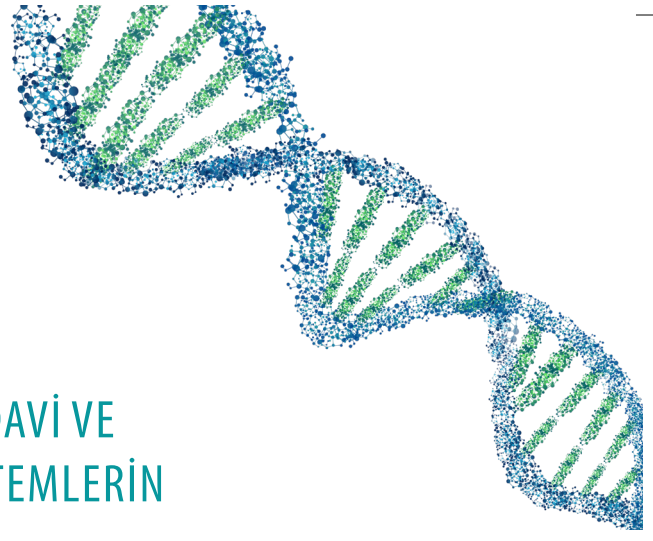


## BÖLÜM 30

# HEPATİT B VE D VİRÜSLERİNİN TANI, TEDAVİ VE EPİDEMİYOLOJİSİNDE MOLEKÜLER YÖNTEMLERİN KULLANIMI



Barış OTLU<sup>1</sup>

Elif Seren TANRIVERDİ<sup>2</sup>

Hepatit B virüsünün (HBV) keşfedilmesinden yaklaşık 60 yıl ve ilk aşısının onaylanmasından 30 yıldan fazla bir süre geçmiş olmasına rağmen, 300 milyondan fazla enfekte kişi ile HBV tüm dünyada halen en yaygın kronik bulaşıcı hastalıklardan biri olmaya devam etmektedir<sup>1-3</sup>. Hepatit B hastalığının akut ve kronik olmak üzere iki klinik formu mevcuttur. Dünyada kronik hepatit B hastalığında gelişen siroz, ağır karaciğer hasarı ve karaciğer kanseri nedeniyle her yıl yaklaşık bir milyon kişi hayatını kaybetmektedir. Defektif bir RNA virüsü olan ve replike olabilmesi için HBV'nin yüzey antijenine ihtiyaç duyan Hepatit D virüsü (HDV) ise ilk kez 1977 yılında HBV enfeksiyonlu hastalarda keşfedilmiştir. HDV enfeksiyonu, insanlar aynı anda hem hepatit B hem de D ile enfekte olduklarında (koenfeksiyon) veya hepatit B ile ilk kez enfekte olduktan sonra D virüsü ile karşılaşıldığında (süperenfeksiyon) gelişebilir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), kronik hepatit B hastalarının %5'inin HDV'den etkilendiğini bildirmektedir. Bununla birlikte küresel HBV aşılama programlarının başarısı

nedeniyle HDV enfeksiyonu giderek azalmaktadır. Her iki etkenin tanısı, etkili tedavisi, hastalığın ilerleyişinin izlenmesi, korunma ve kontrol önlemleri geliştirilmesi için moleküler yöntemler oldukça önemli yer tutmaktadır.

### Hepatit B Virüsü Genomik Yapısı ve Moleküler Tanı İlişkili hedefler

Hepatit B virüsü, *Hepadnaviridae* ailesi içerisinde sınıflandırılır. HBV, zarf, çekirdek (ön çekirdek/çekirdek), polimeraz ve X proteinlerini kodlayan, kısmen örtüşen dört açık okuma çerçevesi halinde organize edilmiş yaklaşık 3200 baz çiftinden oluşan çift sarmallı bir DNA genomuna sahiptir (Şekil 1). Diğer DNA virüslerinden farklı olarak HBV, DNA'sını ters transkripsiyon yoluyla çoğaltır, bu da HBV yaşam döngüsünü karmaşık hale getirir. Söz konusu bu durum, HBV'nin mikrobiyolojik laboratuvar tanısını da karmaşık hale getirmiştir. Bu alandaki ilk testler HBV yüzey antijenlerine (HBsAg) karşı gelişen antikorların tespitine dayanan radyoaktif temelli radioimmunoassay yöntemidir.

<sup>1</sup> Prof. Dr., İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD., baris.otlu@inonu.edu.tr

<sup>2</sup> Uzm. Dr., İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD., seren.tanriverdi@inonu.edu.tr

## Hepatit D Virüs Genotipinin Belirlenmesi

Kronik D hepatiti, hepatit virüslerine bağlı olarak gelişen kronik viral hepatitlerin en nadir görülen şekli olmasına karşın ciddi seyretmesi sebebiyle önemlidir. Bugün için HDV'nin 8 farklı genotipi olduğu bilinmektedir. HDV genotipleri arasındaki farklılık L-HDAg proteininin yüksek prolin içeriğine sahip C terminal bölgesi nedeniyle 56.

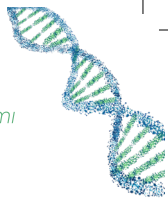
HDV'nin genotip dağılımı coğrafi bölgelere göre farklılıklar göstermektedir. Tüm dünyada ve ülkemizde en yaygın HDV genotipi, genotip I'dir 57. Bunun yanında HDV-2'nin Japonya, Tayvan ve Rusya'da, HDV-4'ün Tayvan ve Japonya'da; HDV-3'ün Amazon bölgesinde; ve HDV-5, HDV-6 ve HDV-7'nin Afrika'da yaygın olarak tespit edilen genotip olduğu bilinmektedir 58.

HDV genotiplerinin hastalığın seyri ile ilişkisi halen araştırılmaya muhtaç bir konudur. Tayvan'da yapılan bir çalışmada HDV genotip I ile enfekte hastaların genotip III'e göre daha düşük remisyon oranına sahip olduğu bildirilmiştir. Güney Amerika'da ise HDV genotip III ve HBV genotip F birlikteliği fulminan hepatit ile ilişkilendirilmiştir 57. Hepatit D'nin klinik gidişatına genotip farklılıklarının etkisi olduğu düşünüldüğünde, ideal bir tedavi yaklaşımı HDV genotipinin belirlenmesini içerecektir.

Viral yük tayininde olduğu gibi, HDV genotiplendirme tekniklerinde de bir varyasyon vardır. Şu anda HDV genotiplendirme yalnızca araştırma amaçlı kullanılmaktadır ve henüz standart bir yöntem bulunmamaktadır. HDV genotiplendirme için hibridizasyon temelli yöntemler, Rt-LAMP, PCR-RFLP ve dizi analizi kullanılmaktadır 56. Klinik uygulamada kullanılacak hızlı ve etkili bir genotiplendirme yöntemi, hasta yönetimini iyileştirecek ve hedefe yönelik tedaviler geliştirmenin başlangıç noktası olacaktır.

## Kaynaklar

1. Guirgis BS, Abbas RO, Azzazy HM. Hepatitis B virus genotyping: current methods and clinical implications. *Int J Infect Dis* 2010;14(11): e941-e53.
2. Vivekanandan P, Singh OV. Molecular methods in the diagnosis and management of chronic hepatitis B. *Expert Rev Mol Diagn* 2010;10(7): 921-35.
3. Hillyard DR. Molecular detection and characterization of hepatitis B virus. *Molecular microbiology: diagnostic principles and practice* 2011: 579-92.
4. Durmaz R, editör. Moleküler epidemiyolojinin prensipleri. Nobel Tıp Kitabevleri; 2001.
5. Available from: [https://en.wikipedia.org/wiki/Hepatitis\\_B\\_virus](https://en.wikipedia.org/wiki/Hepatitis_B_virus). Erişim tarihi: 20.09.2022.
6. Vachon A, Osiowy C. Novel biomarkers of Hepatitis B virus and their use in chronic hepatitis B patient management. *Viruses* 2021;13(6): 951.
7. Ergünay K. Virolojide Moleküler Tanı Yöntemleri, pp: 212-22. 2003.
8. Scotto J, Hadchouel M, Hery C, Yvart J, Tiollais P, Brechot C. Detection of hepatitis B virus DNA in serum by a simple spot hybridization technique: comparison with results for other viral markers. *Hepatology* 1983;3(3): 279-84.
9. Hino O, Kitagawa T, Koike K, Kobayashi M, Hara M, Mori W, et al. Detection of hepatitis B virus DNA in hepatocellular carcinomas in Japan. *Hepatology* 1984;4(1): 90-5.
10. Larzul D, Guigue F, Sninsky J, Mack D, Brechot C, Guesdon J-L. Detection of hepatitis B virus sequences in serum by using in vitro enzymatic amplification. *J Virol Methods* 1988;20(3): 227-37.
11. Mothershed EA, Whitney AM. Nucleic acid-based methods for the detection of bacterial pathogens: present and future considerations for the clinical laboratory. *Clinica Chimica Acta* 2006;363(1-2): 206-20.
12. Paziienza V, Niro GA, Fontana R, Vinciguerra M, Andriulli A. Advance in molecular diagnostic tools for hepatitis B virus detection. *Clin Chem Lab Med* 2013;51(9): 1707-17.
13. Chan HL, Leung NW, Lau TC, Wong ML, Sung JJ. Comparison of three different sensitive assays for hepatitis B virus DNA in monitoring of responses to antiviral therapy. *J Clin Microbiol* 2000;38(9): 3205-8.
14. Otlı B. Salgında moleküler mikrobiyolojik yöntemlerin kullanımı. Hastane infeksiyonları Dergisi. 2013(Hastane infeksiyonları Eğitim Programı).
15. Kojabad AA, Farzanehpour M, Galeh HEG, Dorostkar R, Jafarpour A, Bolandian M, et al. Droplet digital PCR of viral DNA/RNA, current progress, challenges, and future perspectives. *J Med Virol* 2021;93(7): 4182-97.
16. Piermatteo L, Scutari R, Chirichiello R, Alkhatib M, Malagnino V, Bertoli A, et al. Droplet digital PCR assay as an innovative and promising highly sensitive assay to unveil residual and cryptic HBV replication in peripheral compartment. *Methods* 2022;201: 74-81.
17. Tang H, Cai Q, Li H, Hu P. Comparison of droplet digital PCR to real-time PCR for quantification of hepatitis B virus DNA. *Biosci Biotechnol Biochem* 2016;80(11): 2159-64.
18. Cornberg M, Lok AS-F, Terrault NA, Zoulim F, Berg T, Brunetto MR, et al. Guidance for design and endpoints of clinical trials in chronic hepatitis B-Report from the 2019 EASL-AASLD HBV Treatment Endpoints Conference. *J Hepatol* 2020;72(3): 539-57.
19. Huang J-T, Yang Y, Hu Y-M, Liu X-H, Liao M-Y, Morgan R, et al. A highly sensitive and robust method for hepatitis



- B virus covalently closed circular DNA detection in single cells and serum. *J Mol Diagn* 2018;20(3): 334-43.
20. Liang L-B, Zhu X, Yan L-B, Du L-Y, Liu C, Liao J, et al. Quantitative intrahepatic HBV cccDNA correlates with histological liver inflammation in chronic hepatitis B virus infection. *Int J Infect Dis* 2016;52: 77-82.
  21. Hayashi S, Isogawa M, Kawashima K, Ito K, Chuaypen N, Morine Y, et al. Droplet digital PCR assay provides intrahepatic HBV cccDNA quantification tool for clinical application. *Sci Rep* 2022;12(1): 1-14.
  22. Balagopal A, Grudra T, Ribeiro RM, Saad YS, Hwang HS, Quinn J, et al. Single hepatocytes show persistence and transcriptional inactivity of hepatitis B. *JCI insight* 2020;5(19).
  23. Zhao K, Liu A, Xia Y. Insights into hepatitis B virus DNA integration-55 years after virus discovery. *The Innovation* 2020;1(2): 100034.
  24. Tu T, Zhang H, Urban S. Hepatitis B virus DNA integration: in vitro models for investigating viral pathogenesis and persistence. *Viruses* 2021;13(2): 180.
  25. Rydell GE, Larsson SB, Prakash K, Andersson M, Norder H, Hellstrand K, et al. Abundance of noncircular intrahepatic hepatitis B virus DNA may reflect frequent integration into human DNA in chronically infected patients. *J Infect Dis* 2022;225(11): 1982-90.
  26. Larsson SB, Tripodi G, Raimondo G, Saitta C, Norkrans G, Pollicino T, et al. Integration of hepatitis B virus DNA in chronically infected patients assessed by Alu-PCR. *J Med Virol* 2018;90(10): 1568-75.
  27. Lee JH, Kim HS. Current laboratory tests for diagnosis of hepatitis B virus infection. *Int J Clin Pract* 2021;75(12): e14812.
  28. Lin N, Ye A, Lin J, Liu C, Huang J, Fu Y, et al. Diagnostic value of detection of pregenomic RNA in sera of hepatitis B virus-infected patients with different clinical outcomes. *J Clin Microbiol* 2020;58(2): e01275-19.
  29. Liu S, Zhou B, Valdes JD, Sun J, Guo H. Serum hepatitis B virus RNA: a new potential biomarker for chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2019;69(4): 1816-27.
  30. Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastrosoewignjo RI, Imai M, Miyakawa Y, et al. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol* 1988;69(10): 2575-83.
  31. Norder H, Hammam B, Löfdahl S, Couroucé A-M, 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(5): 1201-8.
  32. Serin MS, Akkız 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(1): 57-60.
  33. Lin CL, Kao JH. The clinical implications of hepatitis B virus genotype: Recent advances. *J Gastroenterol Hepatol* 2011;26: 123-30.
  34. Mizokami M, Nakano T, Orito E, Tanaka Y, Sakugawa H, Mukaide M, et al. Hepatitis B virus genotype assignment using restriction fragment length polymorphism patterns. *FEBS letters* 1999;450(1-2): 66-71.
  35. 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(1): 362-4.
  36. Liu W-C, Lindh M, Buti M, Phiet PH, Mizokami M, Li H-H, et al. Genotyping of hepatitis B virus—genotypes a to g by multiplex polymerase chain reaction. *Intervirology* 2008;51(4): 247-52.
  37. Payungporn S, Tangkijvanich P, Jantaradsamee P, Theamboonlers A, Poovorawan Y. Simultaneous quantitation and genotyping of hepatitis B virus by real-time PCR and melting curve analysis. *J Virol Methods* 2004;120(2): 131-40.
  38. Liu W-C, Mizokami M, Buti M, Lindh M, Young K-C, Sun K-T, et al. Simultaneous quantification and genotyping of hepatitis B virus for genotypes A to G by real-time PCR and two-step melting curve analysis. *J Clin Microbiol* 2006;44(12): 4491-7.
  39. Qutub MO, Germer JJ, Rebers SP, Mandrekar JN, Beld MG, Yao JD. Simplified PCR protocols for INNO-LiPA HBV genotyping and INNO-LiPA HBV PreCore assays. *J Clin Virol* 2006;37(3): 218-21.
  40. Song Y, Dai E, Wang J, Liu H, Zhai J, Chen C, et al. Genotyping of hepatitis B virus (HBV) by oligonucleotides microarray. *Mol Cell Probes* 2006;20(2): 121-7.
  41. Çelik E. Direnç mutasyonları gösteren HBV mutantlarının belirlenmesi ve bu mutantların çeşitli antivirallere karşı direnç profillerinin in vitro fenotipleme yöntemi ile karakterizasyonu: Biyoteknoloji Enstitüsü.
  42. Bartholomeusz A, Locarnini SA, editors. Antiviral drug resistance: clinical consequences and molecular aspects. *Semin Liver Dis* 2006;26(2): 162-70.
  43. 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(1): 254-65.
  44. Neumann-Fraune M, Beggel B, Kaiser R, Obermeier M. Hepatitis B virus drug resistance tools: one sequence, two predictions. *Intervirology* 2014;57(3-4): 232-6.
  45. Neumann-Fraune M, Beggel B, Pfister H, Kaiser R, Verheijen J. High frequency of complex mutational patterns in lamivudine resistant hepatitis B virus isolates. *J Med Virol* 2013;85(5): 775-9.
  46. Schildgen O, Sirma H, Funk A, Olotu C, Wend UC, Hartmann H, et al. Variant of hepatitis B virus with primary resistance to adefovir. *N Engl J Med* 2006;354(17): 1807-12.
  47. Sablon E, Shapiro F. Advances in molecular diagnosis of HBV infection and drug resistance. *Int J Med Sci* 2005;2(1): 8.
  48. 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(5): 837-44.
  49. Hepatitis D. Available from: [https://en.wikipedia.org/wiki/Hepatitis\\_D#cite\\_note-Deltavirus-10](https://en.wikipedia.org/wiki/Hepatitis_D#cite_note-Deltavirus-10). Erişim tarihi: 20.09.2022.
  50. Brichtler S, Le Gal F, Neri-Pinto F, Mansour W, Roulot D, Laperche S, et al. Serological and molecular diagnosis of hepatitis delta virus infection: results of a French national quality control study. *J Clin Microbiol* 2014;52(5): 1694-7.
  51. Pyne M, Mallory M, Xie H, Mei Y, Schlaberg R, Hillyard D. Sequencing of the hepatitis D virus RNA WHO international standard. *J Clin Virol* 2017;90: 52-6.
  52. Le Gal F, Brichtler S, Drugan T, Alloui C, Roulot D, Pawlotsky

- JM, et al. Genetic diversity and worldwide distribution of the deltavirus genus: A study of 2,152 clinical strains. *Hepatology* 2017;66(6): 1826-41.
53. Stelzl E, Ciesek S, Cornberg M, Maasoumy B, Heim A, Chudy M, et al. Reliable quantification of plasma HDV RNA is of paramount importance for treatment monitoring: A European multicenter study. *J Clin Virol* 2021;142: 104932.
54. Olivero A, Rosso C, Ciancio A, Abate ML, Nicolosi A, Troshina G, et al. Clinical Application of Droplet Digital PCR for Hepatitis Delta Virus Quantification. *Biomedicines* 2022;10(4): 792.
55. Xu L, Zhang X, Cao Y, Fan Z, Tian Y, Zou H, et al. Digital Droplet PCR for Detection and Quantitation of Hepatitis Delta Virus. *Clin Transl Gastroenterol* 2022;13(7): e00509.
56. Polosanu LI, Diaconu O, Buburuz AM, Grecu RI, Iancu LS. A brief on genotyping methods of hepatitis D virus.
57. Karaca Ç, Bozacı M, Akyüz F, Demir K, Beşışık F, Çakaloğlu Y, et al. Ülkemizdeki hepatit D virus genotipi. *Akademik Gastroenteroloji Dergisi* 2007;6(2): 76-7.
58. Le Gal F, Gault E, Ripault M-P, Serpaggi J, Trinchet J-C, Gordien E, et al. Eighth major clade for hepatitis delta virus. *Emerg Infect Dis* 2006;12(9): 1447.