatositte viral nükleokapsid partiküllerinin oluşumunun inhibisyonu ve replike olan viral genomun eliminasyonu sağlanır, ikinci olarak viral RNA'nın post transkripsiyonel down regülasyonu etkilenir. Eğer HBV; IFN gama gibi antiviral sitokinlerin lokal üretimini indüklerse, o zaman spesifik olmayan immün yanıtla viral temizlenme sağlanabilir (46).

Akut, kendini sınırlayan hepatit B enfeksiyonunda; HBV replikasyon ve maturasyonuna karşı karaciğerden IFN gama ve TNF- $\alpha$  üretimi olur (51). Bundan kısa bir süre sonra da, adaptif immün yanıtın aktivasyonu gözlenir. Adaptif immün yanıtın aktivasyonu, düşük titrede HBV içeren karaciğer hücrelerinin lizisine neden olur (52).

Akut hepatit B'de konağın immün yanıtı tam ise ciddi hepatosit hasarı gelişir ve bunun sonucu olarak transaminazlarda yükselme gözlenir (47).

Kronik hepatit B'nin akut alevlenmesi; çoğunlukla HBeAg pozitif olan hastalarda gözlenir (53). Karaciğer hastalığının ilerlemesine ve ciddi vakalarda karaciğer yetmezliğine neden olmaktadır. Akut alevlenmeler; kendiliğinden ve ya konağın immün durumunu değiştiren tedaviler ile olabilmektedir (46). Yani kronik hepatit B'nin akut alevlenmesi, immün yanıtla HBV arasındaki dengenin bozulmasıyla ortaya çıkmaktadır. Yapılan çalışmalarda, akut alevlenmelerde HBcAg ve HBeAg'ye karşı artan bir T hücre yanıtı olduğu gösterilmiştir (54).

Akut alevlenmeden önce, viral nükleotid değişikliklerinin eşlik ettiği viral replikasyonda dalgalanmalar gözlenmekte, bu da konağın virüse toleransında dengenin bozulmasına neden olmaktadır (55). Kronik hepatit B'nin akut alevlenmesinden sonra, HBV genomunda özellikle kor, kor-promotor ve polimeraz genlerinde varyasyonlar gösterilmiştir (56). Bununla beraber; akut alevlenmede viral genomun %50'sinde değişiklik olmamaktadır. Akut alevlenme sonrası ortaya çıkan varyantların replikasyon potansiyeli artmış değildir. Ancak oluşan yeni HBV varyantları; akut alevlenme öncesi olan suşla aynı olabilirken, konağın immün yanıtından kaçabilen yeni varyantlar da meydana gelmiş olabilir. Yapılan çalışmaların sonuçlarına göre; kronik hepatitin ilk akut alevlenmesinde, alevlenme öncesi viral genomda varyasyon olması nadirdir ve bu genomik varyasyon akut alevlenmeye neden olmamaktadır.

Hepatit B virüsünün sebep olduğu karaciğer hasarının, enfekte hepatositlerin sitotoksik T lenfositler aracılığıyla yıkımına bağlı olduğu gösterilmiştir (57). Spontan ve ya antiviral tedavinin indüklediği immün temizlenmenin arttığı durumlarda, karaciğer hastalığında alevlenmeler gözlenir. Kronik hepatit B'nin akut alevlenmesinin gözleendiği hastaların %93'ünde; serum ALT seviyesinin pik

yapmasından önce, viral yük genellikle pik yapar. Diğer %7'lik hasta grubunda ise, viral yükte artış ile ALT piki aynı zamanda gözlenmektedir.

Fulminan hepatit gelişen hastalarda, sıklıkla HBV replikasyonuna ait kanıt bulunmamaktadır. Fulminan klinik tablonun, hızlı ve agresif immün yanıtla bağlı olduğuna inanılmaktadır. Bununla beraber; immün aracılı viral temizlenme, sitokin salınımı gibi sitolitik olmayan yollarla da oluşabilir. Kronik hepatit B'deki sitolitik olmayan ve sitolitik immün temizlenmenin rolleri henüz kesinleştirilmemiştir (58).

#### **1.4.2. Direkt Sitopatik Etki**

Karaciğer transplantasyonu sonrası, rekürren hepatit B'li bazı hastalarda ortaya çıkan fibrozlu kolestatik hepatitte, viral yük çok yüksek olduğunda direkt sitopatik etki gözlenebilmesi dışında, HBV virüsü direkt olarak hepatositlere hasar veren bir virüs değildir (59).

Kronik hepatit B'li birçok hastada viral yük ve karaciğer hastalığının ciddiyeti arasında direkt bir korelasyon yoktur.

#### **1.5. Hepatit B Enfeksiyonunda Klinik**

Hepatit B enfeksiyonu akut enfeksiyon ve kronik enfeksiyon olarak iki formda görülmektedir.

##### **1.5.1. Akut Hepatit B**

Hepatit B virüsü ile enfekte olan erişkinlerin %5-20'sinde akut enfeksiyon gelişmektedir. Akut HBV enfeksiyonunun klinik bulguları ve enfeksiyonun seyri; virüsün alındığı yaş, virüsün genetik yapısı, eşlik eden bir başka hepatotrop virüs enfeksiyonu varlığı ile konakçının immün durumu gibi faktörlere bağlı olarak değişmektedir (60).

Vakaların %60 ile %80'inde akut enfeksiyon klinik olarak asemptomatik ve ya karaciğer enzimlerinde serum alanin aminotransferaz (ALT) ve aspartat aminotransferaz (AST) yüksekliğiyle beraber, HBsAg ve HBV DNA düzeylerinin yüksek olduğu hafif subklinik formda gözlenmektedir (60).

Akut hepatit B seyrinde; inkübasyon, preikterik dönem, ikterik dönem ve konvelesan dönem olmak üzere dört klinik dönem izlenir

Akut hepatit B'de inkübasyon süresi 60-180 gündür. İnkübasyon döneminden sonra **preikterik dönem** başlar. Bu dönem yaklaşık 3-10 gün sürer. Bu dönemde

bulantı-kusma, grip benzeri şikayetler, halsizlik, yorgunluk, iştahsızlık, sağ üst kadranda hafif künt bir ağrı ile yemek ve sigaraya karşı tiksinti gibi semptomlar gözlenir. İmmün kompleks oluşumuna bağlı ürtikeryal ve makülopapüler döküntüler gözlenebilir. Hastaların %30 kadarında amilaz yüksekliği görülür. Nadiren pankreatit kliniği gözlenir. Yine nadiren de olsa perikardit, miyokardit, plevral effüzyon, aplastik anemi, ensefalit, polinörit gözlenebilir (60).

Preikterik dönemde gözlenen semptomlarda düzelmeye başlayan **ikterik dönemde**; idrar renginde koyulaşma ve gaita renginde açılmanın eşlik ettiği sarılık gözlenir. Sarılık, beş yaş altındaki çocuklarda %10 gözlenirken, 5 yaş üstü ve erişkinlerde %50 oranında gözlenir. Bilirübin yüksekliği 2,5 – 3 mg/dl'nin üzerine çıktığı durumlarda skleralarda ikter gözlenir. Sarılık nadiren 4 haftayı geçer, çoğunlukla 1-3 hafta kadar sürer.

Fizik muayenede; hepatomegali %10, splenomegali %5, lenfadenopati %5 oranında görülür (60).

Hastaların %90-95'inde klinik olarak iyileşme saptanmaktadır. Enfeksiyonun seyri, konağın verdiği immün yanıtla bağlıdır. Viral replikasyonun gerçekleştiği hepatosite karşı immün saldırı sonucunda hepatosit nekrozu gelişir. HBV'ye karşı gelişen etkili ve yeterli immün yanıtla iyileşme sağlanır (60).

Primer enfeksiyonda, virüs mililitrede  $10^9$ - $10^{10}$  civarındadır. Hepatit B virüsü yüzey antijeni HBsAg, inkübasyon periyodu sonrası kanda görülmeye başlar. Bundan kısa bir süre sonra HBV kor antijenlerine (HBcAg) karşı gelişen antikorlar (Anti-HBc) ortaya çıkar. Bu antikorlar; erken enfeksiyonda, esas olarak IgM tipi antikorlardır. Çoğu vakada, serumda HBeAg saptanır. Bu dönemde hem horizontal, hem vertikal bulaş çok fazladır. T hücre bağımlı immün yanıt oluşuncaya kadar ALT normaldir. Bu cevap oluştuğundan sonra hem kan, hem karaciğerde virüs titresi düşer. İmmün temizlenme beraber, dolaşımdan HBsAg ve HBeAg kaybolur. Anti HBs antikorları saptanmaya başlar. Uzamış klinik seyirde; 3-4 aydan bir yıla kadar semptomlar devam edebilir, bu durumda HDV ile koenfeksiyon ve ya kronikleşme hatırdadır tutulmalıdır (60).

Bazı akut hepatit B'li vakalarda ateş, karın ağrısı, sarılık, kusma gibi ani başlayan semptomlarla beraber hepatik komanın eşlik ettiği fulminan hepatit tablosu da gözlenebilir. İkter başladıktan genellikle iki hafta içerisinde ve ya semptomlar

başladıktan sekiz hafta içinde gelişen hepatik ensefalopati fulminan hepatitin ilk bulgusu olabilir. Nadir gözlenen bu durum, yüksek mortalite ile ilişkilidir. Uykuya meyil, dalgalılık hali, komaya kadar ilerleyen bilinç değişikliği, fizik muayene de flapping tremor, karaciğerde küçülme, serum transaminaz düzeylerinde ani azalma, protrombin zamanında uzama, oligüri, azotemi ve asit gelişmiş olması önemli bulgulardır. Ateş, lökositoz, hemorajiler oluşabilir. Bazı hastalarda karaciğer yetmezliğinin derecesine göre, HBsAg ve HBV DNA düzeyleri aniden düşer. Bu hastaları, karaciğer transplantasyonu yapılabilen merkezlere yönlendirmek gerekebilir (60).

### **1.5.2. Kronik Hepatit B'de Klinik**

Vahşi (Wild tip) ve Prekor mutant virüslerle oluşan, altı aydan daha uzun süreyle HBsAg pozitifliği, kronik hepatit B'yi desteklemektedir. Viral replikasyon, hem kanda hem de karaciğerde devam eder. Karaciğerde, hepatosit ölümünün eşlik ettiği inflamatuvar infiltratların varlığı, kronik viral hepatit için karakteristiktir (60).

Enfeksiyonun alındığı yaş, kronikleşme için önemli bir faktördür. Yenidoğan ve infant döneminde enfeksiyon alındıysa %95 oranında kronikleşme görülürken, neonatal periyot sonrası ilk 6 yaşta bulaş olması durumunda, kronikleşme oranı %30 dur. Erişkin çağda akut hepatit B geçirildiğinde kronikleşme oranı ise %3-5'dir (60).

Kronik viral hepatitli hastaların büyük çoğunluğu asemptomatiktir. Bu nedenle de hastalar genellikle enfekte olduklarının farkında değildirler. Bazı hastalarda halsizlik, yorgunluk, bulantı, sağ üst kadranda künt ağrı, kas ve eklem ağrıları gibi özgül olmayan şikayetler oluşabilir. Bununla birlikte, anksiyete başta olmak üzere bir takım psikiyatrik semptomlar, endişe hali, düşüncelerini yoğunlaştırmada güçlük, kas gerginliği, uyku bozuklukları ve depresyon görülebilir. Bu bulguların, hastaların yaşam kalitesini olumsuz etkilediği, mental ve genel sağlık skorlarında normal insanlara göre daha düşüklüğe sebep olduğu gösterilmiştir (60).

Kronik hepatit B dinamik bir süreçtir. Kronik hepatit B' nin doğal seyri 5 faz altında değerlendirilebilir (57,61).

#### **1.5.2.1. İmmün Toleran Faz**

Hepatit B e antijeni pozitifliği ve yüksek HBV DNA seviyesinin görüldüğü bu fazda; aminotransferaz seviyeleri normal ve ya düşük, karaciğer nekroinflamasyonu yok ve ya hafif düzeydedir. Progresyon olmaması ve ya yavaş

progresyon olması bu dönem için karakteristik bulgulardır. Bu fazda spontan HBeAg kaybı oranları çok düşüktür. Bu faz; yenidoğan döneminde ve ya yaşamlarının ilk yıllarında enfekte olan kişilerde daha sık gözlenir ve daha uzun sürer. Yüksek viremiden dolayı, bu hastalar oldukça bulaştırıcıdırlar (61).

#### **1.5.2.2. İmmün Temizlenme Fazı**

İmmüntoleran fazdan sonra gözlenen immün temizlenme fazı, birkaç hafta ile birkaç yıl devam edebilir. HBeAg pozitifliği, düşük serum HBVDNA düzeyi, artmış ve ya dalgalı seyir gösteren aminotransferaz düzeyleri, orta ve ya ciddi karaciğer nekroinflamasyonu, bir önceki faza göre fibrozisde daha hızlı ilerleme olması bu fazın karakteristik bulgularıdır. Vahşi (Wild) tip ile olan enfeksiyonda, spontan HBeAg kaybı oranı yüksektir. HBeAg serokonversiyonu olması % 85 klinik remisyon anlamına gelmektedir (61).

#### **1.5.2.3. İnaktif Taşıyıcı Fazı**

Bu faz çok düşük ve ya hiç olmayan HBV DNA düzeyleri ve normal aminotranferaz düzeyleri ile karakterizedir. İmmünolojik yanıtın kontrolünün bir sonucu olarak, bu dönemde hastaların büyük bir çoğunluğunda siroz ya da HCC' ye ilerleme oranı oldukça düşüktür. HBsAg kaybı ve Anti HBs'ye serokonversiyonu, uzun süre devam eden, saptanamaz HBV DNA düzeyinden birkaç yıl sonra, her yıl %1–3 oranında gözlenebilir (61).

#### **1.5.2.4. İmmün reaktif Faz**

İmmün reaktif fazı, HBeAg' nin anti-HBe' ye serokonversiyonu takip edebilir. Bazı hastalarda, HBeAg negatif bazal kor ve kor promotor bölgesinde olan değişiklik sonrası HBeAg sentezlenemez ve ya düşük düzeyde sentezlenir, ancak replikasyon devam eder. HBeAg negatif kronik hepatit B fazı başlar. Bu dönem kronik hepatit B' nin son fazı olabilir. Bu fazda; HBV DNA ile aminotransferaz düzeylerinde ve aktif hepatit tablosunda periyodik reaktivasyonlar gözlenir. HBeAg-negatif kronik hepatit B, spontan remisyon için düşük oranlara sahiptir. Bu fazı inaktif taşıyıcı fazından ayırmak önemli ve güçtür. Spontan remisyonunda gözlenebilir. İnaktif taşıyıcılar, komplikasyon gelişmesi açısından düşük riske sahip olduklarında iyi prognoza sahipken, HBeAg negatif kronik hepatit B de, karaciğer fibrozisinin ilerlemesiyle siroz ve dekompanse siroz ve hepatohüresel karsinom gibi komplikasyon görülme

oranı yüksektir. Hastalar dikkatle değerlendirilmeli, dalgalanmaları saptamak için en az bir yıl süreyle HBVDNA ve aminotransferaz (ALT) düzeyleri üç aylık aralıklarla takip edilmelidir (61).

#### **1.5.2.5. Düşük Replikatif Dönem**

Hepatit B yüzey antijeni negatif faz içinde, HBsAg kaybından sonra karaciğerde saptanabilir düzeyde HBVDNA düzeylerinin devam ettiği düşük replikatif bir dönem gözlenebilir. Genel olarak; AntiHBc antikorları (anti HBs varlığında ve ya yokluğunda) varken HBV DNA serumda saptanamamaktadır. HBsAg kaybı ile iyileşme ve siroz, dekompanseasyon ve HCC riski düşmektedir. Okkult hepatit B'de HBV DNA düzeyleri serumda saptanamayacak kadar düşüktür, ancak karaciğerde saptanabilir. Bu hastalarda immün süpresyon durumunda reaktivasyonlar gözlenebilir (61).

Bazı faktörler kronik hepatit B kliniğinin ağırlığını tahmin etmek için ön belirleyici olarak kabul edilmektedir. Enfekte kişinin ileri yaşta olması, HBV genotip C ile enfekte olması, HBV-DNA düzeylerinin yüksek olması, alkol alışkanlığının olması ve HCV, HDV ya da HIV ile koenfeksiyon olması durumunda hastalarda siroza ilerleme riski yüksektir (61).

Hepatohücrel karsinoma için risk faktörleri ise; erkek cinsiyet, ailede hepatohücrel karsinom öyküsü, ileri yaş, anti-HBe'nin HBeAg'ye geri dönme öyküsü, siroz varlığı, HBV genotip C ile enfeksiyon, kor promotör mutasyonu ve birlikte HCV enfeksiyonunun varlığı şeklinde sıralanabilir. Bazı diğer faktörler de kişiden bağımsız olarak siroza ya da hepatohücrel karsinoma ilerleme olasılığını artırabilir. Bu faktörler; aşırı alkol alımı, sigara kullanımı ve aflatoksin gibi karsinojen maddeler ile maruziyet olarak sıralanabilir (62).

### **1.6. HBV İnfeksiyonunda Tanı**

Hepatit B virüsü enfeksiyonunun tanısı; virolojik ve immünolojik markerler, karaciğer morfolojisi ve karaciğer fonksiyonlarının değerlendirilmesi ile yapılır (63).

#### **1.6.1. Serolojik Tanıda Kullanılan Markerlar**

**a) Hepatit B yüzey antijeni (HBsAg);** Hepatit B yüzey antijeni, pre-S/S geninden sentezlenen 3 viral proteine ayrılır. Majör yüzey proteini; S geninde üretilir,

en fazla üretilen proteindir; orta yüzey proteini; preS2/S geni tarafından sentezlenir ve büyük yüzey proteini preS1-preS2-S genince üretilir

Hepatit B yüzey antijeni (HBsAg); HBV ile enfekte olan hastaların kanında enfeksiyöz ya da enfeksiyöz olmayan sferik ve tübüler partiküller şeklinde ve yaklaşık  $10^{13}$  partikül / ml miktarında bulunur (64).

Hepatit B yüzey antijeni (HBsAg); akut enfeksiyon döneminde, bulaştan ortalama 6-10 hafta sonra ve klinik semptomların ve biyolojik bulguların oluşmasından birkaç hafta önce saptanabilir. Şu an ki HBsAg tarama testlerinin duyarlılığı % 99.5'den fazladır. Yalancı pozitiflik; hamilelerde, otoimmün hastalıklarda ve diğer sebeplere bağlı gelişen kronik karaciğer hastalıklarında görülebilir (65). Bazen heparinize, hemolize (hemoglobün >1.4 g/dL), ikterik (bilirubin >52.8 mmol) kan örneklerinde de gözlenebilir (66).

Hepatit B yüzey antijeninin (HBsAg) serumda saptanamadığı bazı klinik tablolar vardır;

(1) Asemptomatik HBV taşıyıcılarında, düşük replikasyon olması

(2) Bazı mutant suşlarda, S geninde oluşan nükleotid değişiklikleriyle HBsAg sentezlenememesi

(3) Başarılı bir antiviral tedavi sonrası, HBsAg kaybı, anti HBs serokonversiyonu olması

(4) Delta-HBV-koenfeksiyonu olması durumunda HDV' nin, HBV'yi baskılaması (67).

Hepatit B yüzey antijeni (HBsAg) ölçümü; tanı yanında, antiviral tedaviye yanıtın değerlendirilmesini sağlayan önemli bir markerdir. Antiviral tedaviyle, HBsAg'nin azalmasından sonra HBsAg temizlenmesinin oluşması tedavinin ana hedefidir. HBsAg temizlenmesinden sonra da, anti HBs'nin oluştuğu serokonversiyon dönemi gözlenir (68).

Kronik hepatit B'li Kafkas halkında spontan HBsAg temizlenmei %1–2 iken, perinatal dönemde ve ya erken çocukluk döneminde enfekte olan, yüksek endemisiteye sahip alanlarda yaşayanlarda bu oran daha düşük olup %0.1–0.8 oranındadır (63).

**b) Anti-Hepatit B Yüzey Antikorları (Anti-HBs);**

Anti HBs antikorlarının varlığı hepatit B'den iyileşmeyi ve uzun süreli bağışıklığın olduğunu göstermektedir. Zamanla anti HBs düzeyi tespit edilemez düzeye inebilir. HBV ile aşılama sonrası etkin koruyuculuk için titresi >10mIU/ml olmalıdır (69).

**c) Anti-Hepatit B kor (Anti-HBc) Antikorları:**

Anti-hepatit B kor (özyapı) antikorları, HBV enfeksiyonu erken döneminde saptanabilir. Anti-HBc antikorlarının iki izotipi vardır (69);

- **Anti-HBc IgM;** Akut enfeksiyonda, kronik hepatitin immün eliminasyonunda, düşük titrede ve inaktif taşıyıcılık alevlenmesinde yükselir. HBsAg'nin serumda saptanmasından kısa bir süre sonra saptanır. Birkaç hafta (4-8 hafta) sonra pik seviyeye ulaşır. 4-8 ayda (bazen 12 ayda) kaybolur.

- **Anti-HBc IgG;** HBsAg ile paralel yükselir. Anti HBcIgM yükseldikten kısa bir süre sonra saptanmaya başlar ve HBV enfeksiyonu sonlanıncaya kadar devam eder. Pencere döneminde sadece anti-HBc total pozitifliği gözlenir.

Anti-HBc antikorlarının yanlış negatifliği nadiren immün baskılanmış hastalarda gözlenir (69).

**d) Hepatit B e Antijen (HBeAg) ve Anti-HBe Antikorları:**

**Hepatit B e antijeni;** PreC/C geni tarafından kodlanan, yapısal olmayan bir proteindir. Enfekte hücrelerce, 16 ile 20 kDa ağırlığında çeşitli formları sentezlenir. HBe protein sekresyonu, HBV yaşam siklüsü için temel değil gibi görünse de, varlığı immün tolerans ve yüksek viral replikasyon ve hastalığın bulaştırılabilme özelliği ile ilgilidir (69). HBV replikasyonlarının seviyesi ve enfektivite potansiyellerini göstermektedir.

Enfeksiyondan sonra, HBeAg ortalama 6–12 hafta boyunca saptanabilmektedir. HBeAg temizlenmesi vireminin azalması ve aminotransferaz alevlenmesi ile ilişkilidir. Temizlenmenin ardından, anti-HBe antikorlarının ortaya çıktığı serokonversiyon fazı gözlenir. HBeAg'nin persistansı, genellikle kronik hepatit B'li hastalarda gözlenir (69).

Kronik hepatit B'de, HBeAg pozitif ve HBeAg negatif olmak üzere iki fenotipik form gözlenir.

İmmün temizlenme fazın önemli bir sonucu olan HBeAg'nin serokonversiyonu ile AntiHBe antikorları oluşur. HBeAg serokonversiyonu HBeAg negatif kronik hepatit B ve ya normal aminotranferaz ve saptanamayan HBV DNA(<2000 IU/ml) düzeyi olan inaktif taşıyıcı fazı ile sonuçlanabilir. Kronik hepatit B'li hastalarda HBeAg'nin spontan serotemizlenmesi %5–15 oranında gözlenmektedir (70, 71) .

**e) Hepatit B virüs (HBV) DNA tarama ve HBV DNA seviyelerinin ölçümü.**

Tedavi endikasyonu, tedavi izlemi, viral reaktivasyonun saptanması için HBV DNA ölçümü temel testlerdendir. HBVDNA'nın kantitasyonu için duyarlılık ve özgüllüğü nedeniyle, real-time polimeraz zincir reaksiyonu (RTq-PCR) kullanılmaktadır (69).

**f) Diğer viral enfeksiyonların araştırılması;**

Anti-HDV, anti-HCV ve anti-HIV antikorları bakılmalı, şüphe halinde ileri testler uygulanmalıdır. HBsAg pozitif olan hastalarda, HDV enfeksiyonu saptanabilir. Anti HDV antikorları ve HDV RNA düzeyleri serumda ve karaciğerde saptanabilir (69).

**1.6.1.1. Akut Enfeksiyonda Serolojik Tanı**

Akut HBV enfeksiyonu sırasında, virüse ait ilk saptanan antijen HBsAg'dir. Serumda, HBsAg hastalık semptomları ortaya çıkmadan 3-5 hafta önce saptanabilir düzeye ulaşmakta, seviyesi giderek yükselerek akut enfeksiyon sırasında en üst seviyeye çıkmaktadır. İyileşme ile sonlanan olgularda 2-6 ay içinde azalarak ortadan kaybolmaktadır. Kaybolduktan bir müddet sonra, serumda HBsAg'ye karşı oluşan koruyucu anti-HBs antikorları ortaya çıkmakta ve genellikle hayat boyu saptanabilir bir düzeyde kalmaktadırlar. Akut dönemde, anti-HBs antikorlarının daha erken oluştuğu, ancak çok fazla miktarda HBsAg bulunması dolayısıyla oluşan immün komplekslerin bunları maskeleydiği düşünülmektedir. HBsAg'nin ortadan kaybolduğu ve henüz anti-HBs antikorlarının saptanamadığı bu döneme “pencere dönemi” ismi verilmektedir. Bu dönemde hem HBsAg, hem de anti-HBs antikoru negatif olarak bulunmaktadır (69).

Akut HBV enfeksiyonundan sonra, anti-HBs antikorlarının oluşması, hastalığın iyileşme ile sonlandığını ve bağışıklık oluştuğunu göstermektedir. Akut

HBV enfeksiyonu dışında, hepatit B aşılama sonrası da anti-HBs serumda tespit edilebilir. Hepatit B immünglobülin verilmesi, kan transfüzyonu ve anneden bebeğe pasif olarak geçiş olması nedeniyle de serumda anti-HBs saptanabilmektedir. Pasif olarak alınan bu antikolar, birkaç ay içinde ortadan kaybolmaktadır.

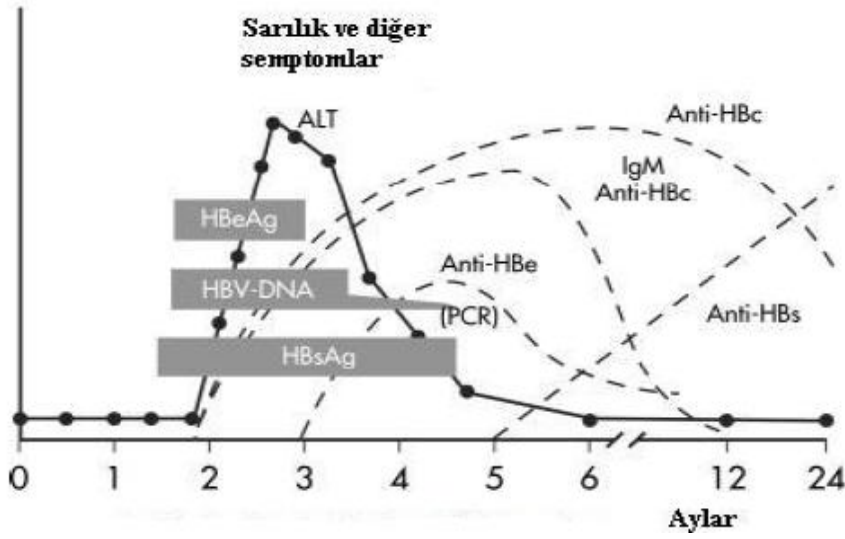
Serumda anti-HBs seviyesinin 10 mIU/mL'nin üzerinde olması, bağışıklık seviyesinin üzerinde bir antikor titresinin var olduğunu ve kişinin bağışık olduğunu gösterir. Akut HBV enfeksiyonundan sonra, 6 aydan daha uzun süre serumda HBsAg pozitif olarak kalıyor ise; hastalığın kronikleştiği düşünülmelidir. Kronik HBV enfeksiyonlarında genellikle anti-HBs antikoları saptanamamaktadır (72).

Akut enfeksiyon sırasında, HBsAg'nin ortaya çıkmasından kısa bir süre sonra, serumda HBeAg ortaya çıkmakta, HBsAg ortadan kaybolmadan önce ortadan kaybolmaktadır. HBeAg'nin kaybından kısa bir süre sonra, anti-HBe antikoları ortaya çıkmaktadır. Anti-HBe antikolarının serumda tespit edilmesi; viral replikasyonun azaldığını ve hastalığın iyileşmeye doğru gittiği göstermektedir. Ancak prekor bölgesinde mutasyon sonucu oluşan mutant suşlarla meydana gelen enfeksiyon sırasında, hasta serumunda anti-HBe pozitif olmasına rağmen aktif viral replikasyon ve enfeksiyon tablosu devam etmektedir.

Hepatit B e antijeninin (HBeAg) serumdaki varlığının 3-4 aydan uzun sürmesi, kronik enfeksiyona gidişi göstermektedir. Kronik enfeksiyonda HBeAg'nin pozitifliğinin sürmesi ise ağır karaciğer hastalığı gelişme riskini artırmaktadır (72).

Bütün serolojik göstergeler negatif olmasına karşılık, tek başına anti-HBc IgG pozitifliği şu durumlarda gözlenmektedir;

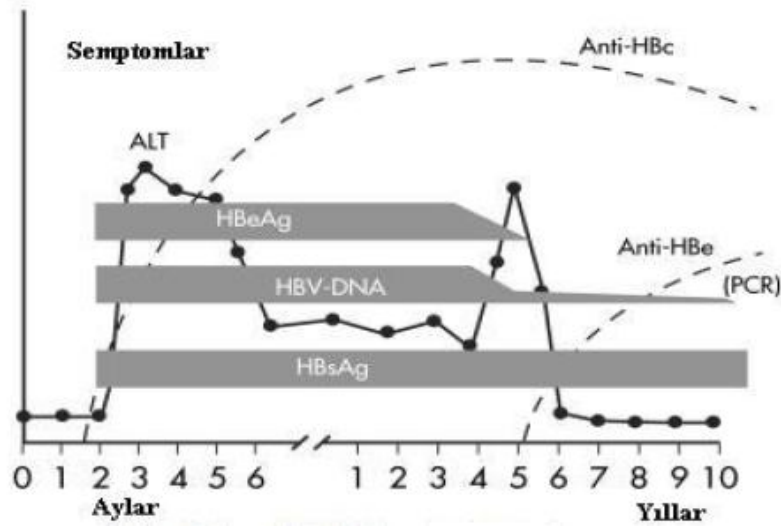
- a) Hepatit B enfeksiyonu iyileşmiş, ancak serum anti-HBs düzeyi saptanamayacak kadar azalmış olan kişiler.
- b) HBsAg düzeyi saptanamayacak kadar düşük olan kronik enfeksiyonlu kişiler
- c) Uzamış pencere dönemi.
- d) Yalancı pozitiflik.
- e) Pasif olarak anti-HBc IgG kazanılması.



Şekil 6. Akut HBV serolojisi (69).

### 1.6.1.2. Kronik Hepatit B Enfeksiyonunda Serolojik Tanı

Kronik hepatit B enfeksiyonlu hastalarda, HBsAg düzeyi 6 aydan daha uzun süre pozitif seyrederek. Beraberinde AntiHBcIgG pozitifliği mevcuttur. Bu markerların yanında, virüs mutasyon durumunun ve infektivite potansiyelinin kaba göstergesi olan; HBeAg ve anti-HBe düzeylerinin incelenmesi gerekmektedir (69-70).



Şekil 7. Kronik HBV serolojisi (69).

### 1.6.2. Moleküler Tanı Yöntemleri

Hepatit B virüsü enfeksiyonunun tanısında moleküler tanı yöntemleri; HBV-DNA düzeyi, HBV genotipinin tayini, HBV mutasyonlarının saptanması ve serolojik yöntemlerle tanı zorluklarında yardımcı olan testlerdir (69).

Moleküler tanı konusundaki en önemli gelişme; HBV-DNA testlerinin sensitivitesini arttıran "real time PCR" tekniğinin ortaya çıkması ve gelişmesidir. Bu

yöntem sayesinde sonuçlar kantitatif olarak, daha kısa zamanda verilmekte ve farklı HBV genotiplerini saptamak mümkün olmaktadır. Ancak çeşitli kantitatif test sonuçları arasında standardizasyon sorunu bulunmaktadır. Moleküler tanı yöntemlerinin sıklıkla kullanıldığı alanlar (71, 72):

**1) HBV enfeksiyonunun tanısı:**

**2) Tedavi etkinliğinin izlenmesi;** HBV-DNA miktarının kantitatif olarak ölçülmesi, kullanılan tedavi şemasının etkili olup olmadığının tespit edilmesinde, tedavi süresi ve dozunun belirlenmesinde ve gerektiği durumlarda tedavi protokolünün değiştirilmesinde yardımcı olmaktadır (69, 70).

**3) Mutant virüsün tanısı;** HBV-DNA'nın sekans analizi ile ilgili gen bölgelerindeki mutasyonlar saptanabilmektedir (69, 70).

**4) Antiviral ilaç direncinin saptanması;** HBV ilaç dirençlilik testleri; tek veya çoklu mutasyonları saptayan genotipik testler ve ya viral genomun ilgili vektörlerle hücre içerisine konulması ve ilaç varlığında HBV'nin replikasyonunu direkt olarak ölçen fenotipik testlerdir. Duyarlı testler kullanılarak yapılan HBV direnç tayininin, HBV-DNA miktarının ve transaminaz düzeylerinin yükselmesinden daha önce belirlenebileceği, çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. İlaç direnci geliştiğinde, hastalığın aktivitesinde artış kaydedildiğinden, ilaç direncinin bu aktivite görülmeden saptanması ile ağır karaciğer hasarı önlenmektedir (69).

Hepatit B virüsü genomunun herhangi bir bölgesinde oluşan mutasyon diğer genlerin oluşturduğu ürünleri de etkilemektedir. P ORF'de oluşan mutasyonlar, daha çok ilaçlara direnci etkilerken aynı zamanda S ORF ürünlerinin ortaya çıkışını da etkilemektedir (73).

Hepatit B virüsü coğrafi dağılımları %8 ve daha fazla nükleotid farklılığı temelinde birbirinden farklı 6 majör (A-H) genotipe sahiptir (73). Akdeniz ülkelerinde en sık genotip D gözlenmektedir. Genotipik farklılıklar ve hastalığın seyri arasında bağlantılar olduğu gösterilmiştir. Genotip C'de B'ye göre sirozlu olgular daha fazladır. Tersine; HBeAg serokonversiyonu, genotip B'de C'ye göre daha fazla görülmektedir. Genotip B, genotip C'ye göre daha yavaş progresyon göstermektedir. Genotip A'da D'ye göre daha fazla HBsAg temizlenmei gözlenmektedir. Karaciğer hastalığına bağlı ölümler, genotip F'de daha fazla gözlenir (74).

Hepadnavirüslerin yıllık mutasyon hızı,  $2 \times 10^4$  baz değişimi / bölge olarak değerlendirilmektedir (73). Genotipik farklılıklara göre mutasyon hızları da farklılık göstermektedir (74). Bazı mutasyonlar virüsün çoğalması için sorun oluştururken, bazıları ise avantaj sağlamaktadır. Nükleotid ve nükleozid analogları ile uzun süreli tedavi sonucunda gelişen mutant suşların seçimi, HBsAg'de de yapısal değişime sebep olup, antijenik yapının değişmesine neden olabilmektedir (75).

Antiviral ilaçlara karşı gelişen direnç birbirleri ile ilgili en az altı farklı fonksiyona bağlı olarak gelişebilmektedir;

- a) Viral replikasyon hızı
- b) Viral mutasyon hızı
- c) Antivirallerin hedef bölgesindeki mutasyona yatkınlık
- d) İlaçların seçicilik baskısı
- e) Replikasyon uyumu ve ya ilaca dirençli mutant suşların (doğal virüsle karşılaştırıldığında) replikasyon kapasitesi
- f) Replikasyon alanının uygunluğu (76).

Yüksek viral yüke ( $10^{11}$ - $10^{12}$ ) sahip bireylerde günlük %50'lere varan turnover görülmektedir. Bu olgularda, her revers transkripsiyon döngüsünde  $10^4$ - $10^5$  mutasyon beklenmekte, tek nokta mutasyonları kadar, 2-3 nokta mutasyonları da görülmektedir. Bu nedenle; ilaca dirençli quasispecieslerin (yeni ürünlerin), minör komponent olarakda olsa, daha tedavi başlanmadan bulaşma sırasında bulunması muhtemeldir. İlaçların seçici baskısının yokluğunda, en hızlı üreyen türümsülerin baskın olması, beklenen doğal bir sonuçtur (77).

## **1.7. Kronik Hepatit B'de Tedavi**

### **1.7.1. Antiviral Tedavi Endikasyonları**

Kronik hepatit B de tedavi amacı; hayat kalitesini artırmak, kompanse ve dekompanse siroz, son dönem karaciğer hastalığı, HCC ve ölüm gibi hastalığın getirdiği kötü sonuçların ortaya çıkmasını engellemektir (78). HBV replikasyonun baskılanması ile histolojik aktivite azalmakta, bu da siroz ve HCC riskinin azalmasına neden olmaktadır (61). Fakat enfekte hepatositlerin nükleusunda saklı kalan cccDNA nedeniyle, HBV enfeksiyonu tamamen eradike edilememektedir.

Antiviral tedavi ile viral yükün azaltılması, ALT seviyelerinin normalleştirilmesi ve karaciğerdeki hastalığın remisyonu amaçlanmaktadır.

Kronik hepatit B'li hastalarda tedavi, immün aktif fazda endikedir. Bu faz; viral replikasyonun yüksek olduğu ve HBV içeren hepatositlerin, immün aracılı olarak hasara uğratıldığı fazdır. Bu dönemde ALT düzeyi yüksektir. Karaciğer histolojisinde enflamatuvar aktivite gözlenir ve hastalığın süresine bağlı olarak değişik derecelerde fibrozis gözlenir (78).

Hepatit B e antijeni-pozitif ve HBeAg-negatif hastalardaki tedavi endikasyonları genel olarak aynıdır. Genel olarak serum HBV DNA düzeyleri, serum aminotransferaz düzeyleri, histolojik grade ve evre kriterlerinin kombinasyonundan oluşmaktadır.

Hepatit B virüsü DNA düzeyi,2000 IU/ml (10,000 kopya/ml) üzerinde ve serum ALT düzeyi normalin üst sınırının üzerinde olan, karaciğer biyopsisinde orta düzeyde ve ya ciddi nekroinflamasyon ve/ve ya standart skorlama sistemine göre orta ya da ciddi fibrozis olan hastalar tedavi edilmelidir (61).

Tedavi endikasyonunu değerlendirirken; hastanın yaşı, sağlık durumu, antiviral ilacın temin edilebilirliği gibi durumlar hesaba katılmalıdır.

**a) İmmünotoleran fazdaki hastalar:** Bu gruptaki hastaların çoğu 30 yaş altındadır. Bu hastalarda ALT düzeyleri sürekli normal ve HBVDNA düzeyleri genellikle  $10^7$  IU/ml'nin üzerindedir. Herhangi bir karaciğer hastalığı şüphesi yoktur. HCC ve siroz gibi hastalıklara ait aile hikayesi yoksa karaciğer biyopsi yapılması gerekmemektedir. Bu hastalar düzenli aralıklarla takip edilmelidir (61).

**b) Hafif KHB'li hastalar:** Hafif düzeyde yüksek ALT (normalin üst sınırının iki katından az) ve hafif histolojik hastalık (METAVIR ile A2-F2 den daha az ) olması durumunda tedavi gerekmemektedir. Takip önerilir (61).

**c) Kompanse sirozlu ve saptanabilen HBVDNA'sı olan hastalarda;** ALT seviyesi normal ve HBVDNA seviyesi 2000 IU/ml (10,000 kopya/ml)'nin altında olsa bile tedavi açısından değerlendirilmelidir (61).

**d) Dekompanse sirozlu hastalara;** acil antiviral tedavi gerekmektedir. Bu grup içinde, özellikle hızlı ve etkili viral süpresyonun sağlanması ve direnç gelişiminin önlenmesi gerekmektedir. Anlamlı klinik iyileşme, viral replikasyonun

kontrolü ile sağlanabilir. Fakat hastada fazla ilerlemiş bir karaciğer hastalığı var ve tedavi geciktiyse, hasta karaciğer transplantasyonu için değerlendirilmelidir (61).

### **1.7.2. KHB' de Tedavi Seçenekleri**

Kronik HBV enfeksiyonlu hastanın ilk değerlendirilmesinde anamnez alınıp, tam bir fizik muayene yapılmalı ve hastalık öyküsü incelenmelidir. Özellikle koenfeksiyon açısından risk faktörleri, alkol kullanımı, ailesel HBV enfeksiyonu ve karaciğer kanseri hikayesi sorgulanmalıdır.

Karaciğer hastalığının değerlendirilmesi için; karaciğer fonksiyon testleri, HBV replikasyon belirteçleri ve risk tarif edenlerde HIV, HDV ve HCV koenfeksiyonu araştırılır. Eğer bağışık değilse hepatit A için aşı yapılmalıdır (62,79).

İlk değerlendirmeden sonra bazı hasta gruplarında tedaviye başlamadan izlemek gerekebilir. Bu hastalar;

- a ) HBeAg pozitif, HBV-DNA'sı 20.000 IU/mL'den fazla ve ALT düzeyi normal olan grup ve
- b ) İnaktif HBsAg taşıyıcıları grubu

olarak iki şekilde sınıflandırılabilir. Her iki gruptaki hastalarda da hepatohüresel karsinom için tarama yapılması gereklidir (79).

Birinci gruptaki hastalar, her 3-6 ayda bir ALT düzeyleri bakılarak izlenirler. Eğer ardışık iki ALT seviyesi, normalin üst limitinden 1-2 kat yüksek ve hastanın yaşı da 40'ın üzerinde ise karaciğer biyopsisi yapılır. Biyopside orta / şiddetli inflamasyon ve belirgin fibroz saptanmış ise, hastaya tedavi başlanması açısından değerlendirilir. Ardışık iki ALT düzeyi normalin üst limitinin 2 katından daha yüksek olan hastalara ise direkt biyopsi yapılarak tedavi başlanır (79).

İnaktif HBsAg taşıyıcıları ise; ilk yıl her üç ayda bir ALT düzeyleri bakılarak takip edilir. İlk yıl ALT normal seviyelerde ise, takip aralıkları 6-12 aya çıkarılabilir. Eğer ALT düzeyi, normalin üst sınırından 1-2 kat fazla ise, diğer karaciğer hastalığı nedenleri araştırılır ve HBV-DNA düzeyi tekrar bakılır. HBV-DNA düzeyi 20.000 IU/mL'nin üzerinde ve ALT düzeyleri aynı seviyelerde ise, hasta karaciğer biyopsisi için değerlendirilir. Biyopside belirgin fibroz veya orta / şiddetli inflamasyon görülür ise, hasta tedavi başlanması için değerlendirilir (79).

**Kronik hepatit B tedavisinin hedefleri;** HBV replikasyonunu durdurmak veya belirgin oranda azaltmak, siroz, karaciğer yetersizliği ve hepatohüresel karsinoma gelişimini önlemektir. HBV-DNA'nın azalması ya da negatifleşmesi birincil hedef olarak görülmektedir. Bunun yanı sıra; ALT seviyesinin normale dönmesi ve histolojik iyileşme sağlanması diğer hedefler arasındadır. Eğer HBeAg pozitif ise; HBeAg'nin negatifleşmesi ve anti-HBe serokonversiyonu diğer bir hedef olarak sayılabilir. Özellikle hasta, interferon dışı bir antiviral tedavi alıyorsa, tedavinin sonlandırılma kararında HBeAg'nin negatifleşmesi önemli bir noktadır. HBsAg negatifleşmesi ya da serokonversiyonu nadir ancak ideal hedeftir (79).

### **1.7.2.1. KHB Tedavisinde Pegile İnterferonlar**

İnterferon molekülüne bir polietilen glikol polimerinin bağlanması esasına dayanan pegilasyon teknolojisi, uzamış plazma ömrüne sahip interferonların kullanıma sunulmasını sağlamıştır. Pegile interferonlarla ilgili yapılan çalışmaların sonuçları incelendiğinde, tedavi sonunda pegile interferonların; HBeAg serokonversiyonu, transaminaz normalizasyonu, kalıcı viral yanıt ve HBV-DNA negatifleşmesi açısından standart interferonlara göre daha avantajlı oldukları görülmüştür (80,81).

Hepatit B e antijeni pozitif, ALT nin normalin beş katından yüksek, HBVDNA düzeyi <20,000,000 IU/mL olan, sirozu olmayan, genotip A ve ya B olan hastalarda, interferon tedavisine yanıt iyi olacağından, bu hasta grubunda ilk tercih tedavi, standart ve ya pegile interferon olmalıdır. İlerlemiş fibrozisi olan ( Ishak stage  $\geq 3$ ) ve interferona yanıtız olanlarda, nükleozid ve nükleotid analogları tercih edilmelidir (82).

Yapılan çalışmalarla, pegile interferonların güvenilirlik ve yan etki açısından, standart interferonlardan farklı olmadığı gösterilmiştir (82).

Pegile interferonların en sık yan etkileri; üst solunum yolu semptomları, ateş, saç dökülmesi, karında rahatsızlık, yorgunluk, eklem ağrısı, iştah azalması ve lokal eritamatöz reaksiyonlardır. % 10 kadar hastada kilo kaybı görülebilir (80, 81). Diğer oral antivirallerle kıyaslandığında, kalıcı viral yanıt oranları ve HBsAg kayıp oranları standart interferon (IFN) ve pegile interferon  $\alpha$ -2a (PEG IFN $\alpha$ 2a) tedavisinde daha yüksek oranlar saptanmıştır.

### **1.7.2.2. KHB Tedavisinde Nükleozid/Nükleotid Analogları**

Nükleoz(t)id analogları; DNA polimerazlara bağlanmak için doğal substratları ile yarışan, bu yolla yeni yapılmakta olan DNA'ya bağlanıp, DNA zincir sentezini durduran, viral replikasyonu önleyen bileşiklerdir. Nükleozid analoglarının çoğu sitoplazmada bulunan enzimler tarafından nükleozid 5'-trifosfatlara fosforillenir; ardından viral polimerazlar ile etkileşir (83).

Food and Drug Administration (FDA) tarafından kronik hepatit B tedavisinde onay verilen nükleoz(t)id analogları; lamivudin, adefovir dipivoksil, entekavir ve tenofovir, telbuvidin olmak üzere beş tanedir. Bu ajanlar güvenilirlik ve oral kullanılabilirlik avantajına sahiptirler. Ancak tedavi kesildikten sonra, hastaların az bir kısmında kalıcı cevap oluşur. Bu nedenle, hastaların büyük bir bölümünde uzun süre kullanılmaktadırlar. Uzun süreli kullanım ise; ilaca dirençli HBV mutantlarının sıklığında artışa ve ilacın etkinliğinin sınırlanmasına sebep olmaktadır (83).

#### **1.7.2.2.1. Lamivudin**

Lamivudin; 2'-3' dideoksi 3'-tiyasitidin'in negatif enantiomeri olan bir nükleozid analogudur. Enzimatik yolla, hücre içerisinde kendisine eklenen aktif trifosfat sayesinde, DNA zinciri içerisine girmekte, olgunlaşmamış zincir sonlanmasına sebep olmaktadır. Böylece HBV-DNA sentezine engel olmaktadır. (90). Yüksek oral biyoyararlanımı ve uzun plazma yarı ömrü (5-7 saat) vardır Lamivudin tedavisi çocuklarda da güvenilirdir (84).

1 yıllık lamivudin tedavisinden sonraki HBeAg serokonversiyonu, 16 haftalık standart interferon alfa tedavisinin sonuçlarıyla benzerdir. Ancak 1 yıllık pegile interferon alfa tedavisi kadar iyi değildir (62). Kalıcı ve ya aralıklı transaminaz yükselmesi olan, HBeAg pozitif kronik hepatit B'li hastalar ile yapılan 731 çalışmanın sonuçları değerlendirildiğinde, 1 yıl boyunca lamivudin alan hastalardaki HBeAg serokonversiyonu oranı % 16-18 arasında değişmektedir. Bu oran, tedavisiz kontrollere göre 3-4 kat daha iyidir. Tedavi alan hastalarda histolojik iyileşme %49-56 arasında rapor edilmektedir (73).

Hepatit B e antijeni (HBeAg) serokonversiyonu oranı, tedavi süresiyle doğru orantılı olarak artar ve 5 yılda % 50'lere yükselir (85). Tedavi öncesi transaminaz düzeyinin, HBeAg serokonversiyonu açısından güçlü bir prediktif gösterge olduğu belirtilmektedir (86). Cinsiyet, yaş, tedavi öncesi beden-kitle indeksi ve tedavi öncesi

histolojik aktivite indeksi ile HBeAg serokonversiyonu arasında bir etkileşim görülmemiştir (83-86).

Transaminaz düzeyi normalden 1-2 kat yüksek olan hastalarda, 1 yıllık tedavi ile HBeAg serokonversiyonu oranı % 10'dan az olup, 3 yıllık tedavi sonunda % 19'a kadar yükselebilmektedir. Dünyanın değişik yerlerinde yapılan çalışmalarda benzer sonuçlar bulunmuştur (85).

Hepatit B e antijeni (HBeAg) negatif kronik hepatit B'de, lamivudin tedavisinin süresi konusunda fikir birliği yoktur. Son zamanlardaki çalışmalar 1 yıllık tedavi sonunda serum HBVDNA baskılanması oranının % 60-70 civarında olduğu belirtilmektedir. Bununla beraber, tedavi sonlandırıldıktan sonra hastaların % 90 gibi büyük bir bölümünde relaps olduğu görülmektedir. Önerilen HBV-DNA negatifleşmesinden sonra en az altı ay daha tedavinin sürdürülmesidir (62).

Bunun dışında lamivudin; interferon alfa tedavisine cevapsız hastalarda, kompanse sirozlu ve dekompanse sirozlu hastalarda da güvenle kullanılabilir (62).

Lamivudinin kronik hepatit B tedavisinde önerilen günlük dozu 100 mg/gün'dür. Kreatinin klirensine göre doz ayarlaması yapılabilir. Buna göre kreatinin klirensi 50 ml/dk seviyesine kadar, 100 mg/gün dozunda verilebilir. Eğer kreatinin temizlenmesi 30-49 ml/dk arasında ise; ilk doz 100 mg/gün olmak üzere 50 mg/gün, 15-29 ml/dk arasında ise; ilk doz 35 mg/gün olmak üzere 25 mg/gün, 5-14 ml/dk arasında ise ilk doz 35 mg/gün olmak üzere 15 mg/gün, 5 ml/dk'nın altında ise yine ilk doz 35 mg/gün olmak üzere 10 mg/gün olarak verilebilir (62).

Lamivudin genellikle çok iyi tolere edilir. Yapılan çalışmalarda ilacın kesilmesini gerektiren bir yan etkiye rastlanmamıştır. İlaça alerjik reaksiyon gelişen kişilerde tedaviye devam edilmemesi önerilir (62).

Kronik hepatit B tedavisinde lamivudin kullanımını sınırlandıran en önemli özellik, tedavide kullanıldığı sürenin artmasıyla doğru orantılı olarak artan, ilaca karşı direnç gelişimidir. HBV polimerazının primer katalitik bölgesi olan revers transkriptazın C alanındaki YMDD motifinde meydana gelen bir mutasyon sonucunda revers transkriptaz, lamivudini DNA zincirine eklemeyecek özellik kazanır. Bu sayede, HBV replikasyonu ilaca rağmen devam eder. İlaça direnç gelişiminin en korkulan sonucu; hastalığın aktivasyonu ile biyokimyasal, viral ve histolojik olarak bir kötüye gidiş meydana gelmesidir. Bu kötüye gidiş, hastalığı

tedavi öncesi döneme geri döndürebileceği gibi daha kötü bir seviyeye de götürebilir (87).

Lamivudin tedavisi başlangıcından itibaren 6 ay içinde mutant tipler görülmeye başlar ve tedavi süresi arttıkça mutasyon oranları artarak devam eder. Şuana kadar yapılan çalışmalar; 1. yıl % 12-15 kadar olan lamivudin direnç oranının,2. yılda % 35-45,3. yılda % 45-50,4. yılda % 50-60 ve 5. yılda % 60-70 oranında olduğunu ve direnç oranlarının hastalık süresiyle doğru orantılı olarak arttığını göstermektedir (88, 89).

Direnç gelişen hastalarda hepatit kliniği yeniden ortaya çıkar. Lamivudin tedavisi sırasında meydana gelen transaminaz düzeylerinde ani yükselme, karaciğer fonksiyonlarında bozulma, HBV-DNA'nın serumda tekrar ölçülebilir hale gelmesi ve karaciğer histolojisinde kötüleşme olması, lamivudin direnci ile ilişkili bulgulardır.

Direnç ortaya çıktıktan sonra meydana gelen ani transaminaz yüksekliği ve karaciğer fonksiyonlarında bozulma“biyokimyasal breakthrough”, HBV-DNA'nın tekrar serumda ölçülebilir hale gelmesi ise “virolojik breakthrough” olarak adlandırılmaktadır (90).

Yapılan çeşitli çalışmalarda; lamivudin tedavisi sırasında HBV polimerazın YMDD motifinde mutasyon gelişen hastalarda klinik kötüleşme geliştiği, transaminaz ve HBVDNA düzeylerinin yükseldiği ve bu bulgulara ek olarak karaciğer histolojisinde kötüye gidiş olduğu belirtilmiştir. Bu nedenle, klinik kötüleşme olmadan, ilaç direncinin saptanmasını sağlamak amacıyla, lamivudin tedavisi sırasında belirli aralıklarla direnç testi yapılması önerilmektedir (83).

#### **1.7.2.2.2. Adefovir Dipivoksil**

Antiretroviral, revers transkriptaz inhibitörü olan adefovirin ön maddesi olan adefovir dipivoksil, oral alımdan sonra bağırsaklarda hızla aktif metabolit olan adefovire dönüştürülür. Adefovir; adenozin monofosfatın, fosfanat nükleotid analogudur. Plazma yarılanma ömrü 7,5 saat olup, böbrek yetersizliğinde bu süre uzar. Atılımı idrar yolu ile olur. Esasında, HIV tedavisi için kullanıldığı dozlarda nefrotoksiktir, ancak kronik hepatit B tedavisinde düşük dozda kullanıldığından dolayı bu yan etkisi az görülür (83).

Adefovir; lamivudin ve entekavire dirençli suşlara da etkilidir. Etkinliği lamivudine göre daha azdır, ancak direnç gelişme oranı lamivudine göre oldukça az

bildirilmektedir. 1, 2, 3, 4 ve 5 yıllık tedavi sonrası direnç oranları sırasıyla; % 0, % 3, % 11, % 18 ve % 29 olarak bildirilmiştir. HBV polimerazının D alanının 236. kodonunda meydana gelen N236T ve B alanının 181. kodonunda meydana gelen A181V mutasyonları, adefovir dipivoksil direnci ile ilişkilendirilmektedir (83).

Adefovir dipivoksilin erişkin dozu 10 mg/gün'dür. Pediatrik emniyetli dozu bilinmemektedir. Karaciğer yetersizliğinde doz ayarlanması gerekmez. Böbrek hastalığında ise; kreatinin klirensi 50 ml/dk altına indiğinde doz ayarlanması gerekir. Kreatinin klirensi; 20-49 ml/dk arasında iken, gün aşırı 10 mg/gün, 10-19 ml/dk arasında iken, 3 günde bir 10 mg/gün, hemodiyaliz hastalarında ise hemodiyalizden sonra haftada bir 10 mg/gün önerilmektedir. Nefrotoksisite riski nedeni ile düzenli aralıklar ile böbrek fonksiyonları değerlendirilmelidir. Adefovir dipivoksil, özellikle obez kadınlarda tedavinin uzun sürmesine bağlı olarak hepatotoksisiteye neden olabilir. Bu durumlarda tedavinin kesilmesi gerekir (83).

#### **1.7.2.2.3. Entekavir**

Entekavir, 2'-deoksiguanozinin karboksilik analogudur. Adefovir ve lamivudinden farklı olarak, HBV polimerazına spesifiktir. HIV ve diğer DNA virüslerine etkili değildir.

Hepatit B virüsü replikasyonunu; pregenomik RNA'dan negatif HBV-DNA ipliğinin revers transkripsiyonunu, DNA polimerazın hazırlık safhasını ve pozitif HBV-DNA zincirinin sentezini engelleyerek üç farklı yol ile inhibe eder. İn vitro çalışmalarda entekavirin, lamivudin ve adefovirden daha etkin olduğu gösterilmiştir. Vahşi tip HBV'ye kıyasla, lamivudine dirençli suşlarda etkinliği daha azdır ve direnç geliştirme riski yüksek olduğundan bu suşlarda daha yüksek doz kullanılması gerekir (91).

Entekavir genellikle iyi tolere edilir. Yemekler, emilimini azaltır. Önerilen günlük dozu 0,5 mg/gün'dür. Kreatin klirensi 50 ml/dk'nın altında olan hastalarda doz ayarlanması gerekir. Yan etki profili ve güvenlik açısından lamivudine benzerdir (91).

#### **1.7.2.2.4. Tenofovir**

Tenofovir disoproksil fumarat; HIV enfeksiyonu tedavisinde kullanılan bir nükleotid analogudur. HBV ve HIV birlikteliğinde, HBV DNA düzeylerinin düşmesi

üzerine KHB olgularında kullanılabileceği fikri doğmuştur. Lamivudine dirençli olgularda adefovirden daha etkin olduğu gösterilmiştir (91).

Hepatit B virüsü e antijeni (HBe Ag) pozitif kronik hepatit B olgularında, adefovir ile karşılaştırıldığında, 48. haftada HBV DNA üzerine etkinliği; tenofovirle %76 ve adefovir ile %13 ve histolojik düzelme; tenofovirle %74 ve adefovirle %68 bulunmuştur. Tenofovirle HBeAg serokonversiyonu oranı %20,9 oranında gözlenmiştir. Dikkat çekici olarak tenofovirin; olguların %3,2 sinde HBsAg kaybına, %1,3 oranında ise HBsAg serokonversiyonuna yol açtığı saptanmıştır. Gebelik kategorisi B dir (91).

Glomerüler filtrasyonla %70-80 oranında idrarla ile atılır. Böbrek yetmezliğinde doz ayarlanması gerekmektedir. Genel yan etkileri arasında; baş ağrısı, bulantı-kusma, karın ağrısı, diyare, ÜSYE sayılmaktadır. Ciddi yan etkileri arasında ise; ALT yüksekliği, trombositopeni bildirilmiştir. Tenofovirle gelişen Fanconi sendromu ve böbrek yetmezliği bildirilmiştir (91).

#### **1.7.2.2.5. Telbivudin ( L-Deoksitimidin)**

Hepatit B virüsüne karşı etkin antiviral aktiviteye sahip bir nükleozid analogudur. Klinik çalışmalar, HBV replikasyonunun baskılanmasında telbivudinin, lamivudine göre daha etkili olduğunu göstermektedir. Bununla beraber; telbivudine karşı direnç gelişme riski yüksektir ve telbivudine dirence neden olan mutasyonlar, lamivudin ile çapraz direnç gösterir. Bu yüzden kronik hepatit B tedavisinde kullanımı kısıtlıdır. Önerilen günlük dozu; 600 mg/gün'dür (91).

Kreatinin klirensi 50 ml/dk'nın altında olan hastalarda doz ayarlanması gerektirir. Güvenlik profili, lamivudine benzerdir ve iyi tolere edilir (91).

#### **1.7.2.2.6. Embtrisitabin**

Embtrisitabin; lamivudinin fosforillenmiş derivesidir. Nükleotid analogudur. Lamivudinle çapraz direnç göstermektedir. Tedavinin ikinci ayında HBV DNA'yı %50-87 oranında baskılar. HIV replikasyon süpresyonunda da, lamivudin kadar etkilidir. 48. haftada HBe serokonversiyonu %40 bulunmuştur (91).

Emtrisitabinin 200 mg'lık tabletleri bulunmaktadır. Günde tek doz halinde kullanılmaktadır. İdrarla değişmeden atılır. Böbrek yetmezliğinde doz ayarlanmalıdır. Kronik hepatit B tedavisinde, FDA onayı almamıştır. HIV enfeksiyonu tedavisinde onay almıştır.

Bu dört nükleozid analogu dışında, kronik hepatit B tedavisinde kullanılması beklenen diğer ajanlar, klevudin ve timosindir. Bu ajanlar ile ilgili klinik ve hayvan çalışmaları devam etmektedir (83).

### **1.7.3. Tedavinin Sonlanım Noktaları**

İdeal olan tedavi sonlanım noktası; HBV DNA düzeyinin real time PCR saptanabilen en alt düzeye (10–15 IU/ml) inmesini sağlamaktır. Böylece virolojik süpresyonu, biyokimyasal ve histolojik iyileşme takip edecek ve komplikasyonlar önlenmiş olacaktır (61).

İnterferon alfa ve ya nükleozid/ nükleotid analogları, HBV DNA düzeylerini azaltarak, hastalığın remisyona girmesini sağlamaktadır. Nükleoz(t)id Analoglarına (NA) olan direnci en aza indirmek için, HBV DNA düzeyinin en aza indirilmesini sağlamak gerekmektedir. Ayrıca tedavi ile HBeAg pozitif hastada, HBe serokonversiyonu olasılığı ve HBsAg kaybı olasılığı artmaktadır. Eğer RT PCR yapılamıyorsa, HBVDNA olabildiğince duyarlı olan başka bir yöntemle taranmalıdır (61).

**(1) HBeAg pozitif ve HBeAg-negatif hastalarda ideal sonlanım noktası;** anti-HBs serokonversiyonu ile ve ya serokonversiyon olmadan, HBsAg'nin kaybını sağlamaktır. Bu durum KHB'nin tam remisyon durumudur ve uzun dönem gerekmektedir (61).

**(2) HBeAg pozitif serokonversiyon sağlanamamış hastalarda ve HBe Ag negatif hastalarda;** nükleozid/nükleotid analogları ve ya interferon tedavisiyle; sürekli devam eden saptanamayan HBV DNA düzeyleri bir diğer önemli sonlanım noktasıdır (61).

**(3) HBeAg pozitif hastalarda;** HBeAg serokonversiyonun sağlanması, tatmin edici bir sonuç olabilir, çünkü iyi prognozla ilişkili olduğu gösterilmiştir (61).

#### 1.7.4. Tedaviye yanıt tanımları

Kronik hepatit B tedavisinde iki farklı grup ilaç kullanılmaktadır. Bunlar;

- 1) İnterferon alfa
- 2) Nükleozid /nükleotid analoglarıdır.

Antiviral tedaviye yanıt kriterleri tedavi tipine göre farklılık göstermektedir (61).

##### 1.7.4.1. İnterferon Alfa Tedavisinde

**Primer yanıt**; tedavinin 3. ayında HBV DNA düzeyinde, başlangıç değerine göre 1 log<sub>10</sub> IU/ml'den daha az düşme olmasıdır.

**Virolojik yanıt**; tedavinin 24. haftasında HBVDNA düzeyinin 2000 IU/ml'den az olmasıdır.

**Serolojik yanıt**; HBeAg pozitif KHB'de, HBeAg'nin anti-HBe'ye serokonversiyonu olmasıdır.

##### 1.7.4.2. Nükleozid/Nükleotid analogu tedavisinde

**Primer yanıt**; tedavinin 3. ayında HBV DNA düzeyinde başlangıca göre 1 log<sub>10</sub> IU/ml'den daha az düşme olmasıdır.

**Virolojik yanıt**; tedavinin 48. haftasında HBV DNA'nın, RT-PCR ile saptamayacak düzeye inmesi olarak tanımlanmaktadır.

**Kısmi Virolojik Yanıt**; HBV DNA'da 1 log<sub>10</sub> IU/ml'den fazla düşme olması, ancak real time PCR ile saptanabilen DNA düzeyinin devam etmesi olarak tanımlanmaktadır. Orta düzeyde potent ve ya dirence karşı düşük genetik bariyeri olan, lamivudin ve telbuvudin gibi ilaçların kullanıldığı tedavi rejimlerinde, tedavinin 24. haftasında kısmi virolojik yanıt değerlendirilmelidir. Yüksek potensli, dirence karşı daha yüksek genetik bariyeri olan ve ya geç direnç gelişen (entekavir, adefovir ve tenofovir) gibi ajanlarla tedavi de ise 48. haftada kısmi virolojik yanıt değerlendirilmelidir (61).

**Virolojik breakthrough**; tedavi esnasında saptanan en düşük HBV DNA düzeyiyle karşılaştırıldığında, HBVDNA düzeyinde 1 log<sub>10</sub> IU/ml'den daha fazla artış olması olarak tanımlanmaktadır. Sıklıkla bu durumu, ALT seviyelerinin artışı ile oluşan biyokimyasal breakthrough izler. Nükleozid ile tedavi esnasında gelişen virolojik breakthrough'nun en sık sebebi, hastanın tedaviye uyumsuzluğu ve dirençli

varyantların seçilmesidir. Antivirallere direnç gelişmesi sonrasında, primer tedavi yanıtı ve virolojik breakthrough gözlemlenebilir (61).

Şu ana kadar; kronik hepatit B tedavisinde kullanımda olan yedi ilaç bulunmaktadır. Bu ilaçlarla olan tedaviye yanıt oranları, çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir.

Hepatit B e antijeni (HBeAg) pozitif hastalarda virolojik yanıt oranlarının; pegile interferon alfa da %25, lamivudin ile %36–40, adefovir ile %21, entekavir ile %67, telbivudin ile %60 ve tenofovir ile %74 olduğu gösterilmiştir (92).

Hepatit B e antijeni (HBeAg) serokonversiyon oranları; konvansiyonel ve pegile interferon ile % 30 ve Nükleoz(t)id analogları ile %20'dir. Nükleoz(t)id analogları ile tedaviye devam edilmesi durumunda, HBeAg serokonversiyon oranları artmakta, ancak direnç gelişme ihtimalini de beraberinde artırmaktadır (61).

HBsAg kayıp oranları; tedaviden bir yıl sonra pegile interferon alfa için %3-4 ve lamivudinle %1, adefovir ile %0, entekavir ile % 2, telbivudine ile %0 ve tenofovir ile %3'dür (61).

Hepatit B e antijeni negatif hastalarda, bir yılda virolojik yanıt oranları; pegile interferon alfa ile %63, lamivudine ile %72, adefovir ile %51, entekavir ile %90, telbivudine ile % 88 ve tenofovir ile %91 oranındadır (61).

### **1.7.5. Tedaviye Yanıt İçin Ön Görücü Kriterler**

#### **1.7.5.1. İnterferon Alfa Tedavisine Yanıt İçin Öngörücü Kriterler**

Hepatit B e antijeni serokonversiyonu için tedavi öncesi öngörücü kriterler; düşük viral yük (HBV DNA'nın  $<10^7$  IU/ml ve ya  $<7$  log<sub>10</sub> IU/ml), yüksek serum ALT seviyesi, normalin üst sınırı (NÜS) 3 katının üstünde olması) ve karaciğer biyopsisinde histolojik aktivite skorunun 4 ve üstü olmasıdır (61).

Hepatit B virüsü genotip A ve B'nin; İFN alfa'ya olan yanıtı, genotip C ve D'ye olan yanıtına göre daha iyidir (61).

Tedavi esnasında; 12. haftada HBV DNA'nın 20,000 IU/ml'den daha düşük düzeye inmesi, HBeAg pozitif hastalarda %50 oranında serokenversiyon gözlemlenebileceğini ve HBeAg negatiflerde ise, %50 oranında yanıt alınabileceğini desteklemektedir. Yine tedavi esnasında, 24. haftada HBeAg'nin azalması serokonversiyon belirteçidir (61).

### **1.7.5.2. Nükleozid/nükleotid analoglarıyla tedaviye yanıt için öngörücü kriterler;**

Tedavi öncesi HBeAg serokonversiyonu için yol gösterici faktörler; düşük viral yük, HBV DNA'nın  $10^7$  IU/ml ve ya  $7 \log_{10}$  IU/ml'nin altında olması, yüksek serum ALT düzeyi ( $>3 \times \text{NÜS}$ ), karaciğer biyopsisinde histolojik aktivite skoru 4 ve üstü olmasıdır (61).

Lamivudin, adefovir ve ya telbuvidin ile tedavi esnasında; tedavinin 24. ve ya 48. haftasında virolojik yanıt olması, direnç insidansının düşük olduğuna ve HBeAg pozitif hastalarda ise, HBeAg serokonversiyonu şansının arttığına işaret eder.

Hepatit B virüsü genotipi herhangi bir oral antiviralin yanıtını etkilememektedir (61).

### **1.7.6. Tedavi Stratejileri**

İnterferon alfa tedavisinin (konvansiyonel ve pegile) avantajı; hem immün modülatör etkiye hem de, antiviral etkiye sahip olmasıdır. İmmün modülatör etkinliği ile virolojik yanıtı desteklemekte, antiviral etkiyle de HBV DNA kaybına yol açmaktadır. Bu tedaviye yanıt alınan ve bu yanıtın kalıcı olduğu hastalarda, HBsAg kaybı ihtimali bulunmaktadır. Yan etkilerinin sık olması ve subkutan enjeksiyon uygulanması dezavantajlardır. İFN alfa; dekompanse siroz, otoimmün hastalıklar, kontrolsüz ciddi depresyon ve psikoz durumlarında kontrendikedir (61).

Entekavir ve tenofovir; ilaç direncine yüksek genetik bariyeri olan potent antivirallerdir. Bu nedenle, monoterapide güvenle kullanılabilir. Adefovir, tenofovir göre daha düşük etkinliğe sahiptir ve direnç oranları artmaktadır (61).

Telbuvidin; HBV için potent bir inhibitördür. Fakat dirence olan genetik bariyeri daha düşüktür. Başlangıçta yüksek viral replikasyonu olanlarda, 24 haftalık tedaviden sonra bile, HBV DNA saptanabilecek düzeydedir.

Lamivudin ise; oldukça ucuz bir ajandır. Monoterapi ile direnç oranları yüksektir (61).

Bu iki farklı tedavi stratejisi de; hem HBeAg pozitif, hem HBeAg negatif KHB'de uygulanabilir (61).

Adefovirle primer yanıtızsızlık; %10–20 oranıyla, diğer nükleoz(t)id analoglarına göre daha fazladır. Tenofovir ve ya entekavir tedavisine geçilmelidir. Primer yanıtızsızlık; lamivudin, telbuvidin, entekavir ve ya tenofovir ile nadiren

gözenmektedir. Primer yanıtı olmayan hastalarda tedaviye uyum gözden geçirilmelidir. Primer yanıtı uyumlu hastada, olası bir mutasyon taranmalı, varyant HBV'ye etkili daha güçlü bir ilaca geçilmelidir (61).

Lamivudin, adefovir ve telbivudin tedavisi alan, 24. haftada kısmi virolojik yanıtı olmayan hastalarda iki strateji uygulanabilir; Tenofovir ya da entekavir gibi daha güçlü ilaçlara değiştirilebilir ve ya çapraz direnç olmayan (lamivudine ve telbivudin tenofovir ve ya adefovire entekavir gibi) bir ilaç eklenebilir. Entekavir ve ya tenofovir alan hastalarda, 48. haftada kısmi virolojik yanıt varlığında, uzun dönemde direnç önlemek için, diğer ilacın eklenmesini önerilmektedir (Tenofovire entekavir ve ya tam tersi) (61).

Tedaviye uyumlu hastalarda; virolojik breakthrough olması durumunda, hastada viral direnç geliştiği düşünülmelidir. Lamivudin, adefovir, telbivudin, emtrisitabin direnç, önceden nükleoz(t)id kullanımı ile ilişkilidir. Tedavi almamış olan yüksek HBV DNA düzeyine sahip hastalarda; HBV DNA'nın yavaş düşmesi, tedavi esnasında kısmi virolojik yanıt alınması halinde direnç insidansı artmaktadır. Bu grup hastalarda, HBV DNA monitörizasyonu ile klinik breakthrough'dan önce direnç saptanmalı ve bu hastalara olabildiğince erken tedavi değişikliği yapılmalıdır (61).

Direnç varlığında; çoklu ilaca dirençli suş indüksiyonu için minimal riske sahip olan, en etkili antiviral başlanmalıdır ve ya çapraz direnç olmayan etkili bir antiviral tedaviye eklenmelidir. Bazı kombinasyonların, uzun dönemdeki güvenilirliği bilinmemektedir. Özetle;

**Lamivudin direncinde;** tedaviye tenofovir (tenofovire ulaşamıyorsa adefovir) eklenir (61).

**Adefovir direncinde;** tedavi, tenofovire değiştirilmeli ve ya tedaviye çapraz direnç olmayan farklı bir ilaç eklenmelidir. Mutasyon analizinde; N236T bölgesinde değişiklik varsa tedaviye lamivudin ve ya telbivudin eklenir ya da tenofovir tedavisine değiştirilir. Eğer A181T/V mutasyonu varsa, entekavir ve ya tenofovir tedavisine değiştirilir (61).

**Telbivudine direncinde;** tedaviye tenofovir eklenir. Bu kombinasyonun uzun dönem güvenilirliği bilinmemektedir (61).

**Entekavir direncinde;** tedaviye tenofovir eklenir, bu kombinasyonun güvenilirliği bilinmemektedir (61).

**Tenofovir direnci;** henüz daha tanımlanmamıştır. Laboratuvarında, genotipik ve fenotipik tarama yapılmalıdır. Bu tedaviye direnç varlığında, entekavir, telbivudin, lamivudin ve ya emtrisitabin eklenebilir. Ancak bu kombinasyonların güvenilirliği bilinmemektedir.

### **1.7.7. KHB'de Tedavi Süresi**

#### **1.7.7.1. IFN Alfa Tedavisi Alan Hastalarda Tedavi Süresinin Belirlenmesi**

Hepatit B e antijeni serokonversiyonu ihtimali yüksek olan, HBeAg pozitiflerde tedavi; 48 hafta süreyle önerilmektedir. IFN alfa tedavisi, HBeAg negatiflerde de kullanılabilir, Ancak tedaviye yanıt oranları yüksek değildir.

Pegile interferon alfa ve lamivudin kombinasyonu ile tedavi altında yanıt yüksek olup, kalıcı yanıt açısından fark olmadığı gösterilmiştir. Diğer Nükleoz(t)id analogları ve peg- IFN kombinasyonlarının etkinliği ve güvenilirliği ile ilgili yeterli veri yoktur (61).

#### **1.7.7.2. Nükleoz(t)id Analogu Tedavisi Alan Hastalarda Tedavi Süresinin Belirlenmesi;**

Nükleoz(t)id analogları kullanılarak, HBeAg pozitif hastalarda HBeAg serokonversiyonu başarılmıştır. Fakat tedavi süresi, tedavi öncesinde ön görülemez ve HBeAg serokonversiyonun oluşmasına bağlıdır (61).

Hepatit B e antijeni serokonversiyonu; ALT düzeyi normalin 3 katından fazla olan ve HBV DNA düzeyi  $2 \times 10^6$  IU/ml (yaklaşık  $10^7$  kopya/ml )'den daha az olan hastalarda daha fazla gözlenmektedir.

Sonlu süreli tedavi; yüksek direnç bariyeri olup, viremiyi hızla düşüren ve HBV direncinin sebep olduğu tekrarları önleyebilen potent antivirallerle sağlanabilir.

Nükleoz(t)id analogları ile serokonversiyon oluşursa, tedavi 6 ve ya 12 ay daha uzatılmalıdır. Bu hastaların %80'inde, kalıcı anti HBe antikoru oluşabilmektedir (61).

Kalıcı yanıt alınmayan hastalarda, Nükleoz(t)id analogları ile uzun süreli tedavi uygulanması gerekmektedir. HBeAg serokonversiyonu gelişmeyen, HBeAg pozitiflerde tedavinin uzatılması gerekmektedir. Ayrıca sirozu olan hastalarda,

HBeAg durumuna ve serokonversiyona bakılmadan nükleoz(t)id analoglarının kullanılması gerekmektedir. Monoterapide; optimal direnç profiline sahip, en potent ilaçlar olan tenofovir ve entekavir gibi ilaçlar seçilmelidir. İlaç kullanıldığı süre içinde, RT- PCR ile saptanamayan, HBV DNA düzeyinin sürekliliği en ideal olandır. Entekavir ve tenofovirin uzun süreli etkileri, güvenlik ve tolerabilitesi hala bilinmemektedir (61).

### **1.7.8. Tedavi Takibi**

#### **1.7.8.1. Pegile İnterferon Alfa Alan Hastalarda Takip**

Bu hastalarda, aylık tam kan sayımı ve serum ALT seviyesi takip edilmelidir. Tedaviye yanıtı değerlendirmek için; 12. ve 24. haftalarda, serum HBV DNA seviyesine bakılmalıdır.

**Hepatit B e antijeni pozitif** hastalarda; HBeAg ve anti-HBe düzeyleri 24. ,48. ve tedaviden sonraki 24. haftada bakılmalıdır. HBe serokonversiyonu ile beraber ALT normalizasyonu ve HBV DNA'nın 2000 IU/ml' nin altında (yaklaşık 10,000 kopya/ml) olması istenen yanıttır.

Takip boyunca, real time PCR ile saptanamayan HBVDNA düzeyi ideal olan sonuçtur ve bu durumun devamlı olması halinde, HBsAg'nin kaybolma olasılığı yüksektir.

Pegile interferon ve ya NA ile HBeAg serokonversiyonu gözlenen, HBeAg-pozitif hastalar; HBeAg seroreversiyonu ve HBeAg negatif kronik hepatit B yönünden uzun süre takip edilmelidir. HBV DNA negatifliği devam ediyorsa, HBeAg serokonversiyonundan sonra 6 ay aralıklarla, HBsAg, AFP, CEA düzeyi, ultrason ile takip edilmelidir. İnterferona primer yanıtı olmayan vakalarda, interferon tedavisi kesilmeli ve uygun bir nükleoz(t)id analoguyla tedavi başlanmalıdır (61).

**Hepatit B e antijeni negatif** hastalarda; 48 hafta boyunca benzer şekilde monitörize edilmelidir. HBV DNA'nın <2000 IU/ml olması durumu olan virolojik yanıt, karaciğerdeki hastalığın remisyonu ile ilişkilidir.

Polimeraz zincir reaksiyonu ile saptanamayan HBV DNA düzeyi, tedaviden sonra beklenen ideal sonuçtur ve bu durumun sürdürülmesi, yüksek olasılıkla HBsAg kaybıyla ilişkilidir. HBV DNA'nın saptanamayan düzeyde seyri esnasında, her 6 ayda bir HBsAg düzeyi kontrol edilmelidir (61).

Tüm hastalar pegile interferon alfanın yan etkileri açısından monitörize edilmelidir (61).

### **1.7.8.2. Nükleoz(t)id Analogları İle Tedavi Takibi**

Hepatit B e antijeni pozitif hastalarda nükleoz(t)id analogları ile tedavi sonlanım noktası, HBe serokonversiyonudur. HBV DNA; PCR ile ölçülemeyecek düzeyin altında olmalıdır ve buna biyokimyasal ve histolojik yanıtın birlikte olduğu serokonversiyon eşlik etmelidir. Yapılan çalışmalara göre NA tedavisi, HBeAg serokonversiyonundan 24-48 hafta sonra kesilebilir. HBsAg düzeyi, HBeAg serokonversiyonundan sonra,6 ay aralıklarla bakılmalıdır. HBsAg kaybı, NA tedavisiyle oldukça nadir görülmektedir (61).

Virolojik yanıtı belirlemek için; 12. haftada HBV DNA bakılmalıdır ve her 12-24 haftada bir kontrol edilmelidir. HBV DNA'nın PCR ile ölçülemeyecek düzeylere inmesi, direnci dışlayabilmek için değerlendirilmesi gereken bir parametredir. Yine tedavi yanıtınsızlığını değerlendirmek için, HBV DNA takibi önemlidir. HBeAg pozitif hastalarda HBeAg düzeyleri ve HBeAg negatifliğinden sonra anti HBe antikor düzeyleri, 6-12 ay aralıklarla ölçülmelidir (61).

Nükleoz(t)id analogları; böbreklerle atıldığından, kreatinin temizlenmesi azalan hastalarda, doz ayarı yapılması gerekmektedir. Karaciğer yetmezliğinde, doz ayarlanması ile ilgili yeterli çalışma yoktur. Tedavi altında, hepatit B'nin akut alevlenmesi görülebilir (61).

Sirozlu hastalarda, ilk üç ay aylık olmak üzere, yoğun izlem yapılmalıdır. Bu hastalarda gelişen komplikasyonların yönetimi, acilen yapılmalıdır. Renal yetmezliğin, tenofovir ve adefovirle nadirde olsa görüldüğü belirtilmiştir. Yine, HIV pozitif ve tenofovirle tedavi olan hastalarda, kemik mineralizasyonunda azalma olduğu gösterilmiştir. Entekavirin, uzun dönemde karsinogenez üzerine olan etkileri çalışılmaktadır. Telbivudinle miyopati nadiren bildirilmiştir. Pegile interferon ve telbivudine ile periferik nöropati görülmüştür, bu nedenle bu kombinasyon önerilmemektedir (61).

## 1.8. Kronik Hepatit B'de Genotipik Direnç

### 1.8.1. Antiviral Direncinde Rol Alan Etkenler

- a) Virüs replikasyon miktarı ve hızı;
- b) Viral polimeraz hata hızı
- c) İlacın antiviral etkinliği
- d) Karaciğerde replikasyon mesafesi genişliği: Karaciğerde yeni cccDNA yerleşebilecek hepatosit miktarı, replikasyon alanı olarak tanımlanır. Mutant virüsün hepatositlere yerleşebilmeleri için orijinal virüsün replikasyon mesafesini boşaltması gerekir.
- e) Rezistan suşların replikasyon yeteneği: Bağışıklık sistemi ve ilaç baskısı altındaki virüsün çoğalabilme yeteneğidir.
- f) Genetik bariyer: Primer antiviral direnç gelişmesi için gerekli olan mutasyon sayısıdır.
- g) Diğer faktörler: İlaç metabolizması ile ilgili genetik faktörler tedaviye uyum, saklı bölgelere antiviral erişebilirliği, cccDNA formuna etkinlik (93).

### 1.8.2. Genotipik Direnci Araştırma Metodları

Viral polimerazın reverse transkriptaz bölgesi, tüm genotipler için ortaktır. Mutasyonlar adlandırılırken rt ön eki ardından ilk aminoasit-rt bölgesinin başlangıcına kadar kodon sayısı, mutasyonla yeni oluşan aminoasit olarak adlandırılır (93).

- **PCR ürününü direkt sekanslama;** duyarlılığı en az olan metoddur. Mutant suşun tespit edilmesi için, bu suşun HBV havuzunun >%20'sini oluşturması gerekir. (93 - 95)

- **RFLP (restriction fragment polymorphism) metodu:** Mutant suşlar, viral popülasyonun % 5'ini oluşturduğunda pozitifleşir. Reaksiyon için kullanılan endonükleazlar mutant suşa spesifiktir. Dolayısıyla spesifik endonükleaz kullanılmadığında, reaksiyon negatif kalabilir (93- 95).

- **Mikrochip teknolojisi ile sekanslama:** Pahalı ve her yerde olmayan yeni bir yöntemdir (93).

- **MALDI-TOF MS:** Mutasyonları taşıyan, ufak DNA fragmanlarının mass spektrofotometrik analizidir. Mutant suşlar, viral popülasyonun %1'ine eriştiğinde

mutasyonu yakalayabilmektedir. Her bir mutasyon için hazırlanmış yeni primer ve spektrometre gerekebilir (96).

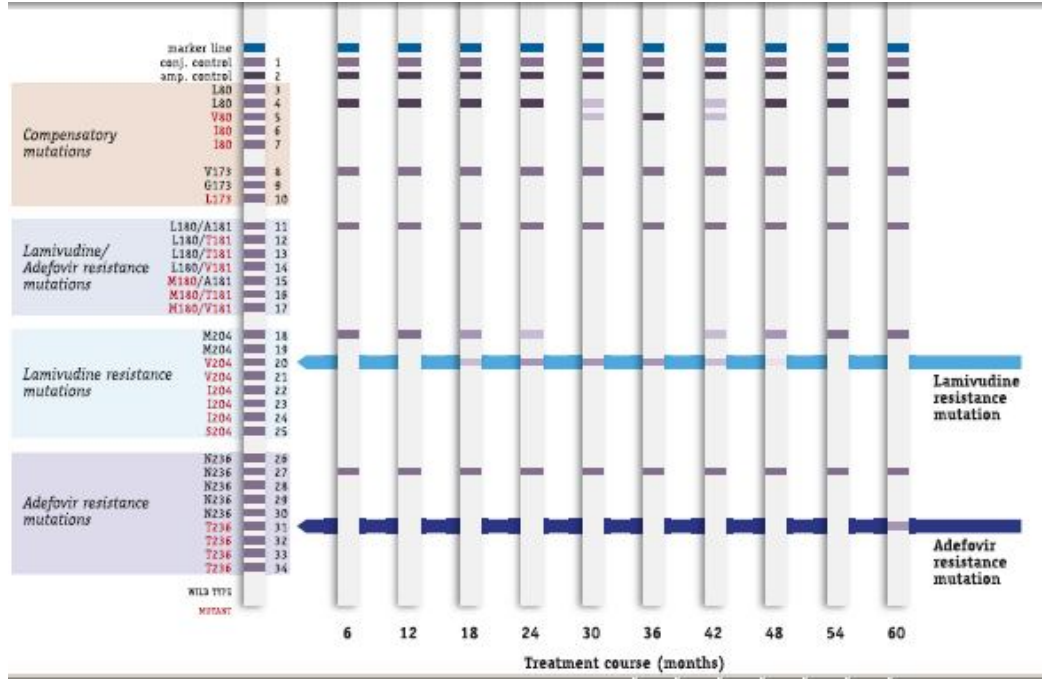
- **Tek genomun sekanslaması:** saptanan mutasyonların popülasyon içerisindeki sıklığı bilinmediğinden, klinik karşılığını değerlendirmek zordur (97).

- **Revers hibridizasyon testi: (LiPA DR)** Mutant suşlar, viral popülasyonun %5' ini oluşturduğunda mutasyonu yakalayabilmektedir. Nitroselüloz membran üzerinde dirençten sorumlu gen bölgesine ait duyarlı ve mutant dizileri içeren probler bulunmaktadır. PCR ile çoğaltıldıktan sonra dirençten sorumlu gen bölgelerine ait DNA molekülleri bu probler ile hibridizasyona sokulduğunda mutant dizilere bağlanırsa dirençli olarak yorumlanır. Her bir mutant için, spesifik bir prop gereklidir. Ayrıca genotipik değişiklikten dolayı, aynı mutasyonu farklı genotiplerde yakalamak için birden fazla prop gerekebilmektedir (93).

- **Auto-LiPA (INNO-LiPA);** otomatize bir ters hibridizasyon sistemidir. Direnç genlerinin tespit edilmesi ve pozitiflik veren bantların okunması esasına dayanmaktadır.

Genotipik direnci saptamak için ülkemizde genellikle; line-probe testleri kullanılmaktadır. Ancak bu yöntem ile sadece bilinen mutasyonlar aranabilir. Dolayısıyla, direnç gelişimine yol açabilen yeni mutasyonlar tanımlandıkça ilgili probler teste ilave edilmelidir. Bu testlerde pozitiflik, mutant suşlar HBV havuzunun %5 ini oluşturduğunda tespit edilebilir (93).

Line probe testinin ters hibridizasyonu yöntemi ile geliştirilmiş olan INNO-LiPA HBV DR v2 (Innogenetics, Gent, Belgium), özellikle serum ve ya plazma örneğinde farklı genetik varyantların bir arada olması durumunda mutasyonların saptanmasını sağlayan oldukça yararlı bir testtir. Bu test ile HBV polimeraz proteininin L80V/I, V/G173L, L180M, A181T/V, M204V/I/S ve N236T kodonları taranmakta, wild tip virüs ile mutant virüsler aynı testte saptanabilmektedir (93, 94).



Şekil 8. INNO-LiPA HBV DR v2 (Innogenetics, Gent, Belgium) test stribininin ve örnek mutasyon motifinin görünümü (94).

### 1.8.3. Lamivudin ve Diğer L-Nükleozitlere Genotipik Direnç Değişiklikleri

Lamivudin için primer direnç mutasyonları; rtM204V/I/S ve rtA181T mutasyonudur. rtA181T mutasyonu; adefovir tedavisi esnasında da seçilebilir. rtM204 V/I mutant suşlar; diğer L nükleozidler olan emtrisitabin, telbuvidin, klevudin gibi ilaçlara da dirençlidir (93, 94).

### 1.8.4. Asiklik Fosfonatlara Genotipik Direnç Değişiklikleri

**Adefovir direnci:** Primer direnç mutasyonları, D bölgesindeki rtN236T ve B bölgesindeki rtA181T/V mutasyonlarıdır. Nadiren rtI233V mutasyonu, primer direnç sebebi olabilir. rtA181T mutant suşların, lamivudine de duyarlılığı azalmış olabilir (93, 94).

**Tenofovir direnci:** Direnç henüz saptanmamıştır. Muhtemelen birden fazla mutasyon gerekmektedir.

### 1.8.5. Entekavire Genotipik Direnç Değişiklikleri

Lamivudin direncine yol açan mutant suşların yanı sıra; T184, S202, M250 mutasyonları da gerektirir (93, 94).

## 2. GEREÇ ve YÖNTEM

### 2.1. Hastalar

Haziran 2010 ile Mayıs 2011 tarihleri arasında, Fırat Üniversitesi Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilimdalı'na başvuran Kronik hepatit B hastalığı olup, herhangi bir antiviral tedavi almamış yüz hasta çalışmaya alındı. Çalışma için Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Değerlendirme Komisyonu onayı alınmıştır. Çalışma için proje hazırlanmıştır. Proje, Gilead Sciences İlaç Tic Ltd Sti tarafından desteklenmiştir. Çalışma, İstanbul Düzen Laboratuvarları'nda yapılmıştır.

### 2.2. Verilerin Toplanması

Çalışmaya uygun olan hastalardan biyokimya tüpüne 5 ml kan alındı ve 3000 devirde 5 dk santrifüj edildi. Serumlar ayrılarak çalışma gününe kadar -80°C de saklandı.

Çalışmaya alınan hastaların yaşı, cinsiyeti, bulaş şekli, hastalık süresi, ek hastalıkları, kullandığı diğer ilaçları, mesleği, öğrenim durumu, başvurduğu yer, fizik muayenesi, serum ALT, AST, ALP, GGT, bilirubinleri, protein, albümin, üre, kreatinin, elektrolitleri, PTZ-INR düzeyleri, AFP, CEA, TFT düzeyleri, kolesterol düzeyi, tam kan sayımı, HBeAg ve anti HBe durumu, HBVDNA düzeyi, karaciğer biyopsisi, USG bulguları kaydedildi. Tüm biyokimyasal, hematolojik, serolojik testler ve HBV DNA düzeyleri, F.Ü Hastanesi Merkez Laboratuvarı'nda çalışıldı. Kan biyokimyasal testleri, Olympus AU2700 cihazında enzimatik kinetik yöntemle, tam kan sayımı Advia2120-i cihazıyla, PTZ-INR düzeyi Cymex CA-1500 cihazıyla, hormonal testler (kolesterol ve TFT) İmmulite 2000-2500 cihazıyla, HBeAg ve anti-HBe düzeyleri Architect 2000 cihazında makroelisa (Architect System Abbott Diagnostics, Germany) ile HBV DNA düzeyleri Roche Cobas Taqman (The COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV Test, v2.0, Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) ile çalışıldı. Serum HBV-DNA düzeyleri ve lamivudin direncine sebep olan mutasyon motifleri ise Düzen Laboratuvarı'nda INNO-LiPA HBV DR v2 · Auto-LiPA 48 (Innogenetic, Gent, Belgium) cihazı ile analiz edildi.

### 2.2.1. HBV DNA Ekstraksiyonu

Hepatit B virüsü DNA ekstraksiyonu için High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Germany) kullanıldı.

a) Önce lizis binding solüsyonu hazırlandı. Bunun için hazır kitin içinde olan hazır lizis, proteinaz K ve carrier RNA solüsyonlarına son aşamalar eklenerek hazırlanan son malzemeler kullanıldı.

Proteinaz K'yı hazırlamak için, hazır kitin içine 5 ml elüsyon buffer eklendi  
Carrier RNA hazırlamak için ise; 0,5 ml elüsyon buffer eklendi.

7 ml lizis +1400 µL proteinaz K +140 µL carrier RNA eklenerek, binding lizis solüsyonu hazırlandı.

Hazırlanmış olan bu lizis binding solüsyondan 625 µL kapaklı ependorf tüpe koyuldu. Hasta serumları eklenmeden önce santrifüjlendi. Lizis binding solüsyonlarının bulunduğu bir kapaklı ependorf tüpe,500 µL hasta serumu eklendi. 10 sn süreyle vortekslendi. 50 °C su banyosunda,10 dk süreyle inkübe edildi. 10 dk sonra su banyosundan çıkarılıp,4600 g'de 2 dk santrifüjlendi. Santrifüj edildikten sonra tüpün içindeki karışıma 250 µL izopropanol eklendi. 10 sn vortekslendi. Ardından; 46 sn,4600 g'de santrifüjlendi. Santrifüj sonrası iki aşamalı filtreleme yapıldı. Wast rock denilen tüp, filter tüp denilen filtreleme rockına yerleştirildi. Hazırlanmış olan bu karışımdan, 750 µL bu filter tüpüne eklenip, kapağı kapatılarak 4600 g'de iki dk santrifüjlendi ve DNA'nın parçalanarak filtredeki kolonlara yapışması sağlandı. Alttaki Wast rock değiştirilerek filter tüp yeni bir wast rockına koyuldu. Üzerine kalan solüsyondan tekrar konulup, iki dk 4600'g de tekrar santrifüjlendi. Tekrar alttaki wast rock değiştirildi. Filtreli tüpe PCR'ı engelleyen maddelerin ortamdaki uzaklaştırılmasını sağlayan inhibitör çıkarma tamponu olan IRB den 400 µL eklenip 4600 g'de iki dk santrifüjlendi. Tekrar alttaki wast rock değiştirilerek, filtreli tüpteki ürüne 700 µL etanol içeren wash solüsyonu koyuldu. İki dk 4600 g'de santrifüjlendi. Santrifüj sonrası ikinci kez 700 µL wash solüsyonu eklenip, üç dk 4600 g'de santrifüjlendi. Alttaki wast rock değiştirilip üç dk süreyle diğer tüm malzemelerin uzaklaştırılması için tekrar 4600 g'de santrifüjlendi. Alttaki wast rock tekrar değiştirildi, filtreli tüpe 75 µL -70 °C deki ısı bloğundan çıkarılan elüsyon bufferdan koyuldu. Üç dk oda ısısında bekletildi. Ardından 4600 g'de üç dk santrifüj edildi. Elde edilen ürün PCR için tüplere aktarıldı.

### 2.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

DNA ekstraksiyonu sağlandıktan sonra elde edilen ürünler, soğuk zincir sağlamak amacıyla buz aküleri üzerindeki PCR tüplerine yerleştirildi. Tüplere 12,5 µL master mix koyuldu. Üzerine 5 µL DNAz- RNAz free su koyuldu. 1 µL primer eklendi. Bu karışımın üzerine de hazırladığımız DNA ekstraksiyonundan 6,5 µL koyuldu. Baloncuk olmamasına dikkat edilerek, birkaç kez karıştırıldı. Denatürasyon için Gene Amp 9700 PCR cihazı, 95. 0 °C 15dk, 55 °C 30 sn, 72° C 0,40 sn, 72° C 10 sn, 4°C/ ∞ şeklinde ayarlandı. Hazırlanmış olan toplam miktar cihaza kaydedildi. Cihaz çalıştırıldı.

### 2.2.3. Akrilamid Jel Elektroforezi

#### A) Akrilamid Jel Elektroforezinde kullanılan solüsyonların hazırlanması:

- \* %7,5 NaOH-----75 g NaOH alınıp, 1000 ml distile su içinde çözüldü.
- \* %1,5 NaOH-----200 ml %7,5'luk NaOH çözeltilisinden alınıp, distile su ilave edildi ve hacim 1000 ml tamamlandı.
- \* %0,1'lik AgNO<sub>3</sub>-----0,3 g AgNO<sub>3</sub> alınıp, 300 ml distile suda çözüldü.

**Boyama:** 100 ml %1,5 luk NaOH, 0,4 ml formaldehit ve eser miktarda NaBH<sub>4</sub> bir şişede karıştırıldı.

- \* **APS** (amonyum peroksit disülfat) %10'luk 10 g alınıp, 100 ml distile suda çözdürüldü.
- \* **5XTEB**

-108 gr Tris –Base (2-amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propandiol)  
-55 gr Borik asit  
-40 ml EDTA (0,5 mM'lık)---

**5XTEB Hazırlanışı:** 93,06 g EDTA, 0,5 L distile su içinde karıştırılıp, karışıma kireç beyazı renginden berrak hale gelene kadar, NaOH tabletleri titre edildi. Karışım distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. En az 12 saat boyunca magnetik karıştırıcı yardımıyla karıştırıldı.

- \* **%30' luk 29:1 stok akrilamid (karanlık ortamda korunarak) hazırlanışı:**  
58 g Akrilamid+ 2 g bisakrilamid+ 100 ml distile su, 2-3 saat magnetik karıştırıcı yardımıyla karıştırıldı. Behere aktarılıp, 200 ml'ye tamamlandı. Sonra tekrar döndürülerek stok akrilamid elde edildi.

%30'luk 29:1 stok akrilamidden, %6'lık 29:1 akrilamid hazırlandı. (60 ml dH<sub>2</sub>O+20 ml stok akrilamid) (%30' luk akrilamid +20 ml 5XTEB bir beher içerisinde karıştırılarak elde edildi.).

- \* **Akrilamid jel hazırlanması:** 5-6 ml %6'lık 29:1 akrilamid +8,5 mikrolitre Temed+ 0,1 ml APS ile karıştırıldı.

### **B ) Jel Elektroforezi**

Kalın ve ince cam kısıkaç yardımıyla birleştirildi. 5- 6 ml %6'lık 29:1 akrilamid + 8,5 mikrolitre Temed+0,1 ml APS karıştırıldı. İki cam arasına hazırlanan karışım döküldü. PCR ürünlerinin koyulacağı kuyucukların belirleneceği kalıp tarak hemen takıldı. Jel donduktan sonra, tarak iki cam arasından çıkarıldı ve distile su ile kuyucuklar yıkandı. Elektroforez tankına cam kaset yerleştirildi. Tankın ve kasetin içine 1XTEB tamponu ilave edildi. Her bir numune için 1 mikrolitre boya ve 5 mikrolitre ürün karıştırıldı ve kuyucuklara pipet yardımıyla sırasıyla aktarıldı. Ana güç kaynağı açıldı. Anot ucuna; güç kaynağından çıkan negatif yüklü kablo, katot ucuna ise; pozitif yüklü elektrik akımı taşıyan kablo bağlandı. Sistem 150 V' ta,100mA' de 20 dk.'ya ayarlandı. Bitiminde sistemin ana düğmesi kapatılıp, anot ve katot uçları sistemden çıkarıldı. İki cam arasından jel ayrılıp, temiz bir kaba alındı. Kabın içerisine %0,1'lik AgNO<sub>3</sub> eklendi. Beş dakika kadar bu çözelti içinde çalkalandıktan sonra, başka bir kaptaki 100 ml %1,5'luk NaOH,0,4 ml formaldehit ve eser miktarda NaBH<sub>4</sub> konan karışıma jel aktarıldı. Beş dakikada bu çözelti içerisinde bekleyen akrilamid jelde boyama işlemi gerçekleştirildi ve pozitif bant veren bantlar saptandı.

Polimeraz zincir reaksiyonu ürünleri akrilamid jel elektroforezinde yürütüldükten sonra UV transluminatörde bantlar incelendi ve 867 bp boyutunda bantlar gözlemlendi. PCR ürünleri -20 °C'de ters hibridizasyon işlemine kadar saklandı.

### **2.2.4. İnno Lipa Revers Hibridizasyon**

Hibridizasyon için birinci boru **Hibridizasyon solüsyonuna**, ikinci boru **Stringet wash solüsyonu'** na, üçüncü boru **Rins solüsyonu** 'na, dördüncü boru **Seyreltilmiş konjugat solüsyonu** 'na, beşinci boru **Substrat buffer solüsyonuna**, altıncı boru 10 µL **denatürasyon solüsyonu** ve 10 µL **PCR ürünü** koyularak 5 dk denatürasyon için beklenme solüsyonuna koyuldu. Hazır test stripleri yerleştirilip, Otomatize Auto-Lipa Cihazı çalıştırıldı.

Otomatize Auto-Lipa Cihazı'yla (Innogenetic, Gent, Belgium) revers hibridizasyon işlemi gerçekleştirildi. HBV polimeraz geninin 80, 173, 180/181, 204, 236 numaralı kodonları tarandı ve Hepatit B virüsüne ait mutasyonlar değerlendirildi (Şekil 9).



**Şekil 9.** Otomatize Auto-Lipa Cihazı

### **2.3 İstatistiksel Analiz**

Veriler SPSS 12.0 paket programında değerlendirildi. Verilerin normal dağılıma uygunluğunun değerlendirilmesinde Kalmagorov-Smivnov testi uygulandı. Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak sunuldu. Gruplar arası verilerin karşılaştırılmasında Kruskal Wallis varyans analizi ve ikili gruplar için Mann-Whitney U testi uygulandı. Parametreler arasındaki ilişkilerin değerlendirilmesinde ise Spearman korelasyon analizi uygulandı.  $p < 0,05$  olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

### 3. BULGULAR

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı'na başvuran, herhangi bir antiviral tedavi almamış olan 100 hasta çalışmaya alındı.

Hastaların yaş ortalaması; 40<sup>±</sup>.13 dü. 41 hasta kadın, 59 hasta ise erkekti. Hastalarda; perinatal bulaş %3, horizontal bulaş %18, cinsel ilişkiyle bulaş %14 ve Perkütan bulaş %65'di. Çalışmaya dâhil edilen hastaların; %1'inin yaklaşık 20 yıllık tanı, %18'inin 10 ile 20 yıllık tanı, %44'ünün 5-10 yıllık tanı, %33'ünün 5 yıldan az süreli tanı ve %4'ünün yeni tanı olduğu belirlendi

Çalışmaya dâhil edilen hastaların %69'unda başka ek bir hastalık yokken, %24 ek olarak diyabet, %4'ünde kalp hastalığı ve %3'ünde ise KBY tanısı mevcuttu. Toplam 70 hasta ek bir medikal tedavi almıyorken, 30'unda ek kronik hastalığı nedeniyle başka bir medikal tedavi almaktaydı.

Hastaların mesleki durumları incelenmiş ve çalışmaya alınan hastaların %6'sının sağlık çalışanı, %7'sinin öğretmen, %9'unun öğrenci, %9'unun memur, %21'inin esnaf olduğu ve %44 gibi bir çoğunluğunun çalışmadığı gözlenmiştir. Hastaların %8'inin okuma yazma bilmediği, %27'sinin ilköğretim mezunu olduğu, %46'sının lise mezunu ve %19'unun ise üniversite mezunu olduğu saptanmıştır. Çalışmaya alınan hastaların, %67 si il içinden başvuru iken, %33'ü ise il dışında yaşamaktaydı. Hastaların %94'ünün yapılan fizik muayenesinde herhangi bir patolojik bulguya rastlanmadı. Hastaların demografik özellikleri tablo halinde verilmiştir (Tablo 1).

**Tablo 1.** Hastaların Demografik Özellikleri

<b>Demografik Özellikler</b>	<b>Hastalar</b>
<b>Yaş</b>	
Min	18
Max	73
Ortalama	40 <sup>+</sup> / 13
<b>Cinsiyet</b>	
Kadın	41
Erkek	59
<b>Bulaş şekli</b>	
Perinatal	3
Perkutan	17
Horizontal	65
Cinsel ilişki	1
Diğer	14
<b>Hastalığın süresi</b>	
Yeni tanı	4
< 5yıl	33
5-10 yıl	44
10-20 yıl	18
>20 yıl	1
<b>Ek hastalık varlığı</b>	
Yok	69
Diyabet	24
Kalp hastalığı	4
Diğer	3
<b>Kullanılan diğer ilaçlar</b>	
Var	30
Yok	70
<b>Meslek</b>	
Çalışmıyor	44
Öğrenci	9
Öğretmen	7
Esnaf	21
Memur	9
Diğer	4
Sağlık çalışanı	6
<b>Öğrenim durumu</b>	
Okuryazar değil	8
İlköğretim	27
Lise	46
Üniversite	19

Çalışmaya alınan hastaların AST düzeyi 70 hastada normaldi. Ortalama AST düzeyi  $47 \pm 5$  IU/ml idi. ALT düzeyi 63 hastada normaldi. 37 hastada ise ALT düzeyi yüksekti. Ortalama ALT düzeyi;  $69 \pm 10$  IU/ml idi. ALP düzeyi %97 oranında normaldi. Üç hastada, minimal ALP yüksekliği mevcuttu. GGT düzeyi %91 hastada normalken, %9'unda sınır değerinin üzerinde minimal bir yükseklik gözlemlendi. Çalışılan diğer biyokimyasal testlerden bilirubin düzeyleri, üre-kreatinin düzeyleri, elektrolit düzeyleri, protein ve albümin düzeyleri ile LDH, PTZ-INR ve AFP- CEA düzeyleri ile tam kan sayımı testleri tüm hastalarda normaldi. Hastaların laboratuvar verileri tablo halinde sunulmuştur (Tablo 2, Tablo 3).

**Tablo 2.** Hastaların yapılan tetkik sonuçları

<b>Laboratuvar Testi</b>	<b>Sonuç (Hasta Sayısı)</b>
<b>AST</b>	70
Normal	30
Yüksek	47+/-5
Ortalama	
<b>ALT</b>	63
Normal	37
Yüksek	69+/-10
Ortalama	
<b>ALP</b>	97
Normal	3
Yüksek	
<b>GGT</b>	91
Normal	7
Yüksek	
<b>Bilirubinler</b>	97
Normal	3
Yüksek	
<b>Total protein</b>	100
Normal	0
Düşük	
<b>LDH</b>	96
Normal	4
Yüksek	
<b>Üre</b>	
Normal	96
Yüksek	4
<b>Kreatinin</b>	
Normal	96
Yüksek	4
<b>PTZ/INR</b>	
Normal	98
Yüksek	2
<b>Hgb/Htc</b>	
Normal	98
Düşük	2

**Tablo 3.** Hormonal testlerin sonuçları

HORMONAL TESTLER	HASTA SAYISI
AFP	
Normal	99
Yüksek	1
CEA	
Normal	100
Yüksek	0

50 hastada HBVDNA düzeyi  $10^4$  kopya/ml idi. 25 hastada, HBVDNA düzeyi  $10^5$  kopya/ml idi. 13 hastada HBVDNA düzeyi  $10^6$  kopya/ml, 2 hastada  $10^7$  kopya/ml, 8 hastada  $10^8$  kopya/ml, 2 hastada ise  $10^{11}$  kopya/ml idi (Tablo 4).

**Tablo 4.** Hastaların HBVDNA düzeyleri (kopya/ml)

HBV DNA Düzeyleri	Hasta Sayısı
$10^4$ Kopya/ml	50
$10^5$ Kopya/ml	25
$10^6$ Kopya/ml	13
$10^7$ Kopya/ml	2
$10^8$ Kopya/ml	8
$>10^8$ Kopya/ml	2

Çalışmaya alınan hastaların 78'inde, AntiHBe pozitifliği mevcuttu. Geriye kalan 22 hastada ise; HBeAg pozitifliği vardı (Tablo 5).

**Tablo 5.** Hastaların HBe Ag- Anti HBe pozitiflik durumu

HBeAg DURUMU	POZİTİF HASTA SAYISI
HBeAg	22
Anti HBe	78

Çalışmaya alınan hastaların kolesterol profilleri de incelendi ve 37 hastada hiperkolesterolemi saptandı (Tablo 6). Hastaların 87'sinde tiroid fonksiyon testleri normal 13'ünde hipertiroidi saptandı (Tablo 7).

**Tablo 6.** Hastaların kolesterol ve tiroid fonksiyon testleri

KOLESTEROL DÜZEYİ	HASTA SAYISI
NORMAL	63
YÜKSEK	37

**Tablo 7.** Hastaların Tiroid fonksiyon testleri sonuçları

<b>TİROİD FONKSİYON TESTLERİ</b>	<b>HASTA SAYISI</b>
NORMAL	87
YÜKSEK	13

Hastaların ultrasonografik olarak yapılan karaciğer incelenmelerinde, 52 hastanın karaciğerinin normal görünümde olduğu gözlemlendi. 31 hastada hepatosteatoz, 11 hastada karaciğerde granülasyon, üç hastada kaba granülasyon, üç hastada ise hepatosplenomegali saptandı (Tablo 8).

**Tablo 8.** Hastaların ultrason bulguları

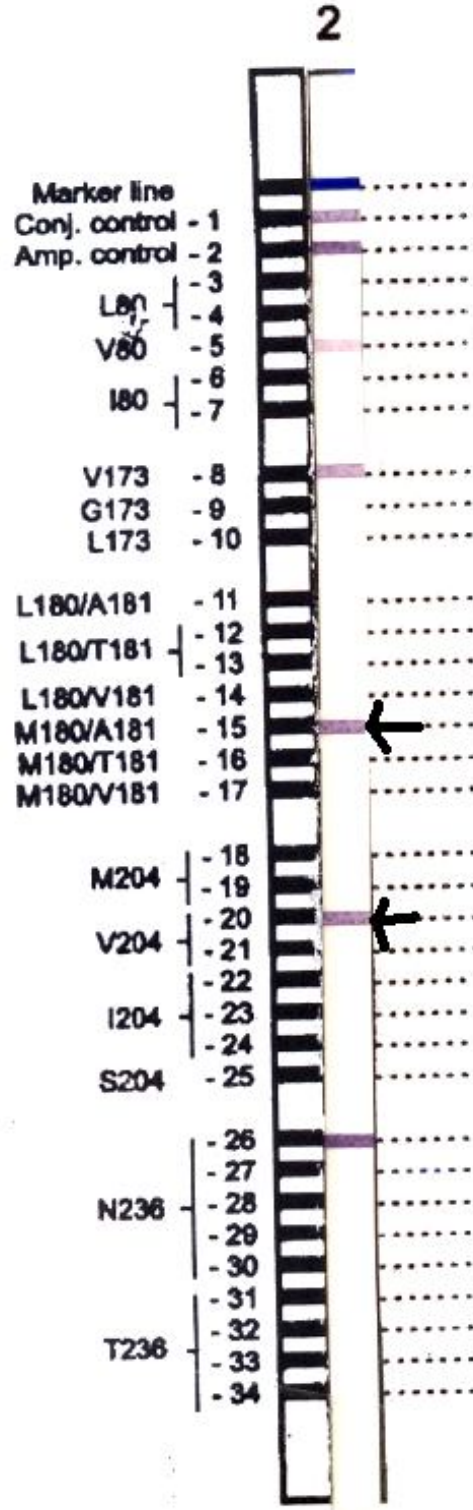
<b>USG</b>	<b>Hasta Sayısı (%)</b>
NORMAL	52
HEPATOSTEATOZ	31
GRANÜLE	11
KABA GRANÜLE	3
HSM	3

25 hastaya, Braun Hepafix Luer lock 17G/1,4 mm iğne ile perkütan karaciğer biyopsisi yapıldı. ISHAK skoruna göre hastaların ortalama histolojik aktivite indeksi (HAI) 8<sup>+</sup>/2 ve evre 2<sup>+</sup>/1 olarak saptandı. En düşük HAI; 5, en yüksek HAI; 12 olarak saptandı. En düşük evre; evre 1, en yüksek evre; evre 3 olarak belirlendi (Tablo 9).

**Tablo 9.** Hastaların karaciğer biyopsisi sonuçları

<b>Karaciğer biyopsisi</b>	<b>İshak skoru</b>
1) HAI	MİN : 5 MAX : 12
2) EVRE	MİN : 1 MAX : 3

Çalışmaya alınan hastaların serum örnekleri alınıp, INNO-LİPA yöntemiyle direnç mutasyon noktaları araştırıldı. Tüm hastaların genotip D ile enfekte oldukları saptandı. Yalnızca bir hastada, primer lamivudin direnci saptandı. Pozitif hastanın test strip görüntüsü Şekil 10'da verilmiştir.



**Şekil 10.** INNOLİPA test stribinde M204V ve L180M mutasyonlarının görünümü

Yapılan istatistiksel analizle ALT yüksekliği ile HBV DNA yüksekliği arasında pozitif korelasyon saptandı (p 0,012). Ancak ALT yüksekliği ile HAI ve Fibroz skoru arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı (p=0,436, p=0,712). HBVDNA ile HAI ve Evre arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı (p=0,480, p= 0,625) (Tablo 10).

**Tablo 10.** ALT nin, HBV DNA, HAI ve Evre arasındaki ilişkisi

Parametre	HBVDNA	HAI	Evre
ALT	1,5x10 <sup>8</sup> +/- 1,3x10 <sup>8</sup>	8,2 +/- 1,8	2,4 +/- 0,69
Normal	6,0x10 <sup>9</sup> +/- 5,7x10 <sup>9</sup> *	7,8 +/- 1,7	2,1 +/- 0,71
Yüksek			

\* HBVDNA ve ALT yüksekliği arasında pozitif korelasyon saptanmıştır. P<0,05

İstatistiksel analiz sonucunda, HBeAg pozitifliği ile HBVDNA ve ALT yüksekliği arasında anlamlı korelasyon saptandı (p=0,003). Verilerin analizi Tablo 11’de sunulmuştur.

**Tablo 11.** HBeAg ile HBV DNA ve ALT ilişkisi

Parametre	HBVDNA*	ALT*	HAI	EVRE
HBeAg				
<b>Pozitif</b>	1,1x10 <sup>10</sup> +/-9,6x10 <sup>9</sup>	126+/-33	7 +/-1,3	2,1 +/-0,6
<b>Negatif</b>	1,1x10 <sup>8</sup> +/- 1,1x10 <sup>8</sup>	53 +/-8,2	8,4 +/-1,7	2,2 +/-0,7

\* ortalama +/- standart sapma verilmiştir.

Kolesterol düzeyleri ile HBVDNA, ALT yüksekliği, HAI ve Evre değerlendirilmiş ve anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Veriler Tablo 12’de sunulmuştur.

Hastaların TFT düzeyleri ile HBVDNA, ALT yüksekliği, HAI ve Fibroz skoru değerlendirilmiş, anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Verilerin istatistiksel analizi Tablo 12’de sunulmuştur.

**Tablo 12.** Kolesterol ve TFT'nin HBVDNA, ALT yüksekliği, HAI ve evre arasındaki ilişkisi

Parametre	HBV DNA	ALT	HAI	Evre
<b>KOLESTEROL</b>				
Normal	2,4x10 <sup>8</sup> +/-1,4x10 <sup>8</sup>	67 +/-12,8	8,3 +/-1,8	2,3 +/- 0,17
Yüksek	5,8x10 <sup>9</sup> +/-5,6x10 <sup>9</sup>	73 +/-16,8	7,2 +/-1,2	2,0 +/-0,2
<b>TFT</b>				
Normal	2,6x10 <sup>9</sup> +/-2,4x10 <sup>9</sup>	69 +/-11,0	8,0 +/- 1,8	2,2 +/- 0,16
Yüksek	1,2x10 <sup>8</sup> +/-0,8x10 <sup>8</sup>	72 +/-26,2	7,7 +/- 0,4	2,2 +/- 0,25

\* Veriler ortalama +/- standart sapma şeklinde verilmiştir.

Ultrason bulgularıyla; HBVDNA, ALT yüksekliği, HAI ve fibroz skoru ile arasındaki ilişki istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Veriler Tablo 13'de verilmiştir.

**Tablo 13.** Ultrason bulgularıyla HBV DNA, ALT yüksekliği, HAI ve EVRE arasındaki ilişki

USG	HBV DNA(n)	ALT(n)	HAI (n)	EVRE (n)
1. Normal	1,4x10 <sup>8</sup> +/- 4,6x10 <sup>7</sup> (52)	77,9 +/- 17,8(52)	7,8 +/-0,5 (15)	2,2 +/- 0,20 (15)
2. Hepatosteatoz	6,9x10 <sup>9</sup> +/- 3,8x10 <sup>8</sup> (31)	57 +/- 7,8 (31)	7,7 +/- 0,4 (7)	2,1 +/- 0,26 (7)
3. Granüle	1,1x10 <sup>9</sup> +/- 7,8x10 <sup>8</sup> (11)	80 +/- 29 (11)	9,5 +/-1,5 (2)	3,0 (2)
4. Kaba granüle	1,75x10 <sup>3</sup>	(3) 29 +/- 8,6 (3)	9,0 <sup>a</sup>	(1) 2 (1)
5. HSM	1,1x10 <sup>4</sup>	(3) 53 +/- 26 (3)		

<sup>a</sup> Yalnızca bir hastada saptanmıştır.

n Hasta sayısı

Lamivudin direnci saptanan hasta; 20 yaşında erkek hastaydı. Yaklaşık 10 yıl önce yapılan tetkikler sonrası tesadüfen tanı koyulmuş olan hastanın annesinde kronik hepatit B hastalığı mevcuttu. Hastanın HBeAg pozitifliği mevcuttu, ALT düzeyi tanı anında 82 IU/ml, HBVDNA düzeyi ise 10<sup>7</sup> kopya /ml idi. Hastaya planlanan karaciğer biyopsisi, hasta onayı alınmadığından yapılamadı. Diğer biyokimyasal parametreleri ile TFT'leri ve USG' sinin normal olduğu saptandı.

#### 4. TARTIŞMA

Dünya genelinde yaklaşık 300 milyon kronik hepatit B enfeksiyonlu hasta bulunmakta ve bu hastaların %10'u HBV ile ilişkili kronik hastalık nedeniyle kaybedilmektedir. Dünya genelinde %8'den fazla olan yüksek prevalanslı (Afrika, Asya ve Batı Pasifik) bölgeler yanında, %2'den daha düşük prevalanslı (Batı Avrupa, Kuzey Amerika ve Avustralya) bölgeler de bulunmaktadır (99). Ülkemiz ise; Güney ve Doğu Avrupa ülkeleri ile birlikte %2-7 prevalans oranı ile orta prevalanslı alanlar içerisinde yer almaktadır.

Hepatit B virüsü kan dolaşımına katıldıktan sonra karaciğere yerleşip çoğalmaktadır. Enfekte hepatositlere karşı gelişen immün saldırı sonucu, hepatositlerin hasarı ve bunun sonucunda da transaminaz seviyelerinde yükselmeler gözlenmektedir. Kronik hepatit B enfeksiyonlu hastalarda ise etkin ve yeterli immün yanıt oluşmamaktadır. Ancak bu hastalarda aralıklı olarak gözlenen viral replikasyonlarla, immün sistem aktive olmakta ve transaminaz değerleri yükselmektedir. Her immün saldırı ile birlikte fibröz bantlarda artış olmakta ve siroz, HCC riski artmaktadır (99).

Hepatit B virus markerlarından HBeAg, HBsAg ile birlikte eş zamanlı ortaya çıkar ve genellikle vahşi suş ile enfekte hastalarda pozitif olarak kalır (99).

Ljunggren ve ark.'nın (100), yaptıkları bir çalışmada; HBeAg pozitif 13 hastanın dokuzunda, anti-HBe pozitif 27 hastanın yedisinde ALT'nin yüksek olduğu saptanmıştır. Bu çalışmada, ALT yüksekliği ile HBeAg pozitifliği arasında anlamlı korelasyon saptanmıştır. Anti-HBe pozitif olan 27 hastanın 12'sinde, HBV DNA'nın yüksek olduğu ve 12 hastanın altısında ALT'nin de yüksek olduğu görülmüştür.

Rabbi ve ark.'nın (101) yaptıkları çalışmada ise, yüksek ALT düzeyine sahip olan HBeAg pozitif 28 hasta ile anti-HBe pozitif 38 hasta karşılaştırılmıştır. HBeAg pozitifliği olan hastalarda, HBV DNA ile ALT yüksekliği oranının % 92,8 olduğu, HBeAg negatifliği olan hastalarda ise bu oranın %36,8 olduğu belirtilmiştir. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık da saptanmıştır.

Cheng ve ark.(102) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise; HBeAg pozitifliği bulunan ve normal ALT düzeyi olan hastalar ile HBeAg pozitifliği bulunan ve yüksek ALT düzeyi olan hastalar, HBVDNA düzeyleri açısından karşılaştırılmış, anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Bunun yanında, anti-HBe

pozitif ve ya hem HBeAg hem de anti-HBe negatif hastalarda, normal ve yüksek ALT düzeyine sahip gruplar karşılaştırılmış, istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır. Anti-HBe pozitif ve ALT yüksekliği olan hastaların yarısında HBVDNA pozitif olarak saptanmıştır. HBVDNA negatif olan tüm hastalarda ise ALT düzeylerinin normal olduğu gözlenmiştir. HBeAg ve anti-HBe'nin her ikisinin de negatif olduğu 21 hastanın %60'ında HBVDNA yüksekliği gözlenmiş ve bu hastaların hiç birinde normal ALT saptanmamıştır.

Bizim çalışmamızda da; 78 anti-HBe pozitif ve 22 HBeAg pozitif olan toplam yüz hastadan 37'sinde ALT yüksekliği gözlenmiştir. Bu hastalardan 20'sinde HBeAg negatifliği, 17'sinde HBeAg pozitifliği olduğu saptanmıştır. ALT yüksekliği olan tüm hastalarda HBVDNA'nın da yüksek olduğu gözlenmiştir. Hastalarımızda, HBeAg pozitifliği, ALT yüksekliği ve HBVDNA arasında anlamlı korelasyon saptanmıştır (p=0,003).

Kronik hepatit B enfeksiyonlu hastalarda kullanılan antiviral ajanlara karşı direnç gelişimi, kullanım süresine bağlı olarak artmaktadır. Kronik hepatit B tedavisinde ilk kullanıma giren ajan Lamivudin'dir (99).

Lamivudin, kronik hepatit B tedavisinde 1998 yılında FDA onayı almış olan bir nükleozid analogudur. Bir sitozin analogu olan Lamivudin (dideoxy-2',3'-thiacididine), çoğalan DNA içerisine girerek, erken zincir sonlanmasına neden olmaktadır.

Lamivudin, günde tek doz 100 mg oral olarak alınır. İyi tolere edilir, geniş güvenlik profiline sahiptir. Kronik hepatit B tedavisinde kullanılan diğer anti-viral ajanlara göre tek dezavantajı, lamivudin tedavisi sırasında daha çok görülen, ilaç direncidir. Lamivudin direnci hastayla ilgili yaş, cinsiyet, hastalık durumu gibi hiçbir faktörle ilişkili değildir.

Lamivudinle viral süpresyonun sağlanabilmesi için, tedavinin uzun süre devam etmesi gerekmektedir. HBeAg serokonversiyonu, bir yılda %16-22, tedavi edilmeyen grupta ise %4-13'dür (103).

Lamivudin direnci, diğer L nükleozidlere, nükleotid analoglarına çapraz direnci artırıp, diğer antivirallere duyarlılığı da sınırlamaktadır. Bu nedenle tedavi seçeneklerini kısıtlamaktadır (104, 105).

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda; 1. yılda % 12-15 kadar olan lamivudin direnç oranının, 2. yılda % 35-45, 3. yılda % 45-50, 4. yılda % 50-60 ve 5. yılda % 60-70 oranında olduğu ve direnç oranlarının hastalık süresiyle doğru orantılı olarak arttığı belirtilmektedir (103-105).

Lamivudin direncine; polimeraz geninin reverse transkriptaz bölgesindeki B alanında, 180. kodonda bulunan lösinin, metiyonine (rtL180M) ve YMDD mutasyonu olarak isimlendirilen C alanındaki 204. kodonda bulunan metiyoninin valin ya da izolösine değişmesinin neden olduğu gösterilmiştir (103-106).

Yüksek viral yüke sahip bireylerde ( $10^{11}$ - $10^{12}$  replikasyon olan hastalarda); günlük %50'lere varan oranda replikasyon görülmektedir. Bu olgularda, her revers transkripsiyon döngüsünde  $10^4$ - $10^5$  mutasyon beklenmekte, tek nokta mutasyonları kadar, 2-3 nokta da mutasyonları da görülmektedir. Aynı hastada dirençli mutant suş ile mutant olmayan suş bir arada bulunabilmektedir. Yüksek viral yükü olan hastalarda tedaviye potent antiviral etkinliği olan ilaçlarla başlanmadığı durumlarda, tam viral baskılanma sağlanamayacağından dirençli mutantlar seçilecek ve baskın tür haline gelecektir. Bu mutant suşların replikasyon yetenekleri düşük olsa da, direkt olarak başka bir hastaya bulaşabilmektedir (105).

Ucuz ve kullanımı kolay olan lamivudin, kronik hepatit B tedavisinde 10 yıldan fazla süredir, HIV tedavisinde ise daha da uzun bir süredir kullanılmaktadır. Önemli bir yan etkisi bulunmamaktadır. Ancak lamivudin potent bir antiviral değildir. Lamivudin tedavisinin verilmesiyle, dirençli suş seçilebilmekte ve bu dirençli suşun çoğalmasıyla hastalarda tedavi altında virolojik ve biyokimyasal kırılmalar (breakthrough) gözlenebilmektedir.

Ülkemizde uygulanmakta olan sağlık uygulama tebliğinde; kronik hepatit B tedavisine HBV DNA düzeyi  $\leq 10^7$  kopya/ml olan erişkin hastalarda, oral antiviral tedaviye günde 100 mg lamivudin ile başlanılmaktadır. Bu nedenle lamivudin ülkemizde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Bu çalışmanın amacı; tedaviye lamivudin ile başlamanın ne kadar etkin olduğunu değerlendirmektir. Bu amaçla, herhangi bir tedavi almamış olan kronik hepatit B enfeksiyonlu hastalarda lamivudine direnci İNNO-LİPA yöntemiyle araştırılmıştır.

Hepatit B virüs enfeksiyonu tedavisi için viral gen havuzunun analizinde, duyarlılığı ve belirleyiciliği yüksek bir genotipleme yönteminin kullanılması önemli bir yere sahiptir. Bunun için şimdiye kadar kullanılan yöntemlere; doğrudan dizi analizi yöntemi (sekans analizi), klonal dizileme, oligonükleotid problarla hibridizasyon, FRET teknolojisini kullanan Taqman PCR yöntemi ve 5' nükleaz yöntemi, restriksiyon parçaları kütle polimorfizmi (RFMP), yüksek yoğunluklu DNA Prob dizinleri ve oligonükleotid chipleri örnek verilebilir (106, 107).

Malström ve ark.'nın (103) yaptıkları bir çalışmada, lamivudin direnci olduğu bilinen beş hastanın 27 serum örneğinde, Taqman PCR yöntemi ile viral polimeraz geninin 180. ve 204. kodonları taranmıştır. Bu çalışma, RFLP ve sekans analizi ile karşılaştırılmıştır. Bu çalışmanın sonucuna göre, Taqman PCR yönteminin hızlı, maliyet etkin ve kullanışlı olduğu vurgulanmıştır.

Restriksiyon parçaları uzunluk polimorfizmi (RFLP- Restriction fragment length polimorfizm) ve 5'-nükleaz aktiviteli Taq DNA polimeraz çalışmaları, diğer iki yeni mutasyon tarama yöntemidir. Bu testler HBVDNA genomu ml'de <1,000 kopyanın altında olup, lamivudin tedavisi alan hastalarda varyantları taramak için geliştirilmiş yeni yöntemlerdir. Her iki yöntemde HBVDNA polimeraz geninde tek nükleotid değişikliklerini tarama için dizayn edilmiştir. Allen ve ark.'nın (106) çalışmasında, bu iki yeni test, sekans analizi ile karşılaştırılmış ve düşük konsantrasyonlarda bile vahşi tip ile YMDD mutantlarının ayrılabilirdiği belirtilmiştir.

Deoksiribonükleaz (DNA) sekanslama, diğer testlere göre daha fazla tarama yapabildiğinden daha verimli bir testtir. DNA sekanslama gibi bu iki testte PCR ile DNA amplifikasyon aşamasına ihtiyaç duymaktadır ve bu testler DNA sekanslamaya göre daha az miktarda virüs varlığında tarama yapabilme yeteneğine sahiptir. Bununla beraber, bu testler DNA sekanslamaya göre daha az iş gücü gerektirmektedir. RFLP testi; mutant suşları tespit etmede, DNA sekanslama yönteminden daha sensitiftir. RFLP testi ve 5'-nükleaz testinin duyarlılıkları eşit olsa da miks viral suş varlığında RFLP testi, 5'-nükleaz testine üstündür (106-108).

Tran ve ark.(107) tarafından yapılan bir çalışmada ise; 170 örnekte Pol, S ve prekor ve bazal kor promotor bölgeleri sekanslanmış ve Chip teknolojisi ile 1053 (%90) kodon amplifiye edilip, analiz edilmiştir. Yüz elli bir örneğin 148'inde

sekanslama ve Chip ile genotiplerin uyumlu olduğu gösterilmiştir. Her iki yöntemle 12,161 kodon taranmış ve %92,8'inin aynı olduğu gösterilmiştir.

Gen chip tekniği ile aynı anda ve hızlıca vahşi tip virüs ile YMDD, YVDD, YIDD mutasyonları saptanabilmektedir. Gen chip tekniğinin, HBV polimeraz geninde YMDD mutasyonunu saptamada güvenilir ve özgülüğünün yüksek olduğu sonucuna varılmıştır (109).

Düşük titredeki mutant suşları tespit etmede, altın standart olarak dizi analizi öncesi klonlama kabul edilmektedir. Fakat bu yöntem, iş gücünün fazlalığı sebebiyle rutin taramalarda kullanılmamaktadır. Bunun için en yaygın olarak, doğrudan dizi analizi (sekanslama) yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntem de suşları ancak tüm popülasyonda en az %20 oranında buldukları zaman tespit edebilmektedir. Daha duyarlı olan, mutantlara özgü oligonükleotid problemlerle hibridizasyon (LİPA) ve RFLP yönteminde ise bu oran % 5 kadardır (106-108).

Niesters ve ark. (94)' nın İNNO-LİPA testinin duyarlılığını değerlendirdikleri çalışmada, testin wild tip ve mutant virüsleri ayırmadaki başarısının oldukça yüksek olduğu saptanmıştır. İlk testte tanısallık duyarlılığının %94,8 olduğu belirtilmektedir. Tekrarlayan testlerle duyarlılığın arttığı, ilk tekrarlayan testte %96,3, ikinci tekrarlayan testte ise %100 oranına ulaştığı belirtilmektedir. Tanısal yararlılığının ise, sekanslama ile LİPA arasında %77 uyumlu olduğu belirtilmektedir (94).

Son zamanlarda geliştirilen MALDI TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time of Flight) kütle spektrometresi ile restriksiyon parçası kütle polimorfizmi (RFMP) yöntemi daha duyarlı yöntemlerdir. Bu yöntemle 100 kopya/ml HBVDNA varlığında bile varyantlar tespit edilebilmektedir. Miks suş varlığında en yüksek özgülüğe sahip olan yöntemler; MALDI TOF ve RFMP gibi kütle spektrometrisinin kullanıldığı yöntemlerdir. MALDI TOF yöntemiyle %1'lik mutant popülasyon saptanabilmektedir. Hassaslığı, doğruluğu ve yüksek miktarda genomu değerlendirebilme yeteneği nedeniyle uygun bir yöntem olduğu belirtilmektedir (106-108).

Chip tekniği ile virüs DNA'sında çoklu mutasyonları tarama yöntemi; özellikle viral 'quasispecies' popülasyonu için geliştirilmiş olan bir diğer mutasyon

analiz yöntemidir. Yeni kullanılmaya başlanmıştır ve duyarlılığı % 10 kadardır (106-108).

Tüm bu yöntemlerin ortak noktası; polimeraz zincir tepkimesine ihtiyaç göstermeleridir. Dolayısıyla, yöntemlerin duyarlılık ve belirleyicilikleri PCR'ın duyarlılığı ve belirleyiciliğine bağlıdır. Yöntemlerin içinde duyarlılık ve belirleyicilik yönünden RFMP yöntemi, en duyarlı yöntemdir.

Toplumda lamivudin dirençli suşlarla enfekte kronik hepatit B taşıyıcı hastaları olduğu, dünyanın çeşitli bölgelerinde yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Bazı araştırmacılar, hiç lamivudin kullanmamış olan HBeAg pozitifliği ve ya HBeAg negatifliğine sahip kronik hepatit B enfeksiyonlu hastaların serumlarında YMDD mutasyon motifine sahip suşlar saptamışlardır. Bu farklı çalışma gruplarında, YMDD mutasyon oranları %7,5-%29,5 olarak saptanmıştır. Bu farklılık toplumu enfekte eden HBV virüsünün genotip farklılığına bağlanabilir ki, bu mutasyon çoğunlukla genotip C'de ve miks genotiple olan enfeksiyonlarda gözlenmektedir (110-124).

Kirishima ve ark.'nın (110), konvansiyonel RFLP testi kullanarak 18 tedavi almamış anti HBe pozitif kronik hepatit B enfeksiyonlu hasta üzerinde yaptıkları bir çalışmada; 4 (%24,2) hastada YMDD mutant suş saptanmıştır. Bu dört hastanın ikisinde; YMDD+YVDD ( tirozin-valin-aspartat-aspartat) ve ikisinde ise; YMDD+YIDD ( tirozin-izolösin-aspartat-aspartat) mutasyonu tespit edilmiştir. Bu çalışma sonucunda; kronik hepatit B enfeksiyonlu hastalarda, tedavi öncesinde ve tedavi süresince direncin monitörize edilmesinin, tedavinin yönlendirilmesinde yol gösterici olduğu vurgulanmıştır.

Japonya'da Kobayashi ve ark.'nın (111), tedavi almamış kronik hepatit B enfeksiyonlu 18 hastayı değerlendirdikleri bir çalışmada ise, 5 (%27,7) hastada YMDD mutasyonu saptanmıştır. Bunlardan üçünde YMDD+YIDD, ikisinde YMDD+YVDD+YIDD olduğu gösterilmiştir. Bu çalışma da sekanslama yöntemi kullanılmıştır. Kobayashi ve ark., anti-HBe pozitif olan tüm hastalarda YMDD mutasyonu saptamışlardır. Bu çalışmanın sonucunda, lamivudin tedavisi almamış olan asemptomatik taşıyıcılarda YMDD mutasyonu olabileceği kanısına varılmıştır.

Yan ve ark.'nın (112), tedavi almamış 110 hasta ile yaptıkları bir çalışmada, 19 (%17,7) hastada YMDD mutasyonu olduğu gösterilmiştir.

Shin ve ark.'nın (113), daha önce hiç antiviral tedavi almamış 34 kronik hepatit B enfeksiyonlu ve altı sirozlu toplam 40 hastayla yaptıkları bir çalışmada, sekanslama ve RFLP yöntemiyle YMDD, YVDD ve YIDD mutasyonları taranmış ve YMDD mutasyonunu; iki kronik hepatit B enfeksiyonlu ve bir sirozlu hasta olmak üzere toplam üç hastada (%7,5) saptanmıştır. Kronik hepatit B enfeksiyonu olup antiviral tedavi almamış olan hastalarda spontan YMDD mutasyonu olabileceğini belirtilmiştir.

Leon ve ark.'nın (114), yaptıkları çalışmada; randomize olarak seçtikleri 79 kronik hepatit B taşıyıcısında, lamivudin direnci LİPA yöntemiyle taranmış ve 10 hastada dirence yol açan noktalarda mutasyon olduğu saptanmıştır. En çok gözlenen mutasyonun, rtM204I mutasyonu olduğu ve 6 (%7,5) hastada gözlendiği belirtilmiştir. Tek başına rtM204V mutasyonu, bir hastada ve rtV207I mutasyonu ise başka bir hastada gözlenmiştir. Bir hastada rtL180M mutasyonu, rtM204I mutasyonu ile birlikte gözlenmiştir. Bu çalışmada, mutasyon saptanan hastaların üç tanesinin (%3.8), daha önce herhangi bir antiviral tedavi almadığı kanıtlanmıştır. Bu üç hastadan iki tanesinde vahşi suşla beraber rtM204I ve ya rtV207I mutasyonunun beraber olduğu gösterilmiş ve bir tanesinde ise yalnızca rtV207I olduğu belirtilmiştir. Hastalara tedavi planlarken, tedavi başarısızlığı görülme ihtimali nedeniyle öncesinde rutin mutasyon taraması yapılmasının yararlı olabileceği vurgulanmıştır.

Bunun yanında Zhang ve ark.'nın (115), antiviral tedavi almamış olan kronik hepatit B enfeksiyonlu 150 hastayı değerlendirdikleri bir başka çalışmada, hasta serumlarında, HBVDNA düzeyleri gen chip tekniğiyle araştırılmış ve 122 hastada YMDD mutasyonu saptanmıştır. YMDD mutant olmayan (vahşi tip) suş ile enfekte 90 (%78 ) iken, 28 hastada (%22,9) YVDD, iki hastada YIDD (%1,6), iki hastada ise YIDD/YVDD (%1,6) miks mutasyonu belirlenmiştir. Toplam mutasyon oranı %26,2 olarak saptanmıştır. Bu çalışma sonucunda; hastalarda, tedaviye yanıt alabilmek için tedavi öncesi ve tedaviden sonra YMDD mutasyonunu değerlendirmek gerektiği vurgulanmıştır.

Matsuda ve ark.'nın (116) çalışmasında da, lamivudinle tedavi edilmemiş, kronik hepatit B enfeksiyonlu hastalardan ikisinde, YMDD mutasyonu olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada başka bir hastada, lamivudin direnci gösterilmemesine rağmen, tedaviyle akut alevlenme ve hepatik ensefalopati

gözlenmiştir. Bu hastanın tedavi öncesi ve sonrası serum örnekleri tekrar incelendiğinde, her ikisinde de YIDD mutasyonu olduğu saptanmıştır. HBV DNA klonlarındaki aminoasit sekanslarının, tedavi öncesi ve sonrası aynı olmadığı gözlenmiştir. Lamivudin tedavisi sırasında breakthrough gelişen başka bir hastada, tedavi öncesi ve tedavi sonrası serum örneklerinde, YIDD mutasyonu olduğu gösterilmiş, bu hastada da, HBV DNA klonlarının aminoasit sekansı incelendiğinde, hastanın tedavi öncesi ve tedavi sonrasında aminoasit sekansının uyumlu olmadığı saptanmıştır.

Heo ve ark. (117) tarafından yapılan ve bir tanesi HBeAg pozitif olan 40 lamivudin naiv hastanın değerlendirildiği bir başka çalışmada, hastaların serum örnekleri, vahşi tip YMDD mutasyonu (M552V ve M552I mutasyonlarını) saptamak üzere geliştirilmiş oligonükleotid chip tekniği ile çalışılmış ve her bir örnek için, M552I mutasyonu varlığı, RFLP ve direkt sekanslama testleri ile de değerlendirilmiştir. İki kronik hepatit B ve bir sirozlu hasta olmak üzere toplam üç hastada, oligonükleotid chip teknolojisi ve RFLP ile uyumlu sonuçlar alınmıştır.

Ye ve ark. (109), YMDD mutasyonlarının çoğunlukla anti-HBe pozitifliği olan vakalarda gözlendiğini ve YMDD mutasyonunun anti-HBe pozitiflerde daha kolay gerçekleştiğini belirtmişlerdir.

Çin’de, Huang ve ark.’nın (118) yaptıkları bir çalışmada, lamivudin tedavisi ve ya son bir yıl içinde herhangi bir antiviral tedavi almamış kronik hepatit B enfeksiyonlu toplam 104 hasta değerlendirilmiştir. Bu hastaların serum örnekleri alınıp, YMDD mutasyonları, mikrokozmetik nükleik asit ve çapraz nükleik asit kantitatif tarama yöntemiyle çalışılmıştır. Bu çalışmada, 28 hastada (%26,9) YMDD mutasyonu saptanmıştır. HBeAg pozitif olan hastalarda YMDD mutasyonunu %27,1 (16/59) ve HBeAg negatif olan hastalarda ise; %26,7 (12/45) saptanmış, her iki grup arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır.

Lee ve ark.’nın (119), yaptıkları başka bir çalışmada; kronik hepatit B enfeksiyonu olan 28 hastanın lamivudin tedavisi öncesi ve sonrası serum örneklerinde YMDD mutasyonları taranmış, tedavi öncesi HBeAg pozitif 12 hastanın sekizinde ve HBeAg negatif 16 hastanın sekizinde YMDD mutasyonu saptanmıştır. Tedavi sonrasında ise; HBeAg pozitif hastaların iki tanesinde ve HBeAg negatif hastaların yedi tanesinde YMDD mutasyonu gösterilmiştir.

Bizim çalışmamızda; tedavi almamış olan 22 HBeAg pozitif ve 78 HBeAg negatif kronik hepatit B enfeksiyonlu toplam yüz hasta değerlendirilmiştir. Çalışmamızın sonucunda primer lamivudin direncinin %1 olduğu saptanmıştır. Bu hastada HBeAg pozitifliği olup, rtM204V ve rtL180M mutasyonu olduğu gözlenmiştir.

Ülkemizde Akarsu ve ark.'nın (120) yaptıkları bir çalışmada, inaktif HBsAg taşıyıcısı olup, en az bir yıl süreyle ve üçer ay aralıklarla ALT seviyeleri takip edilip normal olduğu gösterilmiş ve interferon ve ya antiviral tedavi almamış olan anti-HBe pozitif 71 hasta değerlendirilmiştir. Hastaların serumları alınarak, INNO-LIPA yöntemiyle mutasyon analizi çalışılmış, anti-HBe pozitifliği olan 71 hastanın 13'ünde (%18,3) YMDD mutasyonu saptanmıştır. Bu 13 hastanın 10'unda (%76,9) rtL180M mutasyonunun da eşlik ettiği ve 13 hastanın 11'inde YMDD ve vahşi süşun beraber olduğu gösterilmiştir. İki hastada YIDD ve/ve ya YVDD mutasyonu, rtL180M mutasyonunun beraber olduğu ancak YMDD mutasyonunun olmadığı gösterilmiştir.

Tunçbilek ve ark.'nın (121) yaptıkları başka bir çalışma da; 77 kronik hepatit B enfeksiyonlu hasta değerlendirilmiş, viral genomun PCR ile amplifikasyonu sonrası sekans analiziyle mutasyonlar araştırılmıştır. HBeAg pozitifliği olan 24 hastanın üçünde, anti-HBe pozitifliği olan 53 hastanın üçünde olmak üzere toplam altı hastada (%7,8) mutasyon belirlenmiştir. Mutasyonların ikisinin YIDD, dördünün YVDD olduğu saptanmıştır.

Sayan ve ark.'nın (122) yaptıkları çalışmada ise; kronik hepatit B enfeksiyonu olan 66 HBeAg negatif, 22 HBeAg pozitif toplam 88 naiv hasta değerlendirilmiştir. Sekanslama ile HBVDNA polimeraz bölgesi çalışılmış, HBeAg negatifliği olan hastaların 30 (%34)'unda ve HBeAg pozitifliği olan hastaların 17 (%19)'sinde doğal aminoasit değişiklikleri olduğu saptanmıştır. Her aminoasit değişikliği tek başına saptanmış ve rtA194T, rtV214A, rtQ215S, rtI233V, rtN236T noktalarında gözlenmiştir. Bu çalışma sonucunda da hastalarda daha iyi tedavi yönetiminin sağlanması için, her hastanın tedavi öncesinde değerlendirmesi gerektiği belirtilmiştir.

Yıldız ve ark.'nın (123), 245 kronik hepatit B ve 38 inaktif hepatit B taşıyıcısı toplam 283 hasta üzerinde yaptıkları bir çalışmada, PCR ve sekans analizi

ile HBV genotipi saptanmıştır. YMDD mutasyonu ise RT hibridizasyon metodu ile çalışılmıştır. Çalışmaya dâhil edilen hastaların 104 (%39)'ünün önceden bir antiviral tedavi aldığı, bunlarında 32 (%30.8)'sinin lamivudin tedavisi almış olduğu belirtilmiştir. Çalışmaya dâhil edilen hastaların 25 (%10,7)'inde lamivudin direnci saptanmıştır. Sekiz (%4) hastada primer lamivudin direnci saptanmışken, sekonder lamivudin direnci ise 17 (%53.1) hastada saptanmıştır. 267 hastada genotip D belirlenmiştir. Bu çalışma da değerlendirilen toplam 202 lamivudin naiv hastanın sekizinde (%4) mutasyon saptanmıştır. Tedavi öncesinde YMDD mutasyonunun saptanmasının, hastalara uygun tedavinin verilmesinde faydalı olacağı vurgulanmıştır. Bu çalışma, bölgemize en yakın olan ilin sonuçlarını yansıtmaktadır. Bizim çalışmamızda da, primer direnç oranları, bu çalışmaya benzer şekilde düşük bulunmuştur.

Bunun yanında, lamivudin tedavisi almamış olan kronik hepatit B enfeksiyonlu hastalarda, YMDD mutasyonu saptamayan çalışmalarda vardır. Zhang ve ark.'nın (125) yaptıkları bir çalışma da, kronik hepatit B tanısı olan beş hastada, tedavi öncesi beş ve 48 haftalık lamivudin tedavisi sonrası beş olmak üzere toplam 10 serum örneğinde, PCR sonrasında sekanslama ile YMDD mutasyon motifi taranmış ve bu beş hastanın tedavi öncesinde alınan serumlarının hiç birinde YMDD mutasyon motifi gözlenmemiştir. Dört hastada tedaviden sonra YMDD mutasyon motifi saptanmıştır.

Matsuda ve ark.'nın (116) çalışmasında, çalışmaya alınan hastaların hiçbirinde mutasyon olmadığı belirtilmiş, ancak tedaviyle breakthrough gelişmesi üzerine tekrar yapılan değerlendirmede iki hastada YMDD mutasyonu olduğu belirtilmiştir.

Jardi ve ark.'nın (120) yaptıkları bir çalışmada, 111 tedavi almamış olan ancak daha sonra 18 ay süreyle lamivudin tedavisi verilen kronik hepatit B hastası değerlendirilmiş ve tedavi öncesi ve sonrasında serum örnekleri incelenmiştir. RT geninde sekans analizi ile mutasyonlar taranmış, lamivudin tedavisi uygulanmadan önce üç hastada (%2,7) ETV (rtS202S/I) direnci saptanmıştır. Bu hastaların hiç birinde lamivudin direnci saptanmamıştır.

Bizim çalışmamızda; ilimiz ve çevresinde incelenen kronik hepatit B enfeksiyonlu hiç tedavi almamış 100 hastalık bir seride, lamivudine dirençli yalnızca

bir suş tespit edilmiştir. Dünya genelinde yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında, çalışmamızda primer lamivudin direnç oranı düşüktür. Bunun nedenleri arasında; a) Çalışmaların yapıldığı ülkelerde genotipik farklılık ve ya miks genotip olabileceği b) Yöremizde uzun bir dönem interferon ile lamivudinin kombine uygulanmış olmasının olabileceği c) Son yıllarda daha potent antiviraller olan tenofovir ve entekavir gibi ilaçların, daha fazla kullanılmış olması olabileceği d) Dünya genelinde yüksek oranda gözlenen HIV oranlarının, YMDD mutasyonu fazla görülen ülkelerde yüksek olması ve dolayısıyla geçmişte bu ülkelerde daha yoğun lamivudin kullanılmış olabileceğini düşündürmektedir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda tekrarlayan INNO-LİPA testlerinde duyarlılığın arttıracağı vurgulanmaktadır.

Ülke genelinde yapılan diğer çalışmalarla kıyaslandığında da bizim çalışma sonucumuz diğer çalışmalara göre düşük bulunmuştur. Bunun nedeni verilerin toplandığı coğrafik bölgelerin farklı olması ve tedavide kullanılan antiviral tercihlerinin farklı olması olabilir.

Yöremizde böyle bir çalışma daha önce yapılmamıştır. Bu sonuç bizim yöremizde gözlenen ve dolaşımda olan hepatit B virüsünün vahşi suş ağırlıklı olduğunu, özellikle viral yükü yüksek olmayan hastalarda tedaviye lamivudin ile başlamanın etkin ve uygun bir tercih olduğunu desteklemektedir.

Sonuç olarak; şu anda lamivudinin uygun şartları sağlayan hasta grubunda ilk tercih antiviral olarak kullanılmasında sakınca olmadığı kanısına varılmıştır. Ancak; lamivudinin sık kullanılmasının da gelecekte lamivudine primer dirençli olan virüsün, toplumda baskın olabileceğini ve tedavide sorunlara yol açabileceği de hatırlanmalıdır. Dünya genelinde yapılan çalışma sonuçlarına göre; tedavi öncesinde her hastanın YMDD mutasyonu varlığı açısından değerlendirilmesi önerilmektedir. Ancak bu önerinin ülkemiz ölçeğinde uygulanabilirliğinin bulunmadığı ve maliyet etkin olmadığı da göz önünde tutulmalıdır. Yöremizde primer lamivudin direncinin düşük düzeyde saptanmış olması nedeniyle, özellikle viral yükü düşük olan hastalarda tedaviye lamivudin ile başlanmasının uygun olduğunu düşünmekteyiz.

## 5. KAYNAKLAR

1. Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection natural history and clinical consequences. *N Engl J Med* 2004; 350: 1118-1129.
2. Lavanchy D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment and emerging prevention and control measures. *J Viral Hepat* 2004; 11: 97-107.
3. Liaw YF. Prevention and surveillance of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 2005; 25: 40-47.
4. Margolis HS, Alter MJ, Hadler SC. Hepatitis B: evolving epidemiology and implications for control. *Semin Liver Dis* 1991; 11: 84-92.
5. Lai CL, Ratziu V, Yuen MF, Poynard T. Viral hepatitis B. *Lancet* 2003; 362: 2089-94.
6. Füsün ZA. Hepatit B virüsü enfeksiyonu. *Sted Derg* 2003; 12: 211-214.
7. Taşyaran MA. HBV Enfeksiyonu-Epidemiyoloji. Kılıçturgay K. (Ed) *Viral Hepatit* 98, 1. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 1998: 52-58.
8. Custer B, Sullivan SD, Hazlet TK, Iloeje U, Veenstra DL, Kowdley KV. Global epidemiology of hepatitis B virus. *J Clin Gastroenterol* 2004; 38: 158-168.
9. Sarı N, Günal Ö, Dizbay M, Hızel K, Aktaş F. Bir Üniversite Hastanesinde Temizlikten sorumlu şirket elemanlarında ve sözleşmeli hemşirelerde HBsAg ve Anti-HCV sıklığının araştırılması. *Viral Hepatit Derg* 2006; 11: 126-131.
10. Boxall EH, Flewett TH, Dane DS, Cameron CH, MacCallum FO, Lee TW. Hepatitis B surface antigen in breast milk. *Lancet* 1974; 2: 1007-1008.
11. Heathcote J, Cameron CH, Dane DS. Hepatitis B antigen in saliva and semen. *Lancet* 1974; 1: 71-73.
12. Irwin GR, Allen AM, Bancroft WH. Hepatitis B antigen in saliva, urine and stool. *Infect Immun* 1975; 11: 142-145.
13. Hoefs JC, Renner IG, Askhcavai M, Redeker AG. Hepatitis B surface antigen in pancreatic and biliary secretions. *Gastroenterology* 1980; 79: 191-4.

14. Knutsson M, Kidd-Ljunggren K. Urine from chronic hepatitis B virus carriers: implications for infectivity. *J Med Virol* 2000; 60: 17-20.
15. Lemon SM, Thomas DL. Vaccines to prevent viral hepatitis. *N Engl J Med* 1997; 336: 196-204.
16. Zoulim F, Trépo C. Drug therapy for chronic hepatitis B: antiviral efficacy and influence of hepatitis B virus polymerase mutations on the outcome of therapy. *J Hepatol* 1998; 29: 151-168.
17. Matsuda M, Suzuki F, Suzuki Y, Tsubota A, Akuta N, Hosaka T, et al. YMDD mutants in patients with chronic hepatitis B before treatment are not selected by lamivudine. *J Med Virol* 2004; 74: 361-366.
18. Shin YM, Heo J, Kim GH, Kang DH, Song GA, Cho M, et al. Natural YMDD motif mutations of HBV polymerase in the chronic hepatitis B virus infected patients. *Taehan Kan Hakhoe Chi* 2003; 9: 1-9.
19. Özdemir D, Kurt H. Hepatit B virüsü enfeksiyonlarının epidemiyolojisi. Tabak F, Balık İ, Tekeli E (Ed). *Viral Hepatit 2007*. 1. Baskı. İstanbul: Ohan Matbaası, 2007: 108-117.
20. Taşyaran MA. HBV Enfeksiyonu Epidemiyolojisi. Tekeli E, Balık İ (Ed). *Viral Hepatit 2003*. 1. Baskı, İstanbul: Ohan Matbaası 2003: 121-128.
21. Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. *Hepatology* 2001; 34: 1225-1241.
22. Seeger C, Mason WS. Hepatitis B Virus Biology. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000; 64: 51-68.
23. Cooper A, Paran N, Shaul Y. The earliest steps in hepatitis B virus infection. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1614: 89-96.
24. Ustaçelebi Ş, Ergünay K. Hepatit B virüsünün moleküler virolojisi. Tabak F, Balık İ, Tekeli E (Ed). *Viral Hepatit 2007*. 1. Baskı, İstanbul: Ohan Matbaası, 2007: 96-107.
25. Tiollais P, Pourcel C, Dejean A. The hepatitis B virus. *Nature* 1985; 317: 489-495.
26. Lau JY, Wright TL. Molecular virology and pathogenesis of hepatitis B. *Lancet* 1993; 342: 1335-1340.

27. Neurath AR, Kent SB, Strick N, Parker K. Identification and chemical synthesis of a host cell receptor binding site on hepatitis B virus. *Cell* 1986; 46: 429-436.
28. Kann M, Bischof A, Gerlich WH. In vitro model for the nuclear transport of the hepadnavirus genome. *J Virol* 1997; 71: 1310-1316.
29. Locarnini S. Molecular Virology of Hepatitis B Virus. *Semin Liver Dis* 2004; 24: 3-10.
30. Ganem D, Schneider R. Hepadnaviridae: the viruses and their replication. Knipe DM, Howley PM (eds). *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott-Raven, 2001: 2923-2970.
31. Summers J, Mason WS. Replication of the genome of a hepatitis like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell* 1982; 29: 403-415.
32. Moraleda G, Saputelli J, Aldrich CE, Averett D, Condreay L, Mason WS. Lack of effect of antiviral therapy in nondividing hepatocyte cultures on the closed circular DNA of woodchuck hepatitis virus. *J Virol* 1997; 71: 9392-9399.
33. Ni YH, Chang MH, Wang KJ, Hsu HY, Chen HL, Kao JH, et al. Clinical relevance of hepatitis B virus genotype in children with chronic hepatitis B and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004; 127: 1733-1738.
34. Lok AS. Hepatitis B infection: pathogenesis and management. *J Hepatol* 2000; 32: 89-97.
35. Carman WF, Jacyna MR, Hadziyannis S, Karayiannis P, McGarvey MJ, Makris A, et al. Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection. *Lancet* 1989; 2: 588-91.
36. Lok AS, Akarca U, Greene S. Mutations in the pre-core region of hepatitis B virus serve to enhance the stability of the secondary structure of the pre-genome encapsidation signal. *Proc Natl Acad Sci* 1994; 91: 4077-4081.
37. Akarca US, Lok AS. Naturally occurring hepatitis B virus core gene mutations. *Hepatology* 1995; 22: 50-60.

38. 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: 325-329.
39. Hsu HY, Chang MH, Ni YH, Lin HH, Wang SM, Chen DS. Surface gene mutants of hepatitis B virus in infants who develop acute or chronic infections despite immunoprophylaxis. *Hepatology* 1997; 26: 786-791.
40. Carman WF, Trautwein C, van Deursen FJ, Colman K, Donran E, McIntyre G, et al. Hepatitis B virus envelope variation after transplantation with and without hepatitis B immune globulin prophylaxis. *Hepatology* 1996; 24: 489-493.
41. Ghany MG, Ayola B, Villamil FG, Gish RG, Rojter S, Vierling JM, et al. Hepatitis B virus S mutants in liver transplant recipients who were reinfected despite hepatitis B immune globulin prophylaxis. *Hepatology* 1998; 27: 213-222.
42. Locarnini S. Primary resistance, multidrug resistance, and cross-resistance pathways in HBV as a consequence of treatment failure. *Hepatol Int* 2008; 2: 147-151.
43. Chisari FV. Cytotoxic T cells and viral hepatitis. *J Clin Invest* 1997; 99: 1472-77.
44. Chisari FV, Ferrari C. Hepatitis B immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol* 1995; 13: 29-60.
45. Bertoni R, Sidney J, Fowler P, Chesnut R, Chisari FV, Sette A. Human histocompatibility leucocyte antigen-binding supermotifs predict broadly cross-reactive cytotoxic T lymphocyte responses in patients with acute hepatitis. *J Clin Invest* 1997; 100: 503-513.
46. Hui CK, Lau G KK. Immune system and hepatitis B virus infection. *J Clin Virology* 2005; 34: 44-48.
47. Maini K, 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: 1269-1280.
48. Biron C. Initial and innate responses to viral infection pattern setting in immunity or disease. *Curr Opin Microbiol* 1999; 2: 374-381.

49. Baron JL, Gardiner L, Nishimura S, Shinkai K, Locksley R, Ganem D. Activation of nonclassical NKT cell subset in a transgenic mouse model of hepatitis B virus infection. *Immunity* 2002; 16: 583-594.
50. Guidotti LG, Chisari FV. Non-cytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 65-91.
51. Nakamura I, Nupp JT, Cowlen M, Hall WC, Tennant BC, Casey JL, et al. Pathogenesis of experimental neonatal woodchuck hepatitis virus infection: chronicity as an outcome of infection is associated with a diminished acute hepatitis that is temporarily deficient for the expression of interferon gamma and tumor necrosis factor alpha messenger RNAs. *Hepatology* 2001; 33: 439-347.
52. Webster G, Reignat S, Maini M, Whalley SA, Ogg GS, King A, et al. Incubation phase of acute hepatitis B in a man: dynamic of cellular immune mechanism. *Hepatology* 2000; 32: 1117-1124.
53. Chen DS. From hepatitis to hepatoma: lessons from type B viral hepatitis. *Science* 1993; 262: 369-370.
54. Sing GK, Ladhams A, Arnold S, Pamar H, Chen X, Cooper J, et al. A longitudinal analysis of cytotoxic T lymphocyte precursor frequencies to the hepatitis B virus in chronically infected patients. *J Viral Hepat* 2001; 8: 19-29.
55. Liu C J, Chen PJ, Lai MY, Kao JH, Chang CF, Wu HL, et al. A prospective study characterizing full-length hepatitis B virus genomes during acute exacerbation. *Gastroenterology* 2003; 124: 80-90.
56. Lok AS, Hussain M, Cursano C, Margotti M, Gramenzi A, Grazi GL, et al. Evolution of hepatitis B virus polymerase gene mutations in hepatitis B e antigen-negative patients receiving lamivudine therapy. *Hepatology* 2000; 32: 1145-1153.
57. De'ny P, Zoulim F. Hepatitis B virus: From diagnosis to treatment *Pathol Biol* 2010; 58: 245–253.
58. Kurbanov F, Tanaka Y, Kramvis A, Simmonds P, Mizokami M. When should ‘I’ consider a new hepatitis B virus genotype? *J Virol* 2008; 82: 8241–5242.

59. Tatematsu K, Tanaka Y, Kurbanov F, Sugauchi F, Mano S, Maeshiro T, et al. A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype. *J J Virol* 2009; 83: 10538–10547.
60. Taşyaran MA. Hepatit B virüs enfeksiyonunda klinik. Tabak F, Balık İ, Tekeli E (ed). *Viral Hepatit 2007*. 1. Baskı, İstanbul: Ohan Matbaası, 2007: 118-122.
61. European Association For The Study Of The Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2009; 50: 227–242.
62. Lok ASF, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. *Hepatology* 2007; 45: 507-539.
63. Chevaliez S, Pawlotsky JM. Diagnosis and management of chronic viral hepatitis: Antigens, antibodies and viral genomes. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2008; 22: 1031–1048.
64. Kann M, Gerlich WH. Structure and molecular virology. Thomas HC, Lemon S, Zuckerman AJ (ed). *Viral Hepatitis*. 3rd ed. Malden: Blackwell 2005; 149-180.
65. Weber B, Van der Taelen-Brule N, Berger A, Simon F, Geudin M, Ritter J. Evaluation of a new automated assay for hepatitis B surface antigen (HBsAg) detection VIDAS HBsAg Ultra. *J Virol Methods* 2006; 135: 109–117.
66. Weber B, Bayer A, Kirch P, Schlüter V, Schlieper D, Melchior W. Improved detection of hepatitis B virus surface antigen by a new rapid automated assay. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2639–2647.
67. Su CW, Huang YH, Huo TI, Shih HH, Sheen IJ, Chen SW, et al. Genotypes and viremia of hepatitis B and D viruses are associated with outcomes of chronic hepatitis D patients. *Gastroenterology* 2006; 130: 1625–1635.
68. Chan HL, Wong VW, Tse AM, Tse CH, Chim AM, Chan HY, et al. Serum hepatitis B surface antigen quantitation can reflect hepatitis B virus in the liver and predict treatment response. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007; 5: 1462–1468.
69. Özsan M. HBV enfeksiyonunda mikrobiyolojik tanı. Tabak F, Balık İ, Tekeli E (Ed). *Viral Hepatit 2007*. 1. Baskı, İstanbul: Ohan Matbaası, 2007: 124-134.

70. Brown SD, Barbara AJ, Lambert T, Wilson DV. Spontaneous loss of HBeAg and development of anti-HBe during long-term follow-up of blood donors found to be HBsAg-positive. *Br J Biomed Sci* 1995; 52: 106–109.
71. Lok AS, Heathcote EJ & Hoofnagle JH. Management of hepatitis B: 2000-summary of a workshop. *Gastroenterology* 2001; 120: 1828–1853.
72. Servoss JC, Friedman LS. Serologic and molecular diagnosis of hepatitis B virus. *Infect Dis Clin North Am* 2006; 20: 47-61.
73. Eyigün CP. HBV Viral Mutasyonların Önemi ve Tedaviye Etkileri. Tabak F, Balık İ, Tekeli E (ed). *Viral Hepatit 2007*. 1. Baskı, İstanbul: Ohan Matbaası, 2007: 136-147.
74. Buti M, Rodriguez-Frias F, Jardi R, Esteban R. Hepatitis B virus genome variability and disease progression: the impact of pre-core mutants and HBV genotypes. *Clin Virol* 2005; 34: 79-82.
75. Torresi J. The virological and clinical significance of mutations in the overlapping envelope and polymerase genes of hepatitis B virus. *J Clin Virol* 2002; 25: 97-106.
76. Locarnini SA, Shaw T. Antiviral Drug Resistance in Hepatitis B And C. *J Gastroenterology Hepatology* 2004; 19: 322–328.
77. Lewin S, Walters T, Locarnini S. Hepatitis B treatment: rational combination chemotherapy based on viral kinetic and animal model studies. *Antiviral Res* 2002; 55: 381-396.
78. Yuen MF, Yuan HJ, Wong DK, Yuen JC, Wong WM, Chan AO, et al. Prognostic determinants for chronic hepatitis B in Asians: therapeutic implications *Gut* 2005; 54: 1610-1614.
79. Aydın K. Kronik hepatit B’de güncel tedavi. *ANKEM Derg* 2006; 20: 203-207.
80. Janssen HLA, Zonnevald M, Senturk H, Zeuzem S, Akarca US, Cakaloglu Y, et al. Pegylated interferon alfa-2b alone or in combination with lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B: a randomised trial. *Lancet* 2005; 365: 123-129.

81. Chan HLY, Leung NWY, Hui AY, Wong VW, Liew CT, Chim AM, et al. A randomized, controlled trial of combination therapy for chronic hepatitis B: comparing pegylated interferon- $\alpha$ 2b and lamivudine with lamivudine alone. *Ann Intern Med* 2005; 142: 240-250.
82. Carosi G, Rizzetto M. Treatment of chronic hepatitis B: Recommendations from an Italian workshop. *Dig Liver Dis* 2008; 40: 603–617.
83. Xu XW, Chen YG. Current therapy with nucleoside/nucleotide analogs for patients with chronic hepatitis B. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2006; 5: 350-359.
84. Torresi J, Locarnini S. Antiviral chemotherapy for the treatment of hepatitis B virus infections. *Gastroenterology* 2000; 118: 83-103.
85. Leung NW, Lai CL, Chang TT, Guan R, Lee CM, Ng KY, et al. Extended lamivudine treatment in patients with chronic hepatitis B enhances hepatitis B e antigen seroconversion rates: results after 3 years of therapy. *Hepatology* 2001; 33: 1527-1532.
86. Chien RN, Liaw YF, Atkins M. Pretherapy alanine transaminase level as a determinant for hepatitis B e antigen seroconversion during lamivudine therapy in patients with chronic hepatitis B. Asian Hepatitis Lamivudine Trial Group. *Hepatology* 1999; 30: 770-774.
87. Fournier C, Zoulim F. Antiviral therapy of chronic hepatitis B: prevention of drug resistance. *Clin Liver Dis* 2007; 11: 869-892.
88. Liaw YF. The current management of HBV drug resistance. *J Clin Virol* 2005; 34: 143-146.
89. Suzuki F, Suzuki Y, Tsubota A, Akuta N, Someya T, Kobayashi M, et al. Mutations of polymerase, precore and core promoter gene in hepatitis B virus during 5-year lamivudine therapy. *J Hepatol* 2002; 37: 824-830.
90. Akuta N, Tsubota A, Suzuki F, Suzuki Y, Hosaka T, Someya T et al. Long-term prognosis by lamivudine monotherapy for severe acute exacerbation in chronic hepatitis B infection: emergence of YMDD motif mutant and risk of breakthrough hepatitis – an open-cohort study. *J Hepatol* 2003; 38: 91-97.

91. Değertekin H. Kronik Hepatit B Tedavisinde Kullanıma Yeni Giren Ve Girecek Olan Antiviraller. Tabak F, Balık İ (Ed). Viral Hepatit 2009. 1. Baskı, İstanbul: Express Matbaası,2009: 117-123.
92. Kurbanov F, Tanaka Y, Kramvis A, Simmonds P, Mizokami M. When should “I” consider a new hepatitis B virus genotype? J Virol 2008; 82: 8241–822.
93. Beşışık F. HBV’ ye bağlı kronik hepatit B tedavisinde antivirallere direnç-klinik yaklaşım. Tabak F, Balık İ (Ed). Viral Hepatit 2009. 1. Baskı, İstanbul: Express Matbaası, 2009: 45-51.
94. Niesters HG, Zoulim F, Pichoud C, Buti M, Shapiro F, D’Heuvaert N, Celis L, Doutreloigne J, Sablon E. Validation of the INNO-LiPA HBV DR assay (version 2) in monitoring hepatitis B virus-infected patients receiving nucleoside analog treatment Antimicrob Agents Chemother. 2010;54:1283-1289.
95. Locarnini S. Primary resistance, multidrug resistance, and cross-resistance pathways in HBV as a consequence of treatment failure. Hepatol Int 2008; 2: 147-151.
96. Kim HS, Han KH, Ahn SH, Kim EO, Chang HY, Moon MS, et al. Evaluation of Methods for Monitoring Drug Resistance in Chronic Hepatitis B Patients during Lamivudine Therapy Based on Mass Spectrometry and Reverse Hybridization. Antiviral Therapy 2005; 10: 441-449.
97. Lok AS, Zoulim F, Locarnini S, Bartholomeusz A, Ghany MG, Pawlotsky JM, et al. Antiviral drug-resistant HBV: standardization of nomenclature and assays and recommendations for management. Hepatology 2007; 46: 254-265.
98. Lok AS, Zoulim F, Locarnini S, Mangia A, Niro G, Decraemer H, et al. Monitoring drug resistance in chronic hepatitis B virus (HBV)-infected patients during lamivudine therapy: evaluation of performance of INNO-LiPA HBV DR assay. J Clin Microbiol 2002; 40: 3729-3734.
99. Maddrey WC. Hepatitis B an important public health issue. Clin Lab 2001; 47: 51-55.
100. Ljunggren KK, Nordenfelt E, Kidd A. Correlation of HBeAg/anti-HBe, ALT levels and HBVDNA PCR results in HBsAg-positive patients. J Med Virol 1993; 39 : 297-302.

101. Rabbi FJ, Rezwan MK, Shirin T. HBeAg/anti-HBe, alanine aminotransferase and HBVDNA levels in HBsAg positive chronic carriers. *Bangladesh Med Res Counc Bull* 2008; 34 : 39-43.
102. Cheng NY, Chang JG, Liao ST, Liu JD, Lee LS, Chen PH, et al. Infectivity in asymptomatic hepatitis B carriers: its correlation with HBeAg/anti-HBe status. *Taiwan Yi Xue Hui Za Zhi*. 1989 ; 88 :148-151.
103. Malmström S, Hannoun C, Lindh M. Mutation analysis of lamivudine resistant hepatitis B virus strains by TaqMan PCR. *J Virol Methods* 2007; 143: 147-152.
104. Hong SP, Kim NK, Hwang SG, Chung HJ, Kim S, Han JH, et al. Detection of hepatitis B virus YMDD variants using mass spectrometric analysis of oligonucleotide fragments. *J Hepatol* 2004; 40: 837-844.
105. Locardini S. Molecular virology and the development of resistant mutants: implications for therapy. *Semin Liver Dis* 2005; 25: 9-19.
106. Allen MI, Gauthier J, DesLauriers M, Bourne EJ, Carrick KM, Baldanti F, et al. Two sensitive PCR-based methods for detection of hepatitis B virus variants associated with reduced susceptibility to lamivudine. *J Clin Microbiol*. 1999; 37: 3338-3347.
107. Tran N, Berne R, Chann R, Gauthier M, Martin D, Armand MA, et al. European multicenter evaluation of high-density DNA probe arrays for detection of hepatitis B virus resistance mutations and identification of genotypes. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 2792-2800.
108. Yim HJ, Hussain M, Liu Y, Wong SN, Fung SK, Lok AS. Evolution of multi-drug resistant hepatitis B virus during sequential therapy. *Hepatology* 2006; 44: 703-712.
109. Ye XG, Wang RL, Guo HB. Detection and analysis of YMDD mutated genes in patients of chronic hepatitis B before being treated. *Zhonghua Jianyan Yixue Zazhi* 2002; 25: 248.
110. Kirishima T, Okanou T, Daimon Y, Itoh Y, Nakamura H, Morita A, et al. Detection of YMDD mutant using a novel sensitive method in chronic liver disease type B patients before and during lamivudine treatment. *J Hepatol* 2002; 37: 259-265.

111. Kobayashi S, Ide T, Sata M. Detection of YMDD motif mutations in some lamivudine-untreated asymptomatic hepatitis B virus carriers. *J Hepatol* 2001; 34: 584-586.
112. Yan MH, Zhang C, Ling Q, Zhou RF. Detection of YMDD motif mutations in lamivudine-untreated patients with chronic hepatitis B. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2003; 11: 430-431.
113. Shin YM, Heo J, Kim GH, Kang DH, Song GA, Cho M, et al. Natural YMDD motif mutations of HBV polymerase in the chronic hepatitis B virus infected patients. *Taehan Kan Hakhoe Chi* 2003; 9: 1-9.
114. Leon P, Pozo F, Echevarria JM. Detection of hepatitis B virus variants resistant to lamivudine and famciclovir among randomly selected chronic carriers from Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004; 22: 133-137.
115. Zhang XH, Zhang YX, Sun LR, Wen Q, Zhou LQ, Fan GX, et al. Study of gene chips in the detection of YMDD mutations in the region of HBV polymerase. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2003; 83: 459-462.
116. Matsuda M, Suzuki F, Suzuki Y, Tsubota A, Akuta N, Hosaka T, et al. YMDD mutants in patients with chronic hepatitis B before treatment are not selected by lamivudine. *J Med Virol* 2004; 74: 361-366.
117. Heo J, Cho M, Kim HH, Shin YM, Jang HJ, Park HK, Kim CM, Kim GH, Kang DH, Song GA, Yang US. Detection of YMDD motif mutants by oligonucleotide chips in lamivudine-untreated patients with chronic hepatitis B virus infection. *J Korean Med Sci* 2004; 19: 541-546.
118. Huang ZM, Huang QW, Qin YQ, He YZ, Qin HJ, Zhou YN, et al. YMDD mutations in patients with chronic hepatitis B untreated with antiviral medicines. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 867-870.
119. Lee CZ, Lee HS, Huang GT, Yang PM, Sheu JC. Detection of YMDD mutation using mutant-specific primers in chronic hepatitis B patients before and after lamivudine treatment. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 5301-5305.

120. Akarsu M, Sengonul A, Tankurt E, Sayiner AA, Topalak O, Akpınar H, et al. YMDD motif variants in inactive hepatitis B carriers detected by Inno-Lipa HBV DR assay. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 1783-1788.
121. Tunçbilek S, Köse Ş, Elaldı A, Akman S. Türkiye'deki tedavi görmemiş kronik hepatit B'li hastalarda lamivudin direnci. *Türk Gastroenteroloji Dergisi* 2008; 19: 99-103.
122. Sayan M, Akhan SC, Meric M. Naturally occurring amino-acid substitutions to nucleos(t)ide analogues in treatment naive Turkish patients with chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 2010; 17: 23-27.
123. Yıldız O, Aygen B, Demirtürk N, Demirdal T, İnan D, Yıldırım T, et al. Lamivudine resistance mutations in patients infected with hepatitis B virus genotype D. *World J Gastroenterol* 2011; 17: 4987-4992.
124. Thibault V, Aubron-Olivier C, Agut H, Katlama C. Primary infection with a lamivudine-resistant hepatitis B virus. *AIDS* 2002; 16: 131-133.
125. Zhang X, Liu C, Gong Q, Zhang S, Zhang D, Lu Z, et al. Evolution of wild type and mutants of the YMDD motif of hepatitis B virus polymerase during lamivudine therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 1353-1357.
126. Jardi R, Rodriguez Frias F, Schaper M, Ruiz G, Elefsiniotis I, Esteban R, et al. Hepatitis B virus polymerase variants associated with entecavir drug resistance in treatment naïve patients. *J Viral Hepat* 2007; 14: 835-840.

## 6. ÖZGEÇMİŞ

18 Haziran 1982 yılında Elazığ'da doğdum. İlkokul, ortaokul ve lise eğitimimi Elazığ'da tamamladıktan sonra 2000 yılında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi 'nde tıp eğitimime başladım. 2006 yılında Tıp fakültesinden mezun oldum. 2006 Eylül ayında Tıpta uzmanlık sınavını kazanarak 22 Kasım 2006' da Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji asistanlığına başladım. Halen bu görevimi devam ettirmekteyim. Evli, bir çocuk annesiyim.