

OKÜLT HEPATİT B VİRÜSÜNÜN GENOTİP, SUBGENOTİP VE SUBTİP ANALİZİ

ANALYSIS OF GENOTYPE, SUBGENOTYPE AND SEROTYPE OF OCCULT HEPATITIS B VIRUS

Bülent ÇAKAL¹ , Alp ATASOY² , Bilger ÇAVUŞ² , Aslı ÖRMECİ² , Mehveş PODA³ , Mesut BULAKÇI⁴ ,
Mine GÜLLÜOĞLU⁵ , Mehmet Güven GÜNVER⁶ , Filiz AKYÜZ² 

¹İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

²İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

³İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

⁴İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Radyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

⁵İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

⁶İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Biyoistatistik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

ORCID IDs of the authors: B.Ç. 0000-0002-1254-844X; A.A. 0000-0003-1791-897X; B.Ç. 0000-0003-2203-4255; A.Ö. 000-0001-6297-8045; M.P. 0000-0002-1957-6072; M.G. 0000-0002-3967-0779; M.B. 0000-0003-0993-6465; M.G.G. 0000-0002-4628-8391; F.A. 0000-0001-7498-141X

Cite this article as: Cakal B, Atasoy A, Cavus B, Ormeci A, Poda M, Bulakci M, et al. Analysis of genotype, subgenotype and serotype of Occult Hepatitis B Virus. J Ist Faculty Med 2021;84(3):402-10. doi: 10.26650/IUITFD.2020.0093

ÖZET

Amaç: Okült Hepatit B Virus (HBV) enfeksiyonu (Occult HBV infection; OBI) mevcut serolojik testler ile HBV yüzey antijeni (Surface antigen; HBsAg) negatif tespit edilen bireylerin karaciğerinde HBV genomunun uzun süreli persistan varlığı ile karakterizedir. Bu çalışmada OBI tanılı hastalardan elde edilen HBV'lerin genotip, subgenotip ve subtip profillerinin karakteristiğinin irdelenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya HBsAg negatif farklı klinik endikasyonlar nedeniyle karaciğer parankim biyopsisi gerçekleştirilen hastaların karaciğer biyopsi örneklerinde Nested PCR yöntemiyle HBV DNA varlığı tanımlanan 32 OBI tanılı hasta ile 17 kronik hepatit B hastası dahil edildi. HBV S gen MHR bölgesini hedefleyen DNA fragmanları nested PCR kullanılarak amplifiye edildi. HBV'nin genotip, subgenotip ve subtip/serotiplerinin belirlemek için Sanger sekans metodu kullanıldı.

Bulgular: Bu çalışmada OBI ve kronik hepatit B hastalarından izole edilen HBV'lerin tümünün genotipi D, subgenotipler sırasıyla HBV/D1 (%75,5), HBV/D2 (%6,1) ve HBV/D3 (%18,4) serotipler sırasıyla ayw2 (%73,5) ve ayw3 (%26,5) olarak belirlenmiştir. OBI'li hastaların %28,1'nin subgenotipi HBV/D3 olarak belirlenmesine karşın kronik hepatit B hastalarının hiç birinde HBV/D3 subgenotipi saptanmamıştır.

Sonuç: Subgenotip HBV/D3'ün viral biyogenezin dinamiği üzerindeki potansiyel etkileri HBsAg negatifliği ve düşük replikasyon

ABSTRACT

Objective: Occult hepatitis B infection (OBI) can be characterized by the long-term persistence of HBV DNA in the liver of individuals who test negative for the hepatitis B surface antigen (HBsAg) using the currently available assays. This study aimed to evaluate genotype, subgenotype and subtype profiles of HBVs obtained from patients with OBI.

Material and Method: The study included 32 patients with OBI who were diagnosed with HBV DNA by Nested PCR method in liver biopsy samples of patients who underwent liver parenchymal biopsy due to HBsAg negative different clinic indications and 17 chronic hepatitis B patients. The MHR region of the HBV S gene was amplified using nested PCR. Sanger sequencing method was used to determine the genotype, subgenotypes and subtype/serotype of HBV.

Results: In this study it was determined that the genotypes of all HBVs isolated from OBI and chronic hepatitis B patients were HBV/D, subgenotypes were respectively HBV/ D1 (75.5%), HBV/ D2 (6.1%) and HBV/D3 (18.4%), serotypes were respectively ayw2 (73.5%) and ayw3 (26.5%). Although the subgenotype of 28.1% of patients with OBI was determined as HBV/D3, none of the chronic hepatitis B patients had the HBV/D3 subgenotype.

Conclusion: The potential effects of subgenotype HBV/D3 on the dynamics of viral biogenesis may be associated with OBI,

İletişim kurulacak yazar/Corresponding author: bulentcakal@yahoo.com

Başvuru/Submitted: 04.08.2020 • **Revizyon Talebi/Revision Requested:** 15.10.2020 •

Son Revizyon/Last Revision Received: 30.10.2020 • **Kabul/Accepted:** 04.11.2020 • **Online Yayın/Published Online:** 12.07.2021



Content of this journal is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

yetkinliği ile karakterize OBI ile ilişkili olabilir.

Anahtar Kelimeler: OBI, Genetik varyasyon, Genotip, Subgenotip, HBsAg Subtipleri, Hepatit B virüsü

characterized by low replication competence and HBsAg negativity.

Keywords: OBI, Genetic diversity, Genotypes, Subgenotypes, HBsAg Subtypes, Hepatitis B virus

GİRİŞ

HBV enfeksiyonları HBsAg içeren immünizasyon yolu ile genellikle önlenemez olmasına karşın, nihai kürene yönelik anti-viral tedavi olanakları olmaması nedeniyle, tüm dünyada önemli bir halk sağlığı problemi olmaya devam etmektedir (1). OBI enfekte hepatositlerinin nükleusunda kromatize serbest epizomal formda kovalent bağlarla bağlı kapalı DNA halkasının (covalently closed circular DNA; cccDNA) persistan varlığı ve düşük düzeyde replikasyon yetkinliği ile karakterize olup, mevcut ulaşılabılır testler ile HBsAg negatif tespit edilen bireylerin karaciğer dokusunda ve/veya kanında HBV DNA'nın varlığı olarak tanımlanır (2).

OBI klinik açıdan; okült virüsün kan transfüzyonu, doğum (perinatal bulaş), hemodiyaliz ve ortotopik karaciğer gibi organ nakli yolu ile bulaşını takiben alıcıda tipik yeni HBV enfeksiyonuna neden olabilmesi, immünoşüpresyon koşullarında OBI reaktivasyonu ve takiben HBV ilişkili (akut ve fulminan hepatit) karaciğer hastalıkları, özellikle kronik C hepatitli hastalarda karaciğer hastalığının progresyonu üzerine olası etkileri ve hepatokarsinogenez sürecindeki rolü yönüyle önem taşımaktadır (3-5).

OBI virüse ve enfekte konağa ait faktörler ile çevresel faktörlerin zemininde gelişen genetik, epigenetik ve immünolojik mekanizmaların karşılıklı etkileşimi ile şekillenen, kronik HBV enfeksiyonunun doğal seyri içerisinde muhtemelen safhalarından biri olarak değerlendirilmesine karşın, HBV enfeksiyonunun bu özgün formuna neden olan mekanizmalar henüz tam olarak belirlenememiştir (6). Bununla birlikte OBI vakaların bir kısmında viral yüzey ve polimeraz genlerinde meydana gelen mutasyonlar sonucu sırasıyla yüzey kaçış mutasyonları ve replikasyon defekti ile HBV replikasyonu ve gen ekspresyonunun güçlü bir şekilde süpresyonuna neden olabilen konak immün denetim mekanizmalarındaki aksaklıklar ve viral biosentezin regülasyonunda rol alan epigenetik mekanizmaları içeren konak faktörleri ile ilişkilendirilmektedir (7, 8).

Ayrıca gerek güvensiz cinsel temas gerekse damar içi uyandırıcı kullanımı ve madde bağımlılığı gibi sosyal davranışlar sonucu oluşabilen re-enfeksiyon ve viral re-kombinasyonlar da farklı ve/ya yeni subgenotip ve viral mutasyonların oluşmasına imkan tanıyarak hem aşikar HBV hem de OBI enfeksiyonu oluşmasına neden olabilen önemli risk faktörleridir (9, 10).

HBV genomu kısmen birbiri ile örtüşen sırasıyla yüzey (PreS/S), kor (PreC/C) polimeraz (P) ve X'den oluşan 4

adet açık okuma çerçevesi (open-reading frames; ORF) içerir. PreS/S ORF viral yüzey proteininin yapısına katılan alternatif başlangıç kodonları PreS1, PreS2 ve PreS tarafından sentezlenen aminoasit (aa) boyutlarına göre sırasıyla büyük (Large, LHBs) orta (Middle, MHBs) ve küçük (Small, SHBs; HBsAg) olarak adlandırılan üç viral yüzey proteinini kodlar (11). HBsAg, HBV enfeksiyon tanısı, anti-HBV tedavi takibi ve kan donörlerinin taramasında kullanılan elzem bir serolojik markerdir. HBsAg immünojen özelliğe sahip en az 3 hidrofilik ve 2 hidrofobik domain içeren 226 aa'lık bir proteindir. 2. hidrofilik bölgede yer alan 99-169 aa'leri arasındaki majör hidrofilik bölgenin (MHR) içerisinde disülfid köprüleri ile bağlı 5 sistein residüsünden oluşan ve 124-147 aa'ler arasında yer alan "a" determinanı HBsAg'nin konfirmasyonundan ve kararlılığından sorumlu olması yanında immünojenitesi nedeniyle de HBsAg'ne spesifik antikolar ve immün hücreler için en kritik tanıma bölgesi olup, 124-137 ile 139-147 aa rezidüleri arasında disülfid bağları ile oluşturulan iki adet halka içerir. HBsAg'nin 'a' determinantının üçüncül yapısının belirlenmesinde kritik öneme sahip aa rezidülerinde meydana gelen varyasyonlar/mutasyonlar, viral yüzey proteinin antijenik konformasyonu ve immünojenik epitoplarında değişimlere neden olarak, HBsAg'nin serolojik tanısında, aşılama, hepatit B immünglobin tedavisi, anti-viral tedavide başarısızlık, OBI ile ilişkili olabilmektedir (12-15).

HBV gerek özgün biyogenezi gerekse bireysel ve popülasyon düzeyindeki konak faktörleri etkisi altında dinamik bir viral çeşitlik sergiler. Viral genom düzeyindeki varyasyonlar, gerek viral biyogenezin dinamiği gerekse kronik hepatit B hastalığının doğal seyri, progresyonu ve tedavi yanıtları üzerinde belirleyici etkinliğe sahiptir (16).

Bu çalışmada HBsAg seronegatif ve farklı klinik endikasyonlar nedeniyle karaciğer biyopsi işlemi gerçekleştirilen, biyopsi örneklerinde HBV DNA varlığı saptanarak OBI tanımlanan hastalardan izole edilen HBV izolatlarının genotip, subgenotip ve subtiplerinin belirlenerek OBI ile ilişkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hastalar: Bu çalışmaya Ocak 2017 ile Ekim 2019 tarihleri arasında İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Gastroenterohepatoloji kliniği tarafından kronik hepatit C'li hastalar ile farklı klinik endikasyonlar nedeniyle (Tablo 2), karaciğer parankim biyopsisi gerçekleştirilen 142 hastanın karaciğer biyopsi örneklerinde Nested PCR yöntemiyle HBV DNA varlığı tanımlanarak, OBI tespit edilen 36

(%25,3) hastadan HBV MHR gen bölgesinin amplifikasyonu gerçekleştirilmiş 32 hasta ile kronik hepatit B hastalığı nedeniyle takip edilen, histolojik tanı ve anti-viral tedavi planlaması ve/vaya değerlendirilmesi amacıyla karaciğer parankim biyopsisi işlemi planlanan 17 hasta dahil edildi. Kronik Hepatit C'li hastalar haricinde, çalışmaya dahil edilen hastaların anti-HCV ve anti- human immunodeficiency virus (HIV) antikörleri negatif serolojideydi.

Klinik materyal: Çalışma kapsamında klinik materyal olarak, karaciğer biyopsi örnekleri ile eş zamanlı alınan kan (serum) örnekleri kullanıldı. Karaciğer biyopsi işlemleri İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları AD'nin Gastroenterohepatoloji bilim dalı ve Radyoloji AD girişimsel radyoloji birimlerinde gerçekleştirilmiştir.

Örnek alma ve saklama koşulları

Karaciğer biyopsi örnekleri: Karaciğer biyopsi işlemleri radyolojik görüntüleme (ultrason) eşliğinde perkutan iğne biyopsi yöntemi ile manuel (Menghini; 17-gauge, Hepafix®, B. Braun Melsungen AG 34209) ve/ya otomatik kesici iğneler (TruCut; 18-gauge, Bard MaxCore, Covington, GA) kullanılarak, sırasıyla İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları AD'nin Gastroenterohepatoloji Bilim Dalı

Kliniği ve Radyoloji AD girişimsel radyoloji birimlerinde gerçekleştirildi. Karaciğer biyopsi örnekleri alınır alınmaz sıvı nitrojenle fresh frozen olarak fikse edilerek kriyopresipitasyonu gerçekleştirilerek ve Nested PCR analizleri yapılabildiği kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir.

Serum örnekleri: Biyopsi örnekleri ile eş zamanlı ve normal kan alma (venöz) prosedürü uyarınca uygun tüplere alınan hasta kan örnekleri santrifüj edilerek serumları ayrıldıktan sonra steril ependorf tüplere transfer edilerek laboratuvar çalışmaları için -80°C'de muhafaza edilmiştir.

Karaciğer dokusundan HBV DNA izolasyonu: Karaciğer biyopsi örneklerinden ticari bir kit (QIAamp DNA Mini kit, Qiagen GmbH, Hilden, Germany) kullanılarak total DNA izolasyonu sonrası viral genomun en az iki farklı bölgesinin Nested PCR yöntemi ile gösterilmesi ile OBI tanımlanan 36 hastaya ait DNA örnekleri sekans analizleri için -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Nested PCR: Bu çalışmada OBI'li hastalara ait HBV genomlarından HBSAg'nin immün epitoplarını içeren 99 ve 170 aa arasında yer alan MHR bölgesinin amplifikasyonu hedef bölgeye özgü tasarlanan primerler (Tablo 1) kullanılarak Nested PCR yöntemi ile çoğaltıldı. Nested PCR'ın ilk aşaması için 5µl HBV DNA ekstraktı, 25

Tablo 1: HBV Pre-S gen amplifikasyonu için kullanılan primerler

Nested I Primerler	Dizi (5'-3')	Polarite	Domain	Pozisyon
HBVSNIF1	GCCTCATTMTGTGGGTCACCATA	Sense	PreS	2801-2824
HBVSNIF2	AATCCAGATTGGGACTTCAA	Sense	PreS	2932-2951
HBVSNIF3	CCTGCTGGTGGCTCCAGTTCA	Sense	PreS	56-76
HBVSNIF4	CATGGAGAACATCACATCAGG	Sense	PreS	155-174
HBVSNIF5	TTGGCCAAAATTCGCAGTC	Sense	PreS	300-318
HBVSNIR1	GCTAGGAGTCCCGCAGTATGG	Antisense	PreS	1286-1266
HBVSNIR2	TTCCGCAGTATGGATCGGCAG	Antisense	PreS	1278-1258
HBVSNIR3	GGTTGCGTCAGCAAACACTTG	Antisense	PreS	1197-1177
HBVSNIR4	CGTTGACAGACTTTCCAATCAAT	Antisense	PreS	995-973
HBVSNIR5	CAGACTTTCCAATCAATAGG	Antisense	PreS	989-970
HBVSNIR6	AAATGGCACTAGTAAACTGAGCCA	Antisense	PreS	693-670
Nested II Primerler	Dizi (5'-3')	Polarite	Domain	Pozisyon
HBVSNIF1	CATGGAGAACATCACATCAGG	Sense	PreS	155-174
HBVSNIF2	GAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTC	Sense	PreS	246-269
HBVSNIF3	TCGTGGTGGACTTCTCTCAATT	Sense	PreS	257-278
HBVSNIF4	TTGGCCAAAATTCGCAGTC	Sense	PreS	300-318
HBVSNIF5	TGCTGCTATGCCTCATCTTC	Sense	PreS	414-433
HBVSNIR1	GGTTGCGTCAGCAAACACTTG	Antisense	PreS	1197-1177
HBVSNIR2	CGTTGACAGACTTTCCAATCAAT	Antisense	PreS	995-973
HBVSNIR3	CAGACTTTCCAATCAATAGG	Antisense	PreS	989-970
HBVSNIR4	AAATGGCACTAGTAAACTGAGCCA	Antisense	PreS	693-670

µl 2X PCR master mix (HS Prime Taq Premix; GeNet Bio) ve hedef bölgenin amplifikasyonuna yönelik dış primerleri (200 nm/µl) içeren 50 µl PCR reaksiyonu hazırlandı. Amplifikasyon 95°C'de 10 dak. başlangıç denatürasyonu sonrası sırasıyla 95°C'de 30 sn denatürasyon, 55-60°C'de 30 sn bağlanma, 72°C'de 45 sn uzatmayı içeren toplam 40 PCR döngüsünü takiben 72°C 10 dak. son uzatmayı içeren PCR koşullarında T100 Thermal Cycler (Bio-Rad) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Nested PCR'ın ikinci aşaması için 5µl ilk PCR ürünü, 25 µl 2X PCR master mix (ExPrime Taq premix; GeNet Bio) ve hedef bögeninin amplifikasyonuna yönelik iç primerleri (200 nm/µl) içeren 50 µl PCR reaksiyonu hazırlandı. Amplifikasyon 95°C'de 5 dak. başlangıç denatürasyonu sonrası sırasıyla 95°C'de 30 sn denatürasyon, 55-60°C'de 30 sn bağlanma, 72°C'de 45 sn uzatmayı içeren toplam 35 döngüyü takiben 72°C 10 dak. son uzatmayı içeren PCR koşullarında T100 Thermal Cycler (Bio-Rad) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Jel elektrofrez ve DNA saflaştırma: Elde edilen PCR ürünleri %2'lik agaroz içeren elektorefrez işleminden sonra, jel görüntüleme sistemi kullanılarak değerlendirildi. Hedef bölgeye spesifik ve istenilen boyutlardaki HBV DNA varlığı DNA boyutunun ölçümü için referans olarak kullanılan 100 bp'lik bir DNA belirteci (100bp DNA Marker; GeNet Bio) ile karşılaştırılması ile belirlendi. İstenilen uzunlukta bandlara sahip PCR ürünleri sekans işlemi öncesi E.Z.N.A.® Cycle Pure Kit (Omega) kullanılarak saflaştırılmıştır.

HBV DNA sekans: Purifiye edilen amplifikasyon ürünlerinin sekans işlemleri gerektiğinde çift yönlü olacak şekilde amplifikasyon primerleri kullanılarak, genetik analizatör (Becman Coulter CEQ 8000) aracılığıyla gerçekleştirilmiştir.

HBV genotip, subgenotip ve subtip analizi: Sekans işlemi sonrası elde edilen HBV PreS gene ait nükleotid dizilerinin Chromas programı kullanılarak düzenlendikten sonra confirmasyonu ve biyoinformatik analizleri NCBI websitesi (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) üzerinde gerçekleştirildi. Genotiplerin belirlenmesinde HBV S gen bölgesi ve HBV referans sekansları içeren NCBI websitesi (www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping) kullanıldı. Subgenotiplerin belirlenmesi HBV S gen ve polimeraz (pol) gen bölgelerinin dizi analizlerine (anti-viral direnç platformu) yönelik hazırlanan *HIV grade HBV Drug Resistance Interpretation and Geno2Pheno* biyoinformatik programı aracılığı ile gerçekleştirildi. HBV serotiplerinin belirlenmesi ise HBsAg'nin "a" determinantını kodlayan bölgede yer alan ve spesifik pozisyonları (a.a.122,160,127,159,140) ve antikor reaktiviteleri bilinen aminoasitler baz alınarak gerçekleştirildi. d/y varyasyonlarının ayırımı "a" determinantı içerisinde yer alan 122. pozisyonadaki aa'nin sırasıyla Lizin (Liz) veya Arginin (Arg)

varlığı, w/r varyasyonlarının ayırımı a' determinantı içerisinde yer 160 pozisyonadaki aa'nin sırasıyla Liz veya Arg varlığı baz alınarak gerçekleştirildi. HBsAg'nin "a" determinantını 122, 160, 127, 159 ve 140. aa sırasıyla Arg, Liz ve Prolin (Pro) harici, Alanin (Ala) harici ve Serin (Ser) harici aa içermesi ayw2 olarak, 122, 160 ve 127. aa sırasıyla Arg, Liz ve Tirozin (Thr) içermesi ise ayw3 olarak tanımlandı (17, 18).

Hastaların demografik, klinik ve histolojik verileri hasta dosyaları ve/veya gerektiğinde hastanenin elektronik kayıtlarından elde edildi (Tablo 1).

İstatistiksel analiz

İstatistiksel analizler SPSS (16.0 software, SPSS Inc., Chicago, IL) programı kullanılarak gerçekleştirildi. Veriler arasındaki kategorik değişkenlerin karşılaştırılmasında Ki-kare testi ve/ya Fisher testi, kategorik olmayan verilerin karşılaştırılmasında ise Mann-Whitney U ve One-Way ANOVA testleri kullanıldı. Sonuçlar ortalama ve standart sapmaları ile ifade edildi. p<0,05 değerleri istatistiksel olarak anlamlı farklılık olarak kabul edildi.

BULGULAR

Hastaların demografik, klinik ve histolojik özellikleri

Çalışmaya dahil edilen hastaların demografik, klinik ve histolojik verileri Tablo 2'de özetlenmiştir. Çalışmaya OBI tespit edilen 4'ü erkek 8'i kadın toplam 12 kronik hepatit C hastası ve 10'u erkek 10'u kadın toplam 20 kronik hepatit C dışı non-viral karaciğer hastalığı olan hasta ile 9'u erkek 8'i kadın toplam 17 kronik B hepatitli hasta dahil edilmiştir. Hastaların yukarıda belirtilen gruplara göre yaş ortalamaları sırasıyla 58,83±14,55 44,85±11 ve 42,75±13,44 olarak dağılım göstermekteydi. Kronik hepatit C'li hastaların yaş ortalaması hem kronik hepatit C dışı non-viral karaciğer hastalığı olan hastalardan hem de kronik B hepatitli hastaların yaş ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı farklılık içermekteydi (p<0,05) (Tablo 2).

OBI tanımlanan kronik hepatit C'li hastalar ile kontrol grubu olarak tanımlanan kronik hepatit B'li hastaların ortalama nekroenflamatuvar aktivite dereceleri sırasıyla 6,25±2,17 ve 3,94±2,7, fibrozis evre düzeyleri ise sırasıyla 2,58±1,16 ve 1,76±1,78 olarak tespit edilmiştir. Viral hepatit gruplarının nekroenflamatuvar aktivite dereceleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmesine (p=0,02) karşın fibrozis evre düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmemiştir (p=0,17) (Tablo 2).

HBV genotip ve subgenotip dağılımı: Bu çalışmada OBI ve kronik hepatit B hastalarından izole edilen HBV'lerin hepsinin (%100) genotipi D, majör genotip HBV/D1 ve majör serotip ise ayw2 olarak belirlenmiştir. Çalışmaya dahil edilen kontrol grubu dahil tüm hastaların 37'sinin (%75,5) HBV subgenotipi D1, 3'ünün (%6,1) HBV subgenotipi D2 ve 9'nun (%18,4) HBV subgenotipi ise D3 olarak

Tablo 2: Hastaların demografik, klinik ve histolojik özellikleri

Değişkenler	OBI (n=32)		Kronik hepatit B (n=17)	p
	Kronik hepatit C (n=12)	Viral hepatit dışı KC hastalığı (n=20)		
Yaş, Yıl (ort±SD)	58,8±14,5	44,8±11,1	42,7±1,4	<0,05*
Cinsiyet, n (E/K)	4/8	10/10	9/8	0,54
Biyopsi endikasyonu				
Kronik C hastalığı	12			
Metabolik karaciğer hastalığı*		8		
Nedeni bilinmeyen karaciğer enzim yüksekliği		5		
Kolestatik karaciğer hastalığı**		2		
Vasküler karaciğer hastalığı		2		
Siroz		1		
Otoimmün antikor yüksekliği		2		
Karaciğer Histopatoloji				
Nekroenflamatuvar aktivite (Grade), (ort±SD)	6,2±2,1		3,9±2,7	0,02
Fibrozis evre (Stage), (ort±SD)	2,5±1,1		1,7±1,7	0,17
Nonalkolik steatohepatit (NASH)***		7		
Nonalkolik karaciğer yağlanması (NAFLD)****		2		
Non-spesifik değişiklik*****		7		
Vasküler karaciğer hastalığı		2		
Toksik hepatit		1		
Siroz		1		

*Gruplar arasındaki yaş farkı istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$). Kronik hepatit C'li hastalar ve kronik hepatit C dışı non-viral karaciğer hastalığı olan hastalar ($p=0,03$), kronik hepatit C'li hastalar ve kronik B hepatitli hastalar ($p=0,018$); *Karaciğer yağlanması, Hemokromatozis, Wilson hastalığı, **Primer biliyer kolanjit (PBK), Primer sklerozan kolanjit (PSK), ***Nonalcoholic steatohepatitis, ****Nonalcoholic fatty liver disease, *****Histopatolojik tanıda; minimal portal ve lobüler enflamatuvar infiltrat, fibrosis yok, yapısal değişiklik yok

belirlenmiştir. OBI tespit edilen 32 hastanın ise 22'sinin (%68,8) HBV subgenotipi D1, 1'inin (%3,1) HBV subgenotipi D2 ve 9'nun (%28,1) ise HBV subgenotipi D3 olarak belirlenmiştir. OBI tespit edilen 12 kronik hepatit C hastasının 8'inin HBV subgenotipi D1, 4'ünün (%33,3) HBV subgenotipi D3 olarak belirlenmiş, bu grupta HBV subgenotip D2 tespit edilmemiştir. Non-viral karaciğer hastalığı olan ve OBI tanımlanan 20 hastanın 14'ünün (%70) HBV subgenotipi D1, 1'inin HBV subgenotipi D2 ve 5'inin ise (%25) HBV subgenotipi D3 olarak belirlenmiştir. OBI tespit edilen kronik hepatit C ve HCV dışı non-viral karaciğer hastalığı olan hastaların arasında HBV subgenotip dağılımları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilememiştir ($p=0,121$) (Tablo 3).

Kronik hepatit B'li hastaların 15'inin (%88,2) HBV subgenotipi D1, 2'sinin (%11,8) HBV subgenotipi D2 olarak belirlenmiştir. Buna karşın bu grupta HBV subgenotip D3, tespit edilememiştir. Bu çalışmada, OBI ve kronik hepatit B hastalarından izole edilen HBV'lerin subgenotip dağı-

lımları ve sıklığı arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($p=0,035$) (Tablo 3). HBV D/D3 subgenotip OBI'li hastaların %28,1'de saptanmasına karşın kronik hepatit B hastalarının hiç birinde saptanmamıştır.

HBV'lerin subtip/serotip prevalansı: Bu çalışmada HBsAg'nin "a" determinantını kodlayan bölge üzerindeki spesifik pozisyonları bilinen aminoasitlerin (a.a.122,160,127,159,140) varlığı baz alınarak gerçekleştirilen analizlerde tüm hastalardan (49) izole edilen HBV D genotip ilişkili serotipler ayw2 ve ayw3 olarak belirlendi. Bu çalışmaya dahil edilen 49 hastanın 36'sinin (%73,5) HBV serotipi ayw2, 13'nün (%26,5) serotipi ise ayw3 olarak belirlenmiştir (Tablo 3).

OBI'li hastalardan izole edilen 22 HBV D/D1 genotip/subgenotipin tamamının serotipi ayw2, 1 HBV D/D2 genotip/subgenotipin serotipi ayw3, 9 HBV D/D3 genotip/subgenotipin tamamının serotipi de ayw3 olarak belirlenmiştir. OBI tespit edilen kronik hepatit C ve viral hepatit dışı kara-

Tablo 3: OBI ve Kr. hepatit B hastalarının genotip, subgenotip ile serotip dağılımı

HBV/D Subgenotipler	OBI (n=32)		Kronik hepatit B (n=17) n (%)	Total (n=49) n (%)	P	Serotip	OBI (n=32)		Kronik hepatit B (n=17)	Total (n=49) n (%)	P
	HCV (n=12) n (%)	Viral hepatit dışı KC hastalığı (n=20) n (%)					HCV (n=12)	Viral hepatit dışı KC hastalığı (n=20)			
D1	8 (66,7)	14 (70)	15 (88,2)	37 (75,5)	0,121 ^a	ayw2	8	14	14	36 (97,3)	0,305 ^c
						ayw3	0	0	1	1 (2,7)	
D2	0	1, (5)	2 (11,8)	3 (6,1)		ayw2	0	0	0	0	
						ayw3	0	1	2	3 (100)	
D3	4 (33,3)	5 (25)	0	9 (18,4)		ayw2	0	0	0	0	
						ayw3	4	5	0	9 (100)	
Total	(12)	(20)	(17)	(49)	0,035 ^b	Total ayw2	(8)	(14)	(14)	36 (73,5)	0,578 ^d
						Total ayw3	(4)	(6)	(3)	13 (26,5)	

^aOBI'li hastalar arasında subgenotip dağılımı, ^bOBI ve Kronik hepatit B hastaları arasındaki subgenotip dağılımı

^cOBI'li hastalar arasında subtip/serotip dağılımı, ^dOBI ve Kronik hepatit B hastaları arasındaki subtip/serotip dağılımı

çiğer hastalığı olan hastaların arasında HBV subtiplerinin dağılımları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir (p>0,05) (Tablo 3).

Mevcut çalışmada, kronik hepatit B'li hastalardan izole edilen 15 HBV D/D1 genotip/subgenotipin 14'nün serotipi ayw2, 1'nin serotipi ise ayw3, 2 HBV D/D2 genotip/subgenotipin 2'sinin de serotipi ayw3 olarak belirlenmiştir. OBI'li 32 hastadan izole edilen HBV D genotiplerinin 10'nun (%32,3) serotipi ayw3 olmasına karşın 17 kronik hepatit B hastasından izole edilen HBV D genotiplerinin yalnızca 3'nün (%17,6) serotipi ayw3 olarak belirlenmiştir. Buna karşın OBI ve kronik hepatit B hastalarından izole edilen HBV'lerin subtip dağılımları ve sıklığı arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilememiştir (p=0,305) (Tablo 3).

TARTIŞMA

HBV genomunda evrimsel süreç içerisinde konak hücre faktörleri ve çevresel faktörlerin etkisiyle meydana gelen varyasyonları yansıtan genotip ve subgenotiplerin viral biyogenez üzerindeki potansiyel virolojik etkileri, enfeksiyonun doğal seyri ve klinik sonuçları üzerinde de etkili olabilmektedir (19, 20). *Hepadnaviridae* ailesi Orthohepadnavirus cinsi içerisinde sınıflandırılan insan hepatitis B virüsü, tüm genom düzeyinde nükleotid farklılığı >%7,5 olan, 9 konfirme genotip (A-I), henüz konfirme edilmemiş bir genotip (J), her bir genotip de kendi

arasında nükleotid farklılığı yaklaşık %4-8 olan ve spesifik coğrafik dağılımları olan 35'den fazla alt genotip içerir. Buna karşın özellikle HBV subgenotiplerinin nihai tanı ve sınıflandırılmasına dair henüz net bir standardizasyon yoktur. HBV genotip D Güney Amerika hariç tüm dünyada yaygın olmasına karşın özellikle Akdeniz kuşağı, Orta Doğu, Afrika ve Hindistanda daha yüksek yayılım gösterir. HBV genotip D, D1-D6 olarak adlandırılan altı subgenotip içerir. HBV subgenotip D1 daha çok Orta Doğu ve Orta Asyada; D2, Avrupa ve Lübnanda; D3 tüm Dünyada; D4 Pasifik adaları ve arktrik toplumlarda; D5 Hindistanda; D6 Afrika bölgesinde yayılım gösterir (21).

HBV Avustralya antijeni ilk defa Blumberg tarafından HBsAg'nin immünolojik epitoplarını içeren bir bölge olarak tanımlandıktan sonra, sırasıyla 'a' determinantı içerisinde yer alan 122, 160, 127, 159, 140. pozisyonlarındaki a.a.'lerin allel varyasyonları (d/y ve w/r) ve spesifik antikor reaksiyonları baz alınarak 9 immünolojik subtipi (ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adw2, adw4, adwq, adr, ve adrq) tanımlanmıştır (22, 23). HBV genotip D ayw2 ve ayw3 ile bu genotipler için nadir gözlemlenen ayw4 ve adw3 olarak tanımlanan dört serotip içerir (17-19).

Bu çalışmada OBI ve kronik hepatit B hastalarından izole edilen HBV'lerin tümünün genotipi D, subgenotipleri dağılım sıklığına göre sırasıyla HBV/D1 (%75,5), HBV/D3 (%18,4) ve HBV/D2 (%6,1), serotiplerin dağılımı ise sıklığına göre sırasıyla ayw2 (%73,5) ve ayw3 (%26,5) olarak

belirlenmiştir. Çalışmada özetle, HBV D genotipi ile enfekte hastaların büyük çoğunluğunun subgenotipi HBV/D1, serotipi ise ayw2 olarak tespit edilmiştir. Çalışmanın yapıldığı coğrafik bölge uyarınca HBV genotip, subgenotip ve subtiplerine ilişkin elde edilen verilerin öngörülebilir olduğu anlaşılmaktadır.

Çalışma kapsamında OBI tespit edilen 22 hastanın 9'nun (%28,1) subgenotipi HBV/D3 olarak belirlenmesine karşın kronik hepatit B hastalarının hiç birinde HBV/D3 subgenotipi saptanmamıştır ($p=0,035$). Dolayısıyla bu çalışmada OBI ve kronik hepatit B hastalarından izole edilen HBV'lerin subgenotip dağılımları ve sıklığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir (Tablo 3).

HBV'nin kompleks genom organizasyonu ile genlerin kodlanan ve düzenleyici bölgelerinde meydana gelen mutasyonlar viral dinamiği şekillendirebilmektedir. OBI'li bireylerde S gen varyasyonları aşikar enfeksiyonlu bireylere göre daha sıktır (24). HBV polimeraz enziminin RT domaini, 3.5-kb'lik pregenomik RNA'yı infeksiyöz Dane partiküllerinde bulunan yaklaşık 3.2 kb'lik kısmı (parsiyel) çift iplikli HBV genomuna dönüşümünü katalize etmesi nedeniyle viral replikasyon döngüsü için kritik öneme sahiptir (25). HBV genomunda yer alan genlerin çakışması virüse son derece efektif bir genomik organizasyon imkanı tanınmasına karşın bu özgün yapının istenmeyen olumsuz etkileri de olabilmektedir. Örneğin HBV S geninin RNA bağımlı DNA polimeraz/revers transkriptaz (P/RT) enzimini kodlayan polimeraz geni ile veya tersine P geninin S geni ile örtüştüğü bölgelerde meydana gelen mutasyonlar, viral replikasyon kapasitesi ve HBsAg yapısında değişimlere neden olarak, sırasıyla serum HBV DNA düzeylerinde azalma ve HBsAg sentezinin azalması ve/ya sekresyonunun bozulmasına neden olabildiği bunun da HBsAg negatifliği ve düşük replikasyon varlığı ile karakterize OBI ile ilişkili olabileceği ifade edilmektedir (26-29).

HBV/D'nin çoklu coğrafik yayılım ve yüksek heterojenite içeren genotiplerden biri olması, daha yüksek oranda S gen mutasyon/varyasyon içermesi, HBV/D3'ün OBI'li bireylerde diğer subgenotiplere oranla daha fazla varyasyon içerdiği, kronik hepatit B hastaları arasında ise diğer subgenotiplere oranla daha az HBV DNA yükü, daha yavaş hastalık progresyonu ve daha düşük onkojenik potansiyel ile daha düşük replikasyon kapasitesi ile karakterize olduğu yönündeki veriler bu yaklaşımı destekler niteliktedir (30-32). HBV/D3 subgenotopinin bazı coğrafik bölgelerde HBsAg seronegatif kan donörleri ile OBI için risk faktörü olarak kabul edilen damar içi uyuşturucu kullananlar ve madde bağımlıları ile HIV ile ko-enfekte OBI vakalarında daha sık tespit edildiğine dair veriler de HBV/D3'ün OBI ile ilişkili olabileceğine işaret etmektedir (33). Kan donörlerinin %2,96'sının OBI olarak tanımlandığı bir çalışmada; OBI'li vakaların %87'si HBV/D genotipi, HB-

V/D genotipi ile ilişkili subgenotipler HBV/D1, HBV/D2 ve HBV/D3 sırasıyla %7, %26 ve %65 oranında, tüm HBV/D1 izolatlarının serotipi ayw2, biri hariç tüm HBV/D2 izolatlarının serotipi ayw3 ve tüm HBV/D3 izolatlarının serotipi de ayw3 olarak belirlenmiş ve HBV/D3 subgenotiplerinin OBI ile ilişkili olabileceği ifade edilmiştir (34).

Subgenotip HBV/D3 ile enfekte bireylerin demografik özellikleri nedeniyle potansiyel olarak immünsüpresyona ve çoklu viral enfeksiyonlara yatkın olmaları, anti-HBV immün denetim mekanizmalarındaki aksaklıklar ile ilişkili OBI oluşmasında, re-enfeksiyonlara açık olmaları ise viral genomda çoklu varyasyonların birikmesine ve bu varyasyonların neden olabildiği HBsAg sentezi ve viral replikasyon kapasitenin azalması ile ilişkili OBI oluşmasında rol alabileceği, nihayetinde subgenotip HBV/D3'ün OBI için predispozan bir faktör olabileceği öngörülebilir. Dolayısıyla bu çalışmadan elde edilen veriler subgenotip HBV/D3'ün HBsAg negatifliği, persistan ve düşük replikasyon yetkinliği ile karakterize olan ve ayrıca konak immün denetim mekanizmalarındaki aksaklıkların neden olabildiği OBI ile ilişkili olabileceğini destekler niteliktedir.

Bu çalışmada subgenotip HBV/D1 ile ilişkili serotipler ayw2 ve ayw3 sırasıyla %97,3 ve %2,7, HBV/D2 ile ilişkili serotip ayw3 %100, HBV/D3 ile ilişkili serotip ayw3 %100 oranında tespit edilmiştir. Serotipi ayw3 olarak tanımlanan 13 (%26,5) HBV izolatının 10'nu (%76,9) OBI, 3'ü (%23,1) ise kronik hepatit B tanıli hastalardan izole edilmiştir. Gerek hasta grupları ($p=0,578$) gerekse OBI ve kronik hepatit B hastalar arasında serotip dağılımları ($p=0,305$) açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktu. HBV serotip ayw3 sıklıkla HBV/D2 ve HBD/D3'e spesifiktir (35). Bu çalışmadan HBV serotip dağılımına ilişkin elde edilen verilerin, gerek coğrafik gerekse HBV genotip ve subtipleri ile uyumlu olduğu anlaşılmaktadır.

HBV serotip ayw3 ayw1, ayw2 ve ayw4'den farklı olarak HBsAg 'a' determinant bölgesinde yer alan 127. aa pozisyonunda Tirozin (Thr) içerir. 127Thr varyasyonunun HBsAg'nin antijenitesinde azalmaya neden olarak, serolojik tanı amacıyla kullanılan anti-HBs antikorlarına karşı reaktivitesinde azalma ile ilişkili olabileceği dolayısıyla serolojik tanı amacıyla kullanılan testlerin duyarlılığını olumsuz yönde etkileyebileceği bildirilmiştir (35). Bu çalışmada serotip ayw3 olarak tanımlanan 10 OBI'li hastanın hiçbirinde serum HBV DNA saptanmamıştır. Dolayısıyla bu çalışmadan elde edilen veriler uyarınca HBV serotipleri ile OBI arasında direkt bir ilişkili olmadığı öngörülebilir.

Kontrol grubu olarak çalışılan kronik hepatit B hasta sayısının az olması ile kronik C hepatitli hastalar dışındaki non-viral karaciğer hastalığı grubunun homojen bir grup olmaması ve gruptaki hasta sayılarının kısmi yetersiz olması da bu çalışmayı sınırlandıran faktörlerdir. Bu açıdan HBV/D3'ün OBI patogenezini üzerindeki rolünün moleküler

ler düzeyde aydınlatılması amacıyla genom düzeyinde ileri sekans analizleri ve fonksiyonel virolojik deneylerin yapılması gerekli ve yararlı olacaktır.

Sonuç olarak konak ve popülasyon dinamiği ile ilişkili faktörlerin baskısı altında farklılaşan subgenotip HBV/D3'ün OBI patogenezinde potansiyel rolü olabileceği öngörülebilmektedir.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik komite onayı İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan alınmıştır (Tarih: 2015, No: 1519).

Bilgilendirilmiş Onam: Katılımcılardan bilgilendirilmiş onam alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Çalışma Konsepti/Tasarım- B.Ç., F.A.; Veri Toplama- B.Ç., A.A., B.Ç., M.B., A.Ö.; Veri Analizi/Yorumlama- B.Ç., F.A., M.G.; Yazı Taslağı- B.Ç.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- F.A.; Son Onay ve Sorumluluk- B.Ç., A.A., B.Ç., A.Ö., M.P., M.G., M.B., M.G.G., F.A.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri kapsamında desteklenmiştir (Proje No: THZ-2018-26422).

Teşekkür: İstanbul Tıp Fakültesi Gastroenterohepatoloji Bilim Dalında görevli Sayın Hemşire Nilay Arabacı ve Sayın Hemşire Derya Kaya ile İstanbul Tıp Fakültesi Radyoloji Anabilim Dalı Girişimsel Radyoloji Birimi'nde görevli Sayın Hemşire Arzu Örentel'e projenin gerçekleştirilmesi aşamasındaki bilimsel duyarlılıkları, katkıları ve emeklerinden dolayı şükranlarımızı sunarım.

Ethics Committee Approval: This study was approved by the Ethical Committee of the Istanbul University, Istanbul Faculty of Medicine (Date: 2015, No: 1519).

Informed Consent: Written consent was obtained from the participants.

Peer Review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Conception/Design of Study- B.Ç., F.A.; Data Acquisition- B.Ç., A.A., B.Ç., M.B., A.Ö.; Data Analysis/Interpretation- B.Ç., F.A., M.G.; Drafting Manuscript- B.Ç.; Critical Revision of Manuscript- F.A.; Final Approval and Accountability- B.Ç., A.A., B.Ç., A.Ö., M.P., M.G., M.B., M.G.G., F.A.

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

Financial Disclosure: This study was supported by Istanbul University Scientific Research Projects (Project No: THZ-2018-26422)

Acknowledgement: Authors sincerely thank to nurses Nilay Arabacı and Derya Kaya, who are working at Istanbul University, Istanbul Faculty of Medicine Division of Gastroenterohepatology

and Arzu Örentel who is working at Istanbul University, Istanbul Faculty of Medicine, Department of Radiology for their contributions and efforts in this project.

KAYNAKLAR/REFERENCES

1. Revill PA, Chisari FV, Block JM, Dandri M, Gehring AJ, Guo H, et al. Lancet Gastroenterol. Hepatol 2019;4:545-58.
2. Raimondo G, Locarnini S, Pollicino T, Levvero M, Zoulim F, Lok AS, and the Taormina Workshop on Occult HBV Infection Faculty Members. Update of the statements on biology and clinical impact of occult hepatitis B virus infection. J Hepatol 2019;71(2):397-408. [CrossRef]
3. Raimondo G, Allain JP, Brunetto MR, Buendia MA, Chen DS, Colombo M, et al. Statements from the Taormina expert meeting on occult hepatitis B virus infection. J Hepatol 2008;49:652-7. [CrossRef]
4. Torbenson M, Thomas DL. Occult hepatitis B. Lancet Infect Dis 2002;2:479-86. [CrossRef]
5. Chemin I, Trepo C. Clinical impact of occult HBV infections. J Clin Virol 2005;34:15-21. [CrossRef]
6. Pondé RAA. Molecular mechanisms underlying HBsAg negativity in occult HBV infection. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2015;34:1709-31. [CrossRef]
7. Pollicino T, Raimondo G. Occult Hepatitis B Infection. Journal of Hepatology 2014;61:688-9. [CrossRef]
8. Raimondo G, Caccamo G, Filomia R, Pollicino T. Occult HBV infection. Semin Immunopathol 2013;35:39-52. [CrossRef]
9. Lugoboni F, Quaglio G, Civitelli P, Mezzelani P. Bloodborne viral hepatitis infections among drug users: the role of vaccination. Int J Environ Res Public Health 2009;6(1):400-13. [CrossRef]
10. Chen BF, Chen PJ, Jow GM, Sablon E, Liu CJ, Chen DS, et al. High prevalence of mixed genotype infections in hepatitis B virus infected intravenous drug users. J Med Virol 2004;74(4):536-42. [CrossRef]
11. Locarnini S, Zoulim F. Molecular genetics of HBV infection Antivir Ther 2010;3:3-14. [CrossRef]
12. Seddigh-Tonekaboni S, Waters JA, Jeffers S, Gehrke R, Ofenloch B, Horsch A, et al. Effect of variation in the common "a" determinant on the antigenicity of hepatitis B surface antigen. J Med Virol 2000;60:113-21. [CrossRef]
13. Waters J, Kennedy M, Voet P, Hauser P, Petre J, Carman W, et al. Loss of the common 'a' determinant of hepatitis B surface antigen by a vaccine-induced escape mutant. J Clin Invest 1992;90:2543-47. [CrossRef]
14. Osiowy C. Detection of HBsAg mutants. J Med Virol 2006;78:48-51. [CrossRef]
15. Huang CH, Yuan Q, Chen PJ, Zhang YL, Chen CR, Zheng QB, et al. Influence of mutations in hepatitis B virus surface protein on viral antigenicity and phenotype in occult HBV strains from blood donors. Journal of Hepatology 2012;57:720-9. [CrossRef]
16. McMahon, BJ. The influence of hepatitis B virus genotype and subgenotype on the natural history of chronic hepatitis B Hepatol Int 2009;3:334-42. [CrossRef]
17. Purdy MA, Talekar G, Swenson P, Araujo A, Fields H. A New Algorithm for Deduction of Hepatitis B Surface Antigen Subtype Determinants from the Amino Acid Sequence. Intervirology 2007;50:45-51. [CrossRef]

18. Norder H, Couroucé AM, Coursaget P, Echevarria JM, Lee SD, Mushahwar IK, et al. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: Genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology* 2004;47:289-309. [\[CrossRef\]](#)
19. Kramvis A. Genotypes and Genetic Variability of Hepatitis B Virus. *Intervirology* 2014;57(3-4):141-50. [\[CrossRef\]](#)
20. Zhang ZH, Wu CC, Chen XW, Li X, Li J, Lu MJ. Genetic variation of hepatitis B virus and its significance for pathogenesis. *World J Gastroenterol* 2016;22(1):126-44. [\[CrossRef\]](#)
21. Revill PA, Tu T, Netter HJ, Yuen LKW, Locarnini SA, Littlejohn M. The evolution and clinical impact of hepatitis B virus genome diversity. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 2020. [\[CrossRef\]](#)
22. Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S. A new antigen in leukemia sera. *JAMA* 1965;191:541. [\[CrossRef\]](#)
23. Bancroft WH, Mundon FK, Russell PK. Detection of additional antigenic determinants of hepatitis B antigen. *J Immunol* 1972;109: 842-8.
24. Weinberger KM, Bauer T, Bohm S, Jilg W. High genetic variability of the group-specific a-determinant of hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) and the corresponding fragment of the viral polymerase in chronic virus carriers lacking detectable HBsAg in serum. *J Gen Virol* 2000;81:1165-74. [\[CrossRef\]](#)
25. Raney AK, Johnson JL, Palmer CNA, McLachlan A. Members of the nuclear receptor superfamily regulate transcription from the hepatitis B virus nucleocapsid promoter. *J Virol* 1997;71:1058-71. [\[CrossRef\]](#)
26. Pollicino T, Cacciola I, Saffioti F, Raimondo G. Hepatitis B virus PreS/S gene variants: Pathobiology and clinical implications. *Journal of Hepatology* 2014;61:408-17. [\[CrossRef\]](#)
27. Sheldon J, Rode's B, Zoulim F, Bartholomeusz A, Soriano V. Mutations affecting the replication capacity of the hepatitis B virus. *Journal of Viral Hepatitis* 2006;13:427-34. [\[CrossRef\]](#)
28. Mirabelli C, Surdo M, Hemert F-V, Lian Z, Salpini R, Cento V. Specific mutations in the C-terminus domain of HBV surface antigen significantly correlate with low level of serum HBV-DNA in patients with chronic HBV infection. *Journal of Infection* 2015;70:288e298. [\[CrossRef\]](#)
29. Huang X, Qin Y, Li W, Shi Q, Xue Y, Li J, et al. Molecular analysis of the hepatitis B virus presurface and surface gene in patients from eastern China with occult hepatitis B. *J Med Virol* 2013;85:979-86. [\[CrossRef\]](#)
30. Chandra PK, Biswas A, Datta S, Banerjee A, Panigrahi R, Chakrabarti S. et al. Subgenotypes of hepatitis B virus genotype D (D1, D2, D3 and D5) in India: differential pattern of mutations, liver injury and occult HBV infection. *J Viral Hepat* 2009;16:749-56. [\[CrossRef\]](#)
31. Datta S, Dasgupta D, Ghosh A, Ghosh S, Manna A, Datta S. Oncogenic potential of hepatitis B virus subgenotype D1 surpasses D3: significance in the development of hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 2018;39:283-92. [\[CrossRef\]](#)
32. Khatun M, Mondal RK, Pal S, Baidya A, Bishnu D, Banerjee P, et al. Distinctiveness in virological features and pathogenic potentials of subgenotypes D1, D2, D3 and D5 of Hepatitis B virus. *Sci Rep* 2018;23;8(1):8055. [\[CrossRef\]](#)
33. Alestig E, Söderström A, Norkrans G, Lindh M. Genetic Diversity of Genotype D3 in Acute Hepatitis B. *J Med Virol* 2013;85(7):1148-54. [\[CrossRef\]](#)
34. Biswas A, Panigrahi R, Chandra PK, Banerjee A, Datta S, Pal M. Characterization of the Occult Hepatitis B Virus Variants Circulating among the Blood Donors from Eastern India. *ScientificWorld Journal* 2014;4:212704.
35. Scheiblaue H, El-Nageh M, Diaz S, Nick S, Zeichhardt H, Grunert HP, et al. Performance evaluation of 70 hepatitis B virus (HBV) surface antigen (HBsAg) assays from around the world by a geographically diverse panel with an array of HBV genotypes and HBsAg subtypes *Vox Sanguinis* 2010;98:403-14. [\[CrossRef\]](#)