

## HEPATİT B VİRUSUNUN RESTRİKSİYON ENZİM ANALİZİ İLE TIPLENDİRİLMESİ\*

GENOTYPING OF HEPATITIS B VIRUS BY RESTRICTION ENZYME ANALYSIS

*Aziz AKSOY\*\**, *Aykut ÖZDARENELİ\*\**

**ÖZET:** Hepatit B virusu (HBV), dünyada en yaygın görülen enfeksiyonlardan birisi olup, ortalama 350 milyon kronik hepatit B virus taşıyıcısı olduğu tahmin edilmektedir. Hepatit B virusunun tüm genom nükleotid dizisi temel alındığında, %8'lik veya daha fazla nükleotid farklılıklarına göre HBV'nin 8 genotipi (A-H) tanımlanmıştır. Farklı HBV genotipleri hastalığın klinik durumunu etkileyebilmektedir. HBV'un S gen dizisi kullanılarak yapılan genotiplendirme ile tam genom belirlenerek yapılan tiplendirme sonuçları arasında uyum vardır. Bu çalışmada, HBV-DNA pozitif 127 hastada (74 erkek, 53 kadın), RFLP (restriction fragment length polymorphism) yöntemi ile virusun genotiplendirilmesi amaçlanmış, "semi-nested" polimeraz zincir reaksiyonu (SN-PCR) ile çoğaltılan özgül S gen bölgesi RFLP ile analiz edilmiştir. SN-PCR yönteminin birinci aşamasında anlamlı primer HBMF1 ve karşıt anlamlı primer HBMR2 kullanılarak 685 baz çiftlik bölgenin, ikinci aşamasında ise iç anlamlı primer HBMF2 ve karşıt anlamlı primer HBMR2 kullanılarak 485 baz çiftlik bölgenin çoğaltılması sağlanmıştır. RFLP yönteminde, HBV S geninin genotipe özgül bölgelerinde bulunan *AlwI*, *EcoRI*, *HpaI*, *NciI* ve *NlaIV* enzim kesim bölgeleri kullanılmış ve sonuçta 127 örneğin tamamı genotip D olarak tiplendirilmiştir. Bu veriler, bölgemizdeki hepatit B hastalarında dominant olarak genotip D'nin bulunduğunu ve HBV genotiplendirmede RFLP yönteminin kolay uygulanabilir bir yöntem olduğunu göstermiştir.

*Anahtar sözcükler: Hepatit B virusu, PCR, RFLP, HBV genotiplendirme.*

**ABSTRACT:** Hepatitis B is one of the most common infectious diseases in the world, and 350 million people have been estimated to be chronic hepatitis B virus carriers world-wide. Hepatitis B virus (HBV) has been classified into 8 genotypes (A-H) based on an intergroup divergence of 8% or more in the complete nucleotide sequence. Different genotypes of the hepatitis B virus may influence the clinical outcome of the disease. HBV genotyping method using restriction fragment length polymorphism (RFLP) can reliably identify genotypes. HBV genotyping with S gene sequence is consistent with genetic analysis using the full genomic sequences. The aim of this study was to determine the genotypes

\*Bu çalışma Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından 984 no'lu projeye desteklenmiştir.

\*\*Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Elazığ.

of HBV by using restriction fragment length polymorphism (RFLP) method in the region of Elazığ. A total of 127 HBV-DNA positive patients (74 male, 53 female) were included in the study. Semi-nested polymerase chain reaction (PCR) was performed to amplify the specific parts of HBV S gene. In the first step, 685 base paired (bp) region was amplified by sense primer HBMF1 and anti-sense primer HBMR2, while in the second step 485 bp region was amplified by using inner-sense primer HBMF2 and anti-sense primer HBMR2. PCR products were then digested by the restriction enzymes, *AlwI*, *EaeI*, *HphI*, *NciI* and *NlaIV*. The RFLP assay indicated that genotype D was the only detected type in our samples. In conclusion, genotype D is the predominant type among hepatitis B patients in our region. RFLP is considered to be an easy and useful method for genotyping HBV strains.

*Key words: Hepatitis B virus, PCR, RFLP, HBV genotyping.*

## GİRİŞ

Hepatit B virusu (HBV), sirküler, kısmen çift iplikli ve yaklaşık 3200 nükleotid uzunluğunda bir DNA genomu içermektedir. HBV suşlarının tam genomlarının moleküler analizleri yapıldığında, suşlar arasında farklılıklar saptanmış ve gen diziliminde %8 ya da daha çok farklılığı olanlar ayrı bir genotip olarak sınıflandırılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda HBV için altı ayrı genotip belirlenmiştir<sup>1</sup>. Ancak son zamanlarda yapılan çalışmalarda genotip G ve H olarak adlandırılan iki yeni genotip bulunmuş ve HBV genotip sayısı sekize (A,B,C,D,E,F,G ve H) yükselmiştir<sup>2,3</sup>.

HBV, ülkemizde endemik olarak bulunan bir virustur ve HBV enfeksiyonlarının ülkemiz açısından önemi göz önüne alındığında, virusun genotip dağılımına ilişkin araştırmalara gerek olduğu görülmektedir<sup>4</sup>. Zira Türkiye’de HBV genotipleri ile ilişkili veriler son derece sınırlıdır. Bu veriler gelecekte toplum sağlığının korunabilmesi, enfeksiyonun klinik gidişi hakkında önceden fikir sahibi olunabilmesi ve tedavinin yönlendirilmesi için yararlı olacaktır<sup>4,5</sup>. Bu çalışmada, bölgemizdeki HBV genotip dağılımının belirlenmesi amacıyla, epidemiyolojik çalışmalara uygun, hızlı ve kolay uygulanan bir yöntem olan RFLP ile HBV’lerinin genotiplendirilmesi planlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

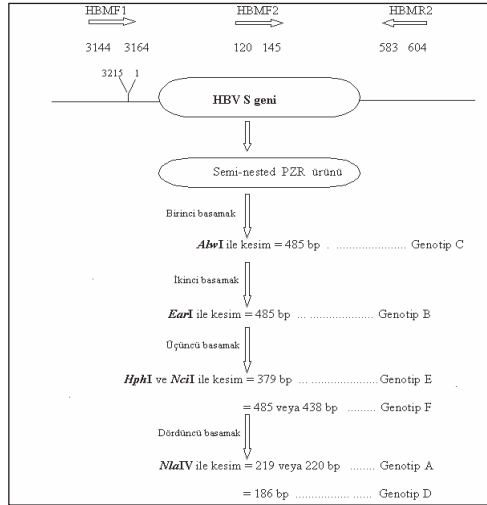
Çalışmaya, Fırat Üniversitesi Tıp Merkezine 2004 yılının ilk yarısında HBV enfeksiyonu şüphesi ile başvuran ve Fırat Üniversitesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Viroloji Laboratuvarı’nda, HBV DNA yönünden araştırılması yapılan hastalar arasında serum HBV DNA’sı pozitif 127 hasta (74 erkek ve 53 kadın) dahil edildi. Hasta serumları analiz yapılincaya kadar -20°C’de saklandı. HBV-DNA ekstraksiyonu yapılacağı zaman serumlar çözüldü ve Proteinaz K (Promega, ABD) / fenol-kloroform-izoamil alkol (Sigma, ABD) yöntemi ile ekstraksiyon işlemi yapıldı<sup>6</sup>. HBV S gen bölgesinde 685 ve 485 baz çifti (bç) uzunluklarının amplifikasyonu, “semi-nested” polimeraz zincir reaksiyonu (SN-PCR) ile aşağıda nükleotid pozisyonları belirtilen anlamlı, iç anlamlı ve karşıt anlamlı primerler (Integrated DNA Technologies; IDT, Iowa, USA) kullanılarak yapıldı<sup>7</sup>.

Primer	Tip	Baz Dizisi	Nükleotid Pozisyonu
HBMF1	Anlamlı	5'-YCCTGCTGGTGGCTCCAGTTC-3'	nt. 55-75
HBMF2	İç anlamlı	5'-GTCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTC-3'	nt. 246-271
HBMR2	Karşıt anlamlı	5'-AAGCCANACARTGGGGGAAAGC-3'	nt. 730-709

Birinci aşamada HBMF1 ve HBMR2 primerleri ile 685 bç'lik bölgenin; ikinci aşamada ise HBMF2 ve HBMR2 primerleri ile 485 bç'lik bölgenin çoğaltılması sağlandı.

Amplifikasyon karışımı 50  $\mu$ l'lik reaksiyon hacminde [birinci aşamada; 5  $\mu$ l 10X PCR tamponu (MBI Fermentas), 5  $\mu$ l 25 mM MgCl<sub>2</sub> (MBI Fermentas), 1  $\mu$ l 10 mM dNTP (Promega) karışımı, 0.25  $\mu$ l HBMF1 (100 nmol), 0.25  $\mu$ l HBMR2 (100 nmol), 0.5  $\mu$ l Taq polimeraz (5U/ $\mu$ l) (MBI Fermentas), 28  $\mu$ l bidistile su, 10  $\mu$ l HBV-DNA kalıbı] hazırlandı. İkinci aşamada ise farklı olarak, iç anlamlı primer HBMF2 ve karşıt anlamlı primer HBMR2 kullanılırken anlamlı primer HBMF1 kullanılmadı. Kalıp DNA olarak da, 2  $\mu$ l hacimde alınan birinci PCR ürünü ile 36  $\mu$ l bidistile su kullanıldı. PCR karışımları termal döngü cihazında (Hybaid, Sprint) 94°C'de 4 dakika başlangıç denatürasyonu takiben, 94°C'de 1 dakika denatürasyon, 6 °C'de 1 dakika primer bağlanması, 72°C'de 1 dakika uzama olmak üzere 40 döngü ve 72°C'de 5 dakika son polimerizasyondan oluşan sıcaklık döngüleri ile çoğaltıldı.

Termal döngü cihazından alınan PCR ürünlerinin analizi jel elektroforezi ile yapıldı<sup>6</sup>. Genotiplendirme çalışması, daha önce Mizokami ve arkadaşları<sup>7</sup> tarafından yapılan ve "GenBank"tan alınan 68 HBV tüm genom dizileriyle karşılaştırılarak ortaya çıkarılan RFLP yöntemiyle, HBV genotiplerini belirleme stratejisine göre uyarlanarak gerçekleştirildi (Şekil 1) (Tablo I).



**Şekil 1:** RFLP yöntemiyle HBV genotiplerini belirleme stratejisi.

(SN-PCR ürünlerinin, birinci basamakta AlwI ve EarI enzim kesim deneyi sonucu 485 bç'lik bölgede genotip C ve B sınıflandırılmaktadır. HphI ve NciI enzim kesimleriyle oluşan bölgeler de genotip E ve F olarak sınıflandırılmaktadır. Son basamakta ise NlaIV enzim kesim deneyi sonucunda oluşan kesim bölgelerine göre genotip A ve D sınıflandırılmaktadır).

Tablo I: RFLP Stratejisine Göre Her Bir Genotip İçin Hesaplanan Sayısal Verilerin Gösterilmesi\*

Enzimler	Genotipler					
	A	B	C	D	E	F
AlwI	251 bp+234 bp	251 bp+234 bp	485 bp	251 bp+234 bp	251 bp+234 bp	251 bp+234 bp
EarI	320 bp+165 bp	485 bp	320 bp+165 bp	320 bp+165 bp	320 bp+165 bp	320 bp+165 bp
HphI + NciI					485 bp	485 bp
NlaIV				186 bp+265 bp +34 bp		

\* Veriler; beş enzim kesimi analizleri sonucu çıkarılmış olup, Şekil 2-5 üzerinde açıklanmıştır.

SN-PCR amplifikasyonu ile elde edilen 485 baz çifti uzunluğundaki gen bölgesinde 5'-GGATC-3' dizisini tanıyan *AlwI* (NEB R0513L), 5'-CTCTTC-3' dizisini tanıyan *EarI* (MBI Fermentas), 5'-GGTG A-3' dizisini tanıyan *HphI* (NEB R0158L), 5'-CC ^ SGG-3' dizisini tanıyan *NciI* (MBI Fermentas) ve 5'-GGN ^ NCC-3' dizisini tanıyan *NlaIV* (MBI Fermentas) enzimi kullanılarak yapıldı. PCR ürünlerinin elektroforeze yüklenmesi için %3'lük agaroz jel hazırlandı. Bunun için 3 gr agaroz (Onbio Inc) hassas terazide tartıldı. Üzerine 100 ml 1X TAE (Sigma, ABD) solüsyonu eklendi. Kaynayıcaya kadar ısıtıcıda bekletildi daha sonra 50°C'ye soğutulmuş, üzerine 10 µl etidyum bromür (Sigma, ABD) eklendi. Hazırlanan karışım elektroforez tepsisine döküldü. Jel donduktan sonra yatay olarak elektroforez tankına yerleştirildi. Amplifikasyon ürününden 10 µl alınarak, 3 µl bromfenol mavisi (Sigma, ABD) ile karıştırılıp jeldeki kuyucuklara yüklendi. Moleküler ağırlık belirteci (100 bp Marker, Promega) eşliğinde 30-40 dakika 90 V sabit elektrik akımında yürütüldü<sup>6</sup>. Daha sonra ultraviyole (UV) transülminator altında, moleküler ağırlık belirteci (M) ile karşılaştırılarak bant büyüklükleri değerlendirildi.

*Restriksiyon Enzimi Kesim Deneyleri:* *AlwI* enzim kesimi; 5 µl PCR ürünü, 1 µl *AlwI* enzimi, 5 µl buffer-4 ve 14 µl dH<sub>2</sub>O varlığında 25 µl hacim içinde 3 ile 6 saat 37°C'de kesime bırakıldı. *EarI* enzim kesimi; 5µl PCR ürünü, 2 µl *EarI* enzimi, 5 µl buffer-1 ve 13 µl dH<sub>2</sub>O varlığında 25µl hacim içinde 3 ile 6 saat 37°C'de kesime bırakıldı. *HphI* ve *NciI* enzimleri ile kesim; 5 µl PCR ürünü, 2 µl *HphI* enzimi ve 5 µl buffer-4, 2 µl *NciI* ve 5µl buffer-4, 6 µl dH<sub>2</sub>O varlığında 25 µl hacim içinde 3 ile 6 saat 37°C'de kesime bırakıldı. *NlaIV* enzim kesimi; 5 µl PCR ürünü, 1 µl *NlaIV* enzimi, 5 µl buffer-4+BSA ve 14 µl dH<sub>2</sub>O varlığında 25 µl hacim içinde 3 ile 6 saat 37°C'de kesime bırakıldı. Kesim ürünleri 20 µl alındı ve 3 µl bromfenol mavisi ile karıştırılarak %3'lük agaroz içeren jele yüklendi. Ürünler 1X TAE içinde ve 90V sabit voltajda yaklaşık 30-40 dakika elektroforeze tabi tutuldu.

## B U L G U L A R

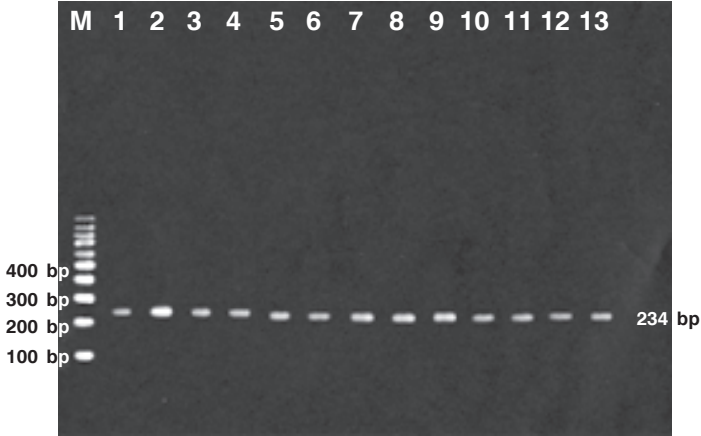
Çalışmaya alınan HBV-DNA pozitif 127 örneğin hepsi HBsAg pozitif olup, hastaların HBV-DNA düzeylerinin ortalama 7.000 pg/ml (1.300-18.142 pg/ml) olduğu belirlenmiştir (64 hastada ≥11.000 pg/ml, 48 hastada ≥3.000 pg/ml, 15 hastada ≥1300 pg/ml).

HBV genotiplerinin belirlenmesinde, SN-PCR ile çoğaltılan 485 bç'lik S gen bölgesi ürünleri beş farklı enzimle (*AlwI*, *EarI*, *HphI*, *NciI* ve *NlaIV*) kesime tabi tutulmuştur. *AlwI* enzimi, bu bölgeyi 251. pozisyonda kesmiş ve 234 bç uzunluğunda fragment oluşturmuştur. Genotip C dışındaki bütün genotiplerde bulunan bu enzim bölgesi kullanılarak, örneklerimizin C genotipinde olmadığı

izlenmiştir (Şekil 2). Earl enzimi ile ise bu bölge 165. pozisyonda kesilmiş ve 320 bç uzunluğunda fragmentin varlığı gözlenmiştir. HBV S geni sadece genotip B için Earl enzim kesim bölgesini içermediğinden örneklerimizin B genotipinde de olmadığı belirlenmiştir (Şekil 3).

Genotip E ve F tayini için, HphI ve NciI enzimleriyle kesim yapılmış, 485 bç'lik gen bölgesinin kesilmediği gözlenmiştir (Şekil 4). Genotip E tanımı, 461. pozisyonda NciI enzimiyle kesim sonucu, genotip F tanımı ise 82. pozisyonda HphI enzimiyle kesim sonucu yapılmaktadır. Dolayısıyla örneklerimizin bu genotiplerde de olmadığı görülmüştür.

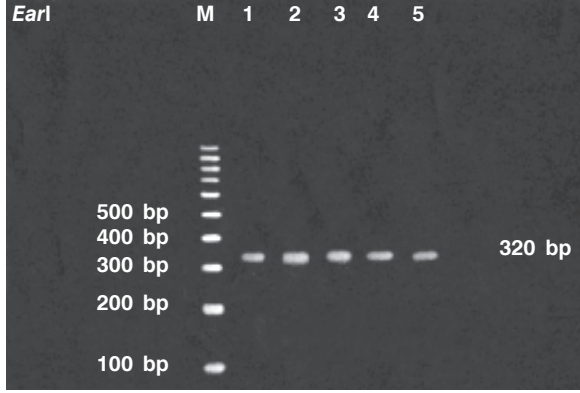
Genotip A ve D'yi belirlemek için NlaIV enzimi ile kesim yapıldığında, 485 bp'lik gen bölgesinde 299. pozisyonda genotip A için NlaIV enzim kesim bölgesinin bulunmadığı, bununla beraber genotip D'nin NlaIV enzimiyle kesiminin 265 ve 299. pozisyonlarda gerçekleştiği belirlenmiştir. NlaIV enzimiyle kesim sonucu, 186 ve 265 bç uzunluğunda fragmentlerin oluştuğu görülmüş ve böylece bütün örneklerimiz genotip D olarak tiplendirilmiştir (Şekil 5).



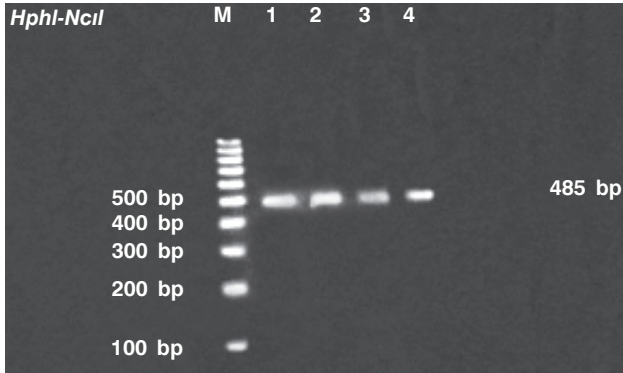
**Şekil 2:** *AclI* enzimi ile kesim sonrası PCR ürünlerinin görünümü (M; 100 bç'lik DNA belirteci, Sıra 1-13 *AclI* enzim kesim ürünleri).

## TARTIŞMA

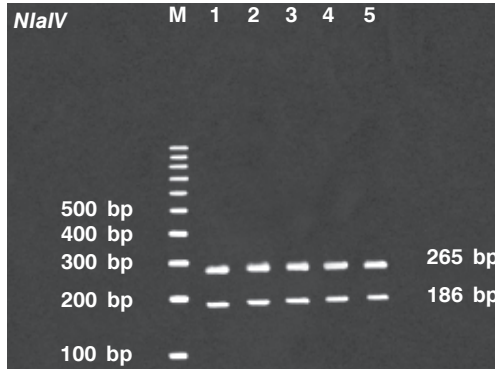
Bütün dünyada yaygın olarak görülen HBV'na bağlı akut hepatitlerin %5'inin kronikleştiği, bunların önemli bir bölümünün siroza dönüştüğü, sirozlu olgularda da hepatoselüler karsinoma (HCC) gelişme riskinin yüksek olduğu bilinmektedir<sup>8,9</sup>. Bu nedenle HBV ile mücadelede başarılı olabilmek için HBV epidemiyolojisinin ve moleküler yapısının çok iyi bilinmesi gerekmektedir.



**Şekil 3:** *EarI* enzimi ile kesim sonrası PCR ürünlerinin görünümü (M; 100 bç'lik DNA belirteci, Sıra 1- 5 *EarI* enzim kesim ürünleri).



**Şekil 4:** *HphI* ve *NciI* enzimi ile kesim sonrası PCR ürünlerinin görünümü (M; 100 bç'lik DNA belirteci, Sıra 1- 4 *HphI* ve *NciI* enzim kesim ürünleri).



**Şekil 5:** *NlaIV* enzimi ile kesim sonrası PCR ürünlerinin görünümü (M; 100 bç'lik DNA belirteci, Sıra 1- 5 *NlaIV* enzim kesim ürünleri).

Son yıllarda rekombinant DNA teknolojisinin gelişmesine paralel olarak HBV'nun genotiplendirilmesi konusunda yoğun araştırmalar yapılmıştır<sup>7,10,11</sup>. Okamoto ve arkadaşları<sup>12</sup> HBV'nun tüm genom dizisini belirleyerek, genomlar arasında en az %8'lik bir fark bulmuşlar ve bu farklılığa göre HBV'nu (A-D) dört genotip olarak sınıflandırmışlardır. Norder ve arkadaşları<sup>13,14</sup>, S geni dizileri arasındaki farklılıkları ortaya koyarak E ve F olmak üzere iki yeni genotip daha tanımlamışlar ve böylece HBV'nun altı genotipi olduğu belirlenmiştir. Stuyver ve arkadaşları<sup>15</sup>, 2000 yılında yaptıkları bir çalışmada, 3248 baz uzunluğunda ve filogenetik olarak bilinen, hiçbir genotipe uymayan HBV genomları belirlemişler ve bunları bir grupta toplayarak genotip G olarak adlandırmışlardır. Arauz-Ruiz ve arkadaşları<sup>2</sup>, 2002 yılında yeni bir tip olan H genotipini tanımlamışlardır. Böylece günümüzde HBV'nin (A-H) sekiz genotipi tanımlanmış durumdadır<sup>2,3,16,17</sup>.

Çalışmamızda, ülkemizdeki HBV genotip dağılımı verilerine katkıda bulunmak amacıyla bölgemizdeki HBV suşlarının genotiplendirilmesi planlanmıştır; HBsAg ve HBV-DNA pozitif 127 hasta örneğinden SN-PCR ile amplifiye edilen HBV S gen bölgesi ürünleri RFLP yöntemi ile analiz edilmiş ve sonuçta tüm suşların genotip D olduğu saptanmıştır. Çalışmada altı genotip için kesim enzimleri kullanılmış; genotip G ve H'nin tiplendirilmesinde farklı tekniklerin kullanılması gerekliliği ve bu genotipler için RFLP yönteminin yeterli olmaması nedeniyle bu iki genotipin araştırılması mümkün olmamıştır.

HBV genotiplerinin dağılımı coğrafi bölgelere göre farklılıklar göstermektedir<sup>3,18</sup>. Ülkemiz, orta endemisite bölgesinde yer alan Güney ve Doğu Avrupa, Güney ve Orta Amerika, Orta Asya ve Ortadoğu ülkeleri arasına dahildir. Bu bölgelerde, toplumdaki HBsAg pozitifliği %2-10, anti-HBs pozitifliği ise %20-60 arasında değişmektedir<sup>5,19</sup>.

Yapılan çalışmalar, HBV prevalansının düşük olduğu Kuzeybatı Avrupa, Güney Afrika ve ABD'ndeki persistan taşıyıcılar arasında genotip A'nın baskın olduğunu, bulaşın daha ziyade vertikal yol ile olduğu Doğu Asya ülkelerinde (Japonya, Tayvan, Endonezya, Çin, Kore, Avusturalya) ise genotip B ve C'nin yüksek prevalans gösterdiğini vurgulamaktadır<sup>2,3</sup>. Buna karşın Akdeniz Bölgesi, Rusya ve Hindistan'da genotip D yaygındır, Batı Afrika'da ise genotip E görülmektedir<sup>1</sup>. Şu ana kadar HBV suşlarıyla ilgili sınırlı genetik bilginin elde edilebildiği Amazon bölgesi ve Peru gibi yüksek HBV prevalansına sahip ülkelerde ise genotip F'nin sık olduğu tespit edilmiştir<sup>9,20</sup>. Bu durum kısmen, vertikal geçişten sorumlu olan HBeAg pozitif dönemin daha uzun oluşu ile açıklanır. Vertikal geçişle enfekte olan çocuklarda kronikleşme oranı yaklaşık %80'dir. Bu nedenle hepatit B'nin endemik olduğu bölgelerde, yüksek taşıyıcılık oranının devamında en önemli mekanizmanın vertikal geçiş olduğu kabul edilmektedir. Bunun aksine genotip A ve D'nin dominant olduğu Akdeniz ve Sahra altı Afrika ülkelerinde horizontal geçiş daha önemlidir. Orta Amerika, Almanya ve Fransa'da genotip G, Güney Amerika, Meksika ve İspanya'da ise en son tanımlanan genotip H bulunmuştur<sup>2,3,10,18,20</sup>.

HBV genotiplerinin, virus-konak ilişkisinde rolü olduğunu gösteren çalışmalar vardır. Tayvan'da yapılan bir çalışmada, HCC'lı genç hastaların özellikle genotip B ile enfekte olduğu, yaşlı hasta grubunda ise daha çok genotip C'nin etken



olduğu belirlenmiştir<sup>16</sup>. Buna karşın Japonya'da yapılan çalışmalarda, hem genç hem de yaşlı HCC'lı hastalarda genotip C saptanmıştır<sup>17</sup>. Genotip C'nin daha ciddi ve uzun süreli karaciğer bozukluklarıyla ilişkili olduğu bilinmektedir<sup>18,21,22</sup>.

Ülkemizde Leblebicioğlu ve arkadaşlarının<sup>23</sup> "nested" PCR ve RFLP yöntemiyle 158 HBV hastasında yaptıkları çalışmada, 11 olguda PCR negatifliği nedeniyle genotiplendirme yapılamamış, 147 olgunun tamamı ise genotip D olarak bulunmuştur. Külah ve arkadaşları<sup>22</sup> HBV enfeksiyonu olan 84 hastada S gen bölgesinin nükleotid dizi analizi ile yaptıkları çalışmada, tüm örneklerin genotip D içinde yer aldığını belirlemişlerdir. Mısırlıoğlu ve arkadaşlarının<sup>25</sup> İskenderun'da ilkökul öğrencilerinde yaptıkları çalışmada, S geni DNA dizi analizi yapılan 57 öğrencinin tamamında genotip D saptamışlardır. Bozdayı ve arkadaşları<sup>26</sup> 67 hasta üzerinde pre-S gen bölgesi dizileriyle yaptıkları genotiplendirme çalışmasında tüm hastalarda genotip D'yi bulmuşlardır. Şentürker ve arkadaşlarının<sup>27</sup> çalışmasında, HBV-DNA pozitif 23 kronik hepatitli hastanın tümünde nükleotid dizi analizi ve RFLP yöntemiyle genotip D belirlenmiştir. Elazığ ve yöresinde yaptığımız bu çalışmada, HBV DNA'sı pozitif toplam 127 örnek kullanılmış ve tamamı genotip D olarak tespit edilmiştir. Elde ettiğimiz bu sonuçlar ülkemizin diğer bölgelerinde yapılan çalışmalarla uyum göstermekte ve Türkiye'de dolaşımda olan HBV genotipinin genotip D olduğu sonucunu desteklemektedir. Bu veriler dikkate alınarak, yapılması planlanan genotiplendirme çalışmalarında, önce sadece *NlaIV* enzimi ile kesim yapılması, daha sonra genotip D olmayan örnekler için diğer enzimlerin kullanılması, zaman ve maliyetten tasarruf edilmesi açısından önemlidir.

HBV genotipleri ile bulaş yolları arasında ilişki olduğunu gösteren yayınlar bulunmaktadır<sup>4,28</sup>. Genotip D'nin görüldüğü, ülkemizin de içinde bulunduğu Akdeniz bölgesinde erken horizontal bulaş, enfeksiyonun yayılmasında en önemli geçiş yoludur. Elde ettiğimiz sonuçlar bu yönüyle HBV'nun ülkemizdeki başlıca geçiş yoluna da ışık tutacaktır.

Sonuç olarak HBV enfeksiyonlarında virus genotipinin belirlenmesi; farklı genotipler arasında hastalık şiddetinin farklı olup olmadığı, tedaviye yanıtın oranı ve virus-konak ilişkisinin anlaşılması yönünden önemli veriler sağlayacaktır. Bu amaçla, zaman alıcı ve pahalı bir yöntem olan DNA dizi analizi yerine, kısa zamanda sonuç vermesi ve uygulama kolaylığı açısından RFLP tekniğinin rutin olarak HBV genotiplendirilmesinde kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

#### KAYNAKLAR

1. Lindh M, Gonzalez JE, Norkrans G, Horal P. Genotyping of hepatitis B virus by restriction pattern analysis of a pre-S amplicon. *J Virol Methods* 1998; 72: 163-74.
2. Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH, Magnus LO. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol* 2002; 83: 2059-73.
3. Kato H, Gish RG, Bzowej N, et al. Eight genotypes (A-H) of hepatitis B virus infecting patients from San Francisco and their demographic, clinical, and virological characteristics. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1207-9.
4. Kıyan M. Hepatit B virusu, s: 86-120. Kılıçturgay K, Badur S (ed), *Viral Hepatit*. 2001. *Viral Hepatit Savaşım Derneği Yayını*, İstanbul.



5. Balık İ. Hepatit B epidemiyolojisi, s: 91-101. Kılıçturgay K (ed), Viral Hepatit. 1994. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
6. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2001. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.
7. Mizokami M, Nakano T, Orito E, et al. Hepatitis B virus genotype assignment using restriction fragment length polymorphism patterns. *FEBS Letters* 1999; 450: 66-71.
8. Kidd-Ljunggren K, Miyakawa Y, Kidd AH. Genetic variability in hepatitis B viruses. *J Gen Virol* 2002; 4: 1-18.
9. Mbayed VA, Lo JL, Telentra PFS, et al. Distribution of hepatitis B virus genotypes in two different pediatric populations from Argentina. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 3362-5.
10. Kato H, Ruzibakiev R, Yuldasheva N, et al. Hepatitis B virus genotypes in Uzbekistan and validity of two different systems for genotyping. *J Med Virol* 2002; 67: 477-83.
11. Kristensen VN, Kelefiotis D, Kristensen T, Borresen-Dale AL. High-throughput methods for detection of genetic variation. *Biotechniques* 2001; 30: 318-22.
12. Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, et al. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol* 1988; 69: 2575-83.
13. Norder H, Hammas B, Löfdahl S, Courouce AM, Magnus LO. Comparison of the amino acid sequences of nine different serotypes of hepatitis B surface antigen and genomic classification of the corresponding hepatitis B virus strains. *J Gen Virol* 1992; 73: 1201-8.
14. Norder H, Couroucé AM, Magnus LO. Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. *Virology* 1994; 198: 489-503.
15. Stuyver L, De Gendt S, Van Geyt C, et al. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol* 2000; 81: 67-74.
16. Peng L, Ding JJ, Zhang LS. Establishing a new genotyping method of hepatitis B virus by polymerase chain reaction- restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) to analysis on S region and its application. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2004; 12: 475-8.
17. Zeng GB, Wen SJ, Wang ZH, et al. A novel hepatitis B virus genotyping system by using restriction fragment length polymorphism patterns of S gene amplicons. *World J Gastroenterol* 2004; 10:132-7.
18. Bartholomeusz A, Schaefer S. Hepatitis B virus genotypes: comparison of genotyping methods. *J Med Virol* 2004; 14: 3-16.
19. Lee WM. Hepatitis B virus infection. *J Clin Microbiol* 1997; 337: 733-45.
20. Moraes MT, Gomes SA, Niel C. Sequence analysis of pre S/S gene of hepatitis B virus strains of genotypes A, D, and F isolated in Brasil. *Arch Virol* 1996; 141: 1767-73.
21. Clarke B, Bloor S. Molecular genotyping of hepatitis B virus. *J Clin Virol* 2002; 25: 41-5.
22. Idrees M, Khan S, Riazuddin S. Common genotypes of hepatitis B virus. *Coll Physicians Surg Pak* 2004; 14: 344-7.
23. Leblebicioglu H, Eroglu C, and Members of the Hepatitis Study Group. Acute hepatitis B virus infection in Turkey, epidemiology and genotype distribution. *J Clin Microbiol* 2004; 10:537-41.
24. Kūlah C, Yalınay Çırak M. Genotyping of Turkish hepatitis B virus isolates based on the sequencing of the S regions. 2<sup>nd</sup> Molecular and Diagnostic Microbiology Congress. April 21-25, 2002, Kemer, Antalya-Turkey. Congress Proceedings and Programme, p: 146.
25. Mısırlıoğlu M, Kayın E, Akman E, Tuncer S. Hepatitis B virus genotypes and viral load analysis in pre and post vaccination sera from carrier children. 2<sup>nd</sup> Molecular and Diagnostic Microbiology Congress. April 21-25, 2002, Kemer, Antalya-Turkey. Congress Proceedings and Programme, p: 152.
26. Bozdayı AM, Bozkaya H, Tūrkylmaz AR, et al. Nucleotide divergences in the core promoter and precore region of genotype D hepatitis B virus in patients with persistently elevated or normal ALT levels. *J Clin Virol* 2001; 21: 91-101.
27. Senturker Guldaz N, Abacioglu YH. S-gene sequences and genotype-related restriction sites in hepatitis B virus carriers in Turkey. *J Infect Dis* 2004; 32:344-9.
28. Lok AS. Chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2002; 346:1682-3.