

ANKARA BÖLGESİNDEKİ HEPATİT B VİRUSU GENOTİPLERİNİN DNA DİZİ ANALİZİ YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ*

DETERMINATION OF HEPATITIS B VIRUS GENOTYPES BY DNA SEQUENCE ANALYSIS IN PATIENTS FROM ANKARA, TURKEY

Canan KÜLAH¹, Meltem YALINAY ÇIRAK²

¹ Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Zonguldak. (canankulah@yahoo.com)

² Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

ÖZET

Hepatit B virusu (HBV) genotiplerinin dünya üzerindeki dağılımı coğrafi bölgelere göre farklılık göstermektedir. Ülkemizde yapılan çalışmalarda belirlenen HBV genotipi ise genotip D olup, homojen ve tek tip şeklinde yayılım saptanmaktadır. Bu çalışmanın amacı, Ankara'da Gazi Üniversitesi Hastanesine başvuran HBV enfeksiyonlu hastalarda HBV genotiplerinin belirlenmesidir. Çalışmaya, tüm HBsAg pozitif ve anti-HBs negatif olan 84 (52 erkek, 32 kadın) hasta örneği dahil edilmiştir. Hastaların %95.2'sinde anti-HBc, %47.6'sında HBeAg, %11.9'unda ise anti-HBe belirteçleri pozitif olup, HBV-DNA düzeyleri ortalama $5.7 \times 10^7 \pm 4.6 \times 10^7$ IU/ml; ALT değerleri ortalama 131 ± 171 IU/ml ve AST değerleri ortalama 98 ± 170 IU/ml olarak saptanmıştır. Örneklerden HBV-DNA ekstraksiyonu, fenol-kloroform yöntemi ile yapılmış, HBV-DNA S gen bölgesi polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile amplifiye edilmiştir. PCR ürünlerinin döngüsel dizi analizi reaksiyonu; dideoksi zincir sonlanması yöntemine dayalı olan ticari bir kit (Cy5/5.5 Dye Primer Cycle Sequencing Kit; Visible Genetics, Kanada) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen DNA dizileri floresans temelli otomatik bir DNA dizileme sisteminde (Long-Read Tower System, Visible Genetics, Kanada) okutulmuş ve analiz edilmiştir. Gen bankasından alınan yayınlanmış tüm genotiplerin S gen bölgesine ait DNA dizileriyle, hasta örneklerinden elde edilen DNA dizilerinin karşılaştırılarak değerlendirilmesi sonucunda, 84 örneğin tümünün (%100) HBV D genotipi ve ayw alttipi ile ilişkili olduğu görülmüştür. PHYLIP filogenetik analiz paket programı kullanılarak yapılan analiz sonucunda oluşturulan filogenetik ağaçlarda, çalışılan örneklerin D genotipine ait grupta kümelendiği izlenmiştir. Sonuç olarak, ülkemizdeki HBV suşlarının moleküler epidemiyolojisi ve ülkemizin içinde bulunduğu coğrafi konum ile uyumlu olarak, hastanemize başvuran hasta grubunda da başlıca genotipin D olduğu saptanmış ve HBV genotip tayininin, klinik yaklaşımların daha bilinçli olmasına olanak sağlayacağı düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: Hepatit B virusu, HBV, genotip, dizi analizi, Ankara, Türkiye.

* Bu çalışma; Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalında uzmanlık tezi olarak hazırlanmış ve bir bölümü VI. Ulusal Viral Hepatit Simpozyumu (30 Ekim-2 Kasım 2002, Ankara)'nda bildiri olarak sunulmuştur.

ABSTRACT

Hepatitis B virus (HBV) genotypes vary depending on the geographical region. The HBV genotype determined in Turkey has been genotype D which is found as the homogenously disseminated single genotype. The aim of this study was to determine HBV genotypes in a group of HBV infected patients who were admitted to a university hospital in Ankara, Turkey. Serum samples from HBsAg positive and anti-HBs negative 84 (52 male, 32 female) patients with HBV infection were included into the study. Anti-HBc was positive in 95.2%, HBeAg was positive in 47.6% and anti-HBe was positive in 11.9% of the patients. Mean HBV-DNA levels of the patients were $5.7 \times 10^7 \pm 4.6 \times 10^7$ IU/ml; mean ALT levels were 131 ± 171 IU/ml and mean AST levels were 98 ± 170 IU/ml. HBV-DNA was extracted from serum by the phenol-chloroform method and PCR was performed to amplify the S gene region of HBV-DNA. Cycle sequencing of PCR products was performed by a commercial "Cy5/Cy5.5 Dye Primer Cycle Sequencing Kit" (Visible Genetics, Canada) based on dideoxy chain termination method. The sequences were read and analyzed in an automated fluorescence-based DNA-sequencing system (Long-Read Tower System, Visible Genetics, Canada). The nucleotide sequences of the patient samples were compared with the previously reported sequences in gene bank for each genotype. According to the comparative analysis of S-sequences of all patient samples with the published sequences of the genotypes in gene bank, all of the 84 hepatitis B strains (100%) were shown to be related to D genotypic group, subtype ayw. A phylogenetic analysis was performed and phylogenetic trees were constructed using programs in the PHYLIP phylogeny inference package. The patient samples clustered within the genotypic group D. According to these results, the main HBV genotype in our patients was genotype D in accordance with the previous molecular epidemiologic information on HBV in this geographic area. HBV genotype determination may help to establish more rational clinical approach in the evaluation of HBV infected patients.

Key words: Hepatitis B virus, HBV, genotype, sequence analysis, Ankara, Turkey.

GİRİŞ

Hepatit B virusu (HBV), yaygın olarak görülen önemli bir enfeksiyon hastalığı etkenidir. Tüm dünyada 350 milyondan fazla insan HBV ile enfekte durumdadır¹. HBV enfeksiyonu, klinik olarak akut veya fulminan hepatit, kronik hepatit veya kronik taşıyıcılık olarak görülebildiği gibi karaciğer sirozu ve hepatoselüler karsinomaya da yol açabilmektedir¹.

HBV suşlarının viral genomlarındaki nükleik asit dizilim farklılıklarına göre sekiz genotipi (A-H) belirlenmiştir². Her bir genotipin farklı bir coğrafik dağılım gösterdiği ortaya konulmuştur. Kuzeybatı Avrupa, Kuzey Amerika ve Afrika'da genotip A baskın olarak görülürken Doğu Asya ve Uzakdoğu ülkelerinde genotip B ve C'nin prevalansı yüksektir. Genotip D, tüm dünyada yaygın olarak görülmele birlikte Akdeniz bölgesinde, Yakın-doğu ve Ortadoğu ülkelerinde ve Güney Asya'da daha sıktır. Genotip E, Batı Afrika'da; genotip F, Orta Amerika bölgesinde; genotip G ise Amerika ve Fransa'da baskın olarak görülmektedir^{3,4}.

HBV patojenesinde genotipik farklılıkların rolü ve HBV genotiplerinin enfeksiyonun klinik seyri üzerine etkisi henüz tam olarak açıklanamamıştır. Ancak elde edilen bulgular, HBV genotipleri arasında klinik ve patojenik farklılıklar olduğunu desteklemektedir⁵⁻⁷. Yapılan çalışmalarda, genotip C çoğunlukla siroz ile sonuçlanan daha ciddi ve kronik karaciğer hasarı ile ilişkili bulunurken, genotip B'nin gençlerdeki hepatoselüler karsinoma

gelişimi ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir^{5,6}. Kronik aktif hepatitlerde ise genotip A baskın olarak saptanırken, akut hepatitlerde genotip D'nin prevalansı daha yüksek bulunmuştur⁷.

Ülkemizde sık görülen hepatit B enfeksiyonu, ciddi bir halk sağlığı sorunu olmasının yanı sıra, tedavi giderleri ve iş gücü kayıpları nedeniyle ekonomik açıdan da önem taşımaktadır. Bu enfeksiyonla mücadelede başarılı olmak için, HBV moleküler yapısının ve epidemiyolojisinin iyi bilinmesi gerekmektedir. Ülkemizde HBsAg seroprevalansının ve HBV-DNA düzeylerinin araştırıldığı çok sayıda çalışma bulunmasına rağmen, HBV genotiplerini ortaya koyacak kapsamlı çalışmalar yetersizdir. Bu çalışmanın amacı, toplum sağlığını tehdit eden ve ülkemizde endemik olarak enfeksiyona yol açan HBV genotiplerinin dağılımını kesitsel bir araştırma ile belirlemektir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı araştırma laboratuvarına 2000-2001 yılları arasında başvuran, HBV serolojik göstergeleri belirlenmiş ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile HBV DNA'sı pozitif bulunan akut ve kronik hepatit B'li 84 hasta (52'si erkek, 32'si kadın) örneği dahil edildi. Çalışılmacaya kadar -20°C'de saklanan serum örnekleri, çözüldükten sonra klasik proteinaz K/fenol-kloroform-izoamil alkol yöntemi ile HBV-DNA ekstraksiyonu yapıldı⁸. Genotiplendirmeye yönelik olarak, HBV DNA'larının S gen bölgesinin 483 baz çifti uzunluğundaki bölümü PCR yöntemi ile çoğaltıldı. Amplifiye edilen bölge ve kullanılan primerler Şekil 1'de gösterildi.



Şekil 1. S bölgesine ait 483 baz çiftlik bölümü amplifiye eden primerler ve bölgenin genomdaki lokalizasyonu (Referans izolat: Gen Bankası AJ131956 giriş no'lu HBV ayw3 subtipi).

Amplifikasyon için; 1.5 mM MgCl₂ (DNAmP, İngiltere), 100 µM dNTP (DNAmP, İngiltere), 50 µM her primerden (Tibmolbiol, Almanya), 1 ünite/ml Taq DNA polimeraz enzimi (DNAmP, İngiltere) ve PCR tamponu (10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, %0.1 Triton-X 100; DNAmP, İngiltere) kullanıldı. PCR karışımı ince çeperli 0.2'lik tüplere dağıtıldıktan sonra viral DNA'dan 5 µl eklendi. Otomatik ısı döngü cihazında (Hybaid, Sprint, İngiltere) 94°C'de 5 dakika sonrasında 30 döngü; 94°C'de 30 dakika, 56°C'de 1 dakika, 68°C'de 1 dakika ve son olarak 68°C'de 7 dakika olacak şekilde programlara ayarlanarak PCR uygulandı. PCR ürünlerinin analizi, agaroz jel elektroforezi yöntemi ile gerçekleştirildi. 483 baz çifti büyüklüğüne denk gelen bant aranarak sonuçlar değerlendirildi.

HBV DNA'sı S gen bölgesinin döngüsel dizi analizi reaksiyonu; "Cy5/5.5 Dye Primer Cycle Sequencing Kit" (Visible Genetics Inc, Kanada) ve ona ait protokol kullanılarak gerçekleştirildi. Reaksiyonda yine S gen bölgesini çoğaltmaya yönelik olarak, Cy5.5 ile işaretli primerler kullanıldı. Amplifikasyon tamamlandığında tüplere formamid içeren reaksiyon durdurucu solüsyondan eklendi.

Döngüsel dizi reaksiyonu sonucunda oluşan DNA dizilerinin okunarak değerlendirilmesi, otomatize bir DNA dizi analizi sistemi olan "Long-Read Tower System™" (Visible Genetics, Kanada) ile gerçekleştirildi. GeneObjects Software™ sistemi kullanılarak elde edilen tüm HBV-DNA dizileri sıralandı ve aynı hizaya getirilerek karşılaştırmalı olarak değerlendirmeler yapıldı. Gen bankasından (National Center for Biotechnology Information) alınarak sisteme yüklenmiş olan ve giriş numarası almış HBV-DNA S bölgesine ait DNA dizileriyle elde edilen sonuçlar karşılaştırıldı. Benzerlik oranları saptandı.

Çalışmada değerlendirme için kullanılan, genotipleri belli HBV-DNA dizilerinin gen bankası giriş numaraları aşağıda belirtildi:

AF160501, A01865, D0031, AB014360, AB014366, AF043593, D00220, AF100308, D00329, D00330, A011865, D23678, D23684, D23679, D50489, J02202, L08805, L13994, L24071, L27106, L29017, M12393, M17550, M12906, M21030, M17688, M23805, M23806, M27765, M38454, M38636, M54892, M54898, M54923, M57663, M74498, M74499, M74500, S50225, S62754, U19777, S75184, U55228, U87725, U87726, U87734, U87736, U87737, U87738, U9180, U87746, U91806, U91808, U91807, U91805, U91823, U91816, U91825, U91829, V00866, X02496, X02763, X04615, X04820, X59795, X51970, X14193, X65257, X65258, X65259, X69458, X69798, X70185, X75656, X75658, X75663, X75668, X75661, X75666, X75669, X85254, X75792, Z35716, Y07587, Z35717.

Filogenetik analiz için; elde edilen HBV-DNA S geni sekansları içinde, birbirleriyle yüksek oranda homoloji gösteren örnekler saptanarak, bunlardan birer örnek filogenetik ağaç çizimine dahil edildi. Bu şekilde seçilen 23 adet S geni sekansı örneği ile gen bankasından alınmış A-G genotiplerine ait 27 adet S geni sekans örneği kullanılarak filogenetik ağaç oluşturuldu. Analiz ve çizimler, PHYLIP filogenetik analiz program paketi (PHYLIP Phylogeny Inference Package, Version 3.5c, by Joseph Felsenstein, University of Washington, Seattle, 1993) içinde yer alan DNAPARS, SEQBOOT, DNADIST, NEIGHBOR, DRAWTREE ve DRAWGRAM programları kullanılarak gerçekleştirildi.

BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen 84 hastanın HBV-DNA düzeyleri 1.6×10^5 - 1×10^8 IU/ml (ort \pm SD: $5.7 \times 10^7 \pm 4.6 \times 10^7$); ALT değerleri 9-765 IU/ml (ort \pm SD: 131 ± 171) ve AST değerleri 8-1444 IU/ml (ort \pm SD: 98 ± 170) arasında değişmektedir. Hastaların tümü (84/84; %100) HBsAg pozitif ve anti-HBs negatif olup; 80 (%95.2)'inde anti-HBc, 40 (%47.6)'ında HBeAg, 10 (%11.9)'unda ise anti-HBe pozitifliği mevcuttur.

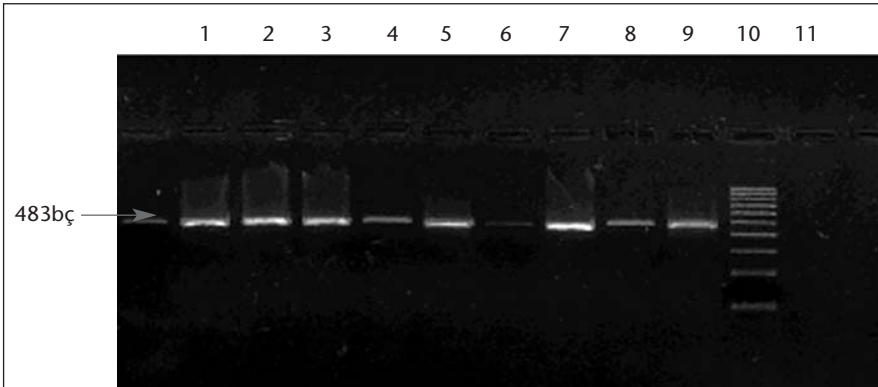
Çalışmada saptanan S gen bölgesine ait PCR sonuçlarının %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü Resim 1'de verilmiştir.

DNA dizilemesinden sonra yapılan analize göre %96'nın üzerinde benzerlik gösteren diziler aynı genotip olarak kabul edilmiştir. Sisteme yüklenmiş olan, HBV-DNA S bölgesine ait daha önceden bildirilmiş DNA dizileriyle, elde edilen sonuçlar karşılaştırılmış ve çalışılan örneklerin tümünün %100 ile %97.18 arasında değişen oranlarda, bildirilmiş D genotipindeki HBV-DNA dizileriyle benzerlik gösterdiği saptanmıştır. Bu dizilerin aynı zamanda "ayw" alt tipine dahil olduğu belirlenmiştir. Örneklerle karşılaştırıldığında en yüksek benzerlik oranları sırasıyla; M12393, X65257, X87737, X65259 giriş numaralı HBV-DNA dizileri ile elde edilmiştir.

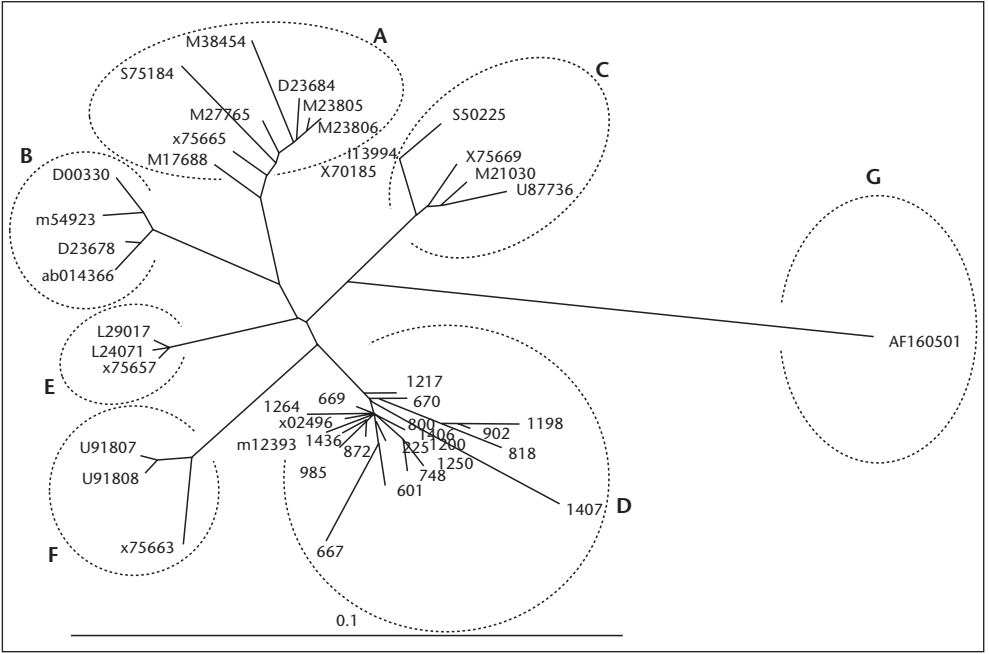
Filogenetik ağacın oluşturulmasında; PHYLIP filogenetik analiz program paketi içindeki programlar kullanılarak çizimler gerçekleştirilmiş ve örneklerin tümünün D genotipi içinde kümelendiği grlmştir. Farklı programların kullanılmasına rağmen genotipik kümelenmenin değişmediği izlenmiştir. Bunlardan DNADIST, NEIGHBOUR, DRAWTREE programları ile yapılan filogenetik ağaç ve genotipik kümelenmeler Şekil 2'de gösterilmiştir.

TARTIşMA

HBV enfeksiyonlarının tanısında yüksek özgüllük ve duyarlılığa sahip olan moleküler yöntemler, bir yandan klasik tanı yöntemleriyle zlemeyen soruların yanıtlanmasını sağlarken, öte yandan genotip ayırımı gibi yeni kavramların gündeme gelmesini sağla-



Resim 1. S gen bölgesine ait amplifikasyon sonuçlarının agaroz jeldeki görüntüsü. Kolonlar: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10: S gen bölgesine ait 483 baz çifti uzunluğundaki amplifikasyon rnleri. 11: Moleküler ağırlık belirteci.



Şekil 2. DNADIST, NEIGHBOUR, DRAWTREE programları ile yapılan filogenetik ağaç ve genotipik kümelenmeler.

mıştır. HBV genotiplerinin dağılımı coğrafi bölgelere göre farklılıklar göstermektedir; ancak çalışılan suş ve bölge sayısının sınırlı olması nedeniyle sonuçlar tam olarak yeterli değildir. Özellikle ülkemizin de içinde bulunduğu Akdeniz bölgesinde, genotip D baskın olarak görülmektedir ve erken horizontal bulaş, enfeksiyonun yayılmasında en önemli geçiş yoludur⁹. Elde ettiğimiz sonuçlara göre; içinde bulunduğumuz coğrafi bölge ile uyumlu olarak, çalışılan tüm HBV suşları genotip D ile uyumlu bulunmuştur. Sonuçlarımız bu yönüyle, aynı zamanda, HBV'nin ülkemizdeki başlıca geçiş yoluna da ışık tutmaktadır. Horizontal yol özellikle ev içi bulaşta önemlidir. Kalabalık yaşam şartları, kötü hijyen ve düşük sosyoekonomik düzey geçiş oranını artırmaktadır.

HBV'ye bağlı karaciğer hastalığının klinik gidişi ve histopatolojisinin değişik genotiplerle olan ilişkisi henüz kesin olarak belirlenememiştir. Ancak HBV genotiplerinin virus-konak ilişkisinde rolü olduğunu gösteren çalışmalar vardır^{5,7,10,11}. Tayvan'da yapılan bir çalışmada, hepatoselüler karsinomlu genç hastaların özellikle genotip B ile enfekte olduğu; yaşlı hasta grubunda ise daha ziyade genotip C'nin etken olduğu belirtilmiştir¹⁰. Buna karşın Japonya'da, hepatoselüler karsinomlu hem genç hem de yaşlı hastalarda genotip C saptanmıştır¹¹. Genotip C daha ciddi ve uzun süreli karaciğer hastalığı, fibrozis ve siroz gelişimi ile ilişkili olarak görülmektedir⁵.

HBV enfeksiyonunun patogeneğinde, kronikleşmeden belli bir genotipin sorumlu olabileceği de düşünülmektedir^{6,7,12,13}. Örneğin Polonya'da yapılan bir çalışmada, kronik

hepatit B'li çocuk hastaların %82'sinde genotip A saptanmıştır¹². Mayerat ve arkadaşlarının⁷ İsviçre'de yaptıkları çalışmada da, kronik aktif hepatitlerde genotip A, akut hepatitlerde ise genotip D daha baskın olarak saptanmıştır. Ancak yine de genotipe özgül patogeneze, konak immünitesinin mi yoksa viral faktörlerin mi daha önemli olduğunun belirlenmesi için daha ileri çalışmalara gereksinim duyulmaktadır. HBV genotipleri ile tedavi başarısı arasındaki ilişkinin araştırıldığı çalışmalarda ise, genotip A ile enfekte hastaların interferon tedavisine diğer genotiplerden daha iyi yanıt verdiği; genotip C'nin interferon tedavisine yanıtının daha az olduğu ve famsiklovir tedavisine yanıtın genotipten bağımsız olduğu bildirilmektedir^{11,14}.

Nükleotid dizilerinin filogenetik analizi ile yapılan genotiplendirme yöntemi, en güvenilir ve kesin sonucu verdiği için halen altın standart yöntem olarak kabul edilmektedir. Filogenetik analiz yöntemi, olası yeni genotipleri ve genotipler arası ilişkileri de belirleyebilmektedir. Ancak bu üstünlüklerinin yanında zaman alıcı, emek-yoğun ve pahalı bir yöntemdir^{15,16}. İdeal olarak tüm genomun nükleotid dizisinin analizi ile gerçekleştirilen genotiplendirme, P ve S gen bölgeleri kullanılarak da uygulanabilmektedir. S gen bölgesinin, P ve preS gen bölgelerinden daha iyi korunmuş olması nedeniyle, genotiplendirme için daha güvenilir ve uygulanabilir olduğu bildirilmiştir¹⁷. Bizim çalışmamızda genotipik grupların belirlenmesi amaçlandığından, S gen bölgesinin dizilenmesine dayalı filogenetik analiz yöntemi gerçekleştirilmiştir. Çalışılan suşların tümü bu yöntemle başarılı olarak genotiplendirilebilmiştir.

Ülkemizdeki HBV genotiplerinin dağılımı ile ilgili yapılmış az sayıda çalışma bulunmaktadır. İlk olarak Ankara'da Bozdayı ve arkadaşları¹⁸, 67 örnekte pre-S2 gen bölgesinin dizisini gerçekleştirmiş, örneklerin tümünün genotip D, alt tip ayw ile uyumlu olduğunu saptamışlardır. Ardından yine Ankara'da Külah ve arkadaşlarının¹⁹ 40 erişkin hasta grubunda ve Mısırlıoğlu ve arkadaşlarının²⁰ 57 çocuk hasta grubunda yaptıkları çalışmalarda; S gen bölgesi dizilemesi ile tüm HBV örneklerinin genotip D, alt tip ayw olduğu ortaya konmuştur. Aynı bölgenin dizilenmesi ile yapılan diğer çalışmalarda da benzer sonuçlar alınmıştır²¹⁻²⁵. Örneğin, Yalçın ve arkadaşları²¹ Diyarbakır bölgesinden 44 hastada, Bozdayı ve arkadaşları²² Ankara bölgesinden 41 hastada, Şentürker ve arkadaşları²³ Dokuz Eylül Üniversitesinde 23 hastada, Serin ve arkadaşları²⁴ Mersin Üniversitesinde 50 hastada, Sertöz ve arkadaşları²⁵ ise Ege Üniversitesinde 54 hastada HBV genotipini D olarak belirlemişlerdir. Bunların yanında RFLP (restriction fragment length polymorphism) ya da ELISA gibi yöntemler kullanılarak yapılan az sayıda çalışmada da, Elazığ, Samsun ve Isparta bölgelerini de kapsayacak şekilde ülkemizde yaygın HBV genotipi D olarak bulunmuştur^{2,26-28}. Çalışmamızda da, 84 hastaya ait HBV suşlarında yaygın genotip, filogenetik analiz sonucunda genotip D olarak belirlenmiştir. Örneklerin tümünün aynı genotipe dahil bulunması nedeniyle, genotip ile serolojik değerler, cinsiyet, viral yük ve enzim değerleri arasında karşılaştırma yapılamamıştır.

Bu konuda yapılan tüm çalışmalarda belirlendiği üzere, ülkemizdeki HBV genotip dağılımının homojen ve tek tip şeklinde olması, standart klinik yaklaşım kolaylığı sağlayabilecektir. Ayrıca tek tipteki genotip dağılımı, hem farklı genotiplerle oluşabilecek koenfek-

siyon olasılığını azaltmakta, hem de rekombinant tiplerin gelişmesini önemli ölçüde engellemektedir. Zira rekombinant tiplerin, immün yanıtta kaçarak, daha ciddi klinik tablolara yol açtığı saptanmıştır²⁹. Sonuç olarak elde ettiğimiz veriler, ülkemizdeki HBV suşlarının moleküler epidemiyolojisi ve ülkemizin içinde bulunduğu coğrafi konum ile uyumlu bulunmuş ve HBV genotip tayininin, klinik yaklaşımların daha bilinçli olmasına olanak sağlayacağı düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Lee WM. Hepatitis B virus. *N Engl J Med* 1997; 33: 1733-45.
2. Aksoy A, Ozdarendeli A. Genotyping of hepatitis B virus by restriction enzyme analysis. *Mikrobiyol Bul* 2006; 40: 215-23.
3. Norder H, Hammas B, Lee SD. Genetic relatedness of hepatitis B virus strains of diverse geographical origin and natural variations in the primary structure of the surface antigen. *J Gen Virol* 1993; 74: 1341-8.
4. Norder H, Courouce AM, Magnius 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.
5. Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2000; 118: 554-9.
6. Lindh M, Hannoun C, Dhillon AP, Norkrans G, Horal P. Core promoter mutations and genotypes in relation to viral replication and liver damage in East Asian hepatitis B virus carriers. *J Infect Dis* 1999; 179: 775-82.
7. Mayerat C, Mantegani A, Frei PC. Does hepatitis B virus genotype influence the clinical outcome of hepatitis B virus infection? *J Viral Hepat* 1999; 6: 299-304.
8. Kramvis A, Bukofzer S, Kew MC. Comparison of hepatitis B virus DNA extractions from serum by the QIA amp blood kit, Gene Releaser, and the phenol-chloroform method. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2731-3.
9. Greate GB, Giusti G. Epidemiology of chronic viral hepatitis in the Mediterranean area. *Infection* 1990; 18: 29-33.
10. Fujie H, Moriya K, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Iino S, Koike K. Hepatitis B virus genotypes and hepatocellular carcinoma in Japan. *Gastroenterology* 2001; 120: 1564-5.
11. Orito E, Mizokami M, Sakugawa H, et al. A case control study for clinical and molecular biological differences between hepatitis B viruses of genotypes B and C. Japan HBV Genotype Research Group. *Hepatology* 2001; 33: 218-23.
12. Dzierzanowska-Fangrat K, Woynarowski M, Szczygielska I, et al. Hepatitis B virus genotypes in children with chronic hepatitis B in Poland. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006; 18: 655-8.
13. Kao JH, Wu NH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Hepatitis B genotypes and response to interferon therapy. *J Hepatol* 2000; 33: 998-1002.
14. Seignères B, Pichoud C, Ahmed SS, Hantz O, Trépo C, Zoulim F. Evolution of hepatitis B virus polymerase gene sequence during famciclovir therapy for chronic hepatitis B. *J Infect Dis* 2000; 181: 1221-33.
15. Moriya T, Kuramoto IK, Yoshizawa H, Holland PV. Distribution of hepatitis B virus genotypes among American blood donors determined with a PreS2 epitope enzyme-linked immunosorbent assay kit. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 877-80.
16. Naito H, Hayashi S, Abe K. Rapid and specific genotyping system for hepatitis B virus corresponding to six major genotypes by PCR using type-specific primers. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 362-4.
17. Kidd K. Variability in hepatitis B virus DNA: Phylogenetic, epidemiological and clinical implications. *Scand J Infect Dis* 1996; 28: 111-6.
18. Bozdayi AM, Bozkaya H, Turkyilmaz 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.

19. Kulah C, Yalınay ırak M. Genotyping of Turkish hepatitis B virus isolates based on the sequencing of S regions. 2nd Molecular and Diagnostic Microbiology Congress. April 21-25, 2002, Kemer, Antalya. Congress Proceedings and Programme Book, P. 2-03.
20. 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. 2nd Molecular and Diagnostic Microbiology Congress. April 21-25, 2002, Kemer, Antalya. Congress Proceedings and Programme Book, P. 3-08.
21. Yalcın K, Degertekin H, Bahcecioglu IH, et al. Hepatitis B virus genotype D prevails in patients with persistently elevated or normal ALT levels in Turkey. *Infection* 2004; 32: 24-9.
22. Bozdayi AM, Aslan N, Bozdayi G, et al. Molecular epidemiology of hepatitis B, C and D viruses in Turkish patients. *Arch Virol* 2004; 149: 2115-29.
23. Sentrker Gldas N, Abacioğlu YH. S-gene sequences and genotype-related restriction sites in hepatitis B virus carriers in Turkey. *Infection* 2004; 32: 344-9.
24. Serin MS, Akkiz H, Abaylı B, Oksuz M, Aslan G, Emekdas G. Genotyping of hepatitis B virus isolated from chronic hepatitis B patients in the south of Turkey by DNA cycle-sequencing method. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; 53: 57-60.
25. Sertoz RY, Erensoy S, Pas S, Ozacar T, Niesters H. Restriction fragment length polymorphism analysis and direct sequencing for determination of HBV genotypes in a Turkish population. *New Microbiol* 2008; 31: 189-94.
26. Leblebicioglu H, Eroğlu C; Members of the Hepatitis Study Group. Acute hepatitis B virus infection in Turkey: epidemiology and genotype distribution. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 537-41.
27. Sunbul M, Leblebicioglu H. Distribution of hepatitis B virus genotypes in patients with chronic hepatitis B in Turkey. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1976-80.
28. Kaya S, Cetin ES, Aridogan BC, Onal S, Demirci M. Distribution of hepatitis B virus (HBV) genotypes among HBV carriers in Isparta. *Iran Biomed J* 2007; 11: 59-63.
29. Morozov V, Pisareva M, Groudin M. Homologous recombination between different genotypes of hepatitis B virus. *Gene* 2000; 260: 55-6.