

Kuzey Kıbrıs'ta Hepatit B Virusunun Moleküler Epidemiyolojisi

Molecular Epidemiology of Hepatitis B Virus in Northern Cyprus

Ayşe ARIKAN¹, Tamer ŞANLIDAĞ^{2,3}, Kaya SÜER¹, Murat SAYAN^{3,4}, Sinem AKÇALI², Emrah GÜLER¹

¹ Yakın Doğu Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Lefkoşa, KKTC.

¹ Near East University Medical Faculty Hospital, Microbiology Laboratory, Nicosia, TRNC.

² Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Manisa.

² Celal Bayar University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Manisa, Turkey.

³ Yakın Doğu Üniversitesi, Deneysel Sağlık Bilimleri Araştırma Merkezi, Lefkoşa, KKTC.

³ Near East University, Experimental Health Sciences Research Center, Nicosia, TRNC.

⁴ Kocaeli Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi, Merkez Laboratuvarı, PCR Birimi, Kocaeli.

⁴ Kocaeli University Research and Practice Hospital, Central Laboratory, PCR Unit, Kocaeli, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 21.07.2015 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 02.10.2015

ÖZ

Hepatit B virusu (HBV) enfeksiyonlarında etkin bir süreyans için, dolaşımdaki HBV suşlarının tanımlanması ve moleküler epidemiyolojik özelliklerinin bilinmesi önemlidir. Türkiye'de yapılan çalışmalarda, genotip D'nin baskın olduğu, ancak genotip A, E, G ve H ile enfekte olguların da bulunduğu bilinmektedir. Buna karşın Kuzey Kıbrıs'ta HBV'nin moleküler epidemiyolojik özellikleri ile ilgili veri bulunmamaktadır. Bu çalışmada, Kuzey Kıbrıs'ta yaşayan, okuyan ve çalışan kişilerde HBV genotip/alt genotip dağılımının belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya, Kasım 2011-Eylül 2014 tarihleri arasında Lefkoşa, Yakın Doğu Üniversitesi Hastanesi mikrobiyoloji laboratuvarına rutin kontrol ve kan merkezine donör tarama testleri için başvuran 13.892 kişiden, HBsAg pozitif bulunan 160 (%1.2) kişi dahil edilmiştir. HBsAg pozitifliği saptanan serum örneklerinde HBV-DNA düzeyi, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile araştırılmış ve HBV genotip/alt genotipleri, viral *pol* geninin (ters transkriptaz [*rt*] bölgesi, 80-250. aminoasitler arası) dizilenmesiyle belirlenmiştir. Altmış olgu (60/160, %37.5), negatif ya da çok düşük (< 30 IU/ml) viral yük nedeniyle dizilemeye alınmamış; 100 örneğe dizi analizi uygulanmıştır. Bu olguların (13 kadın, 87 erkek; yaş ortalaması: 35.51 ± 12.88 yıl) 96'sı anti-HBc IgG, 95'i anti-HBe ve beşi HBeAg pozitif olup, ortalama HBV-DNA düzeyleri $5.36 \times 10^6 \pm 3.58 \times 10^7$ IU/ml'dir. Analiz edilen örneklerin 32'sinde (%32), viral yük 1000 IU/ml eşliğinin altında olduğundan dizileme işlemi başarılı bulunmamış; sonuçta 68 (68/160, %42.5) örnek filogenetik olarak analiz edilmiştir. Buna göre HBV genotip/alt genotiplerinin dağılımı; 48'inin (%70.6) D/D1; dördünün (%5.9) D/D2; birinin (%1.5) D/D3, beşinin (%7.4) A/A1,

İletişim (Correspondence): Dr. Ayşe Arıkan, Yakın Doğu Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Lefkoşa, KKTC. **Tel (Phone):** +90 548 877 2020, **E-posta (E-mail):** aysearikanc@yahoo.com

ikisinin (%2.9) A/A2 ve sekizinin (%11.8) genotip E olduğunu ortaya koymuştur. En sık saptanan D1 suşlarından %60.4'ünün (29/48) Türkiye uyruklu; tek D/D3 suşunun Benguela (Angola) uyruklu; tüm sekiz genotip E suşunun da Nijerya uyruklu olgularda bulunduğu izlenmiştir. KKTC'de bu kapsamda yapılmış ilk çalışma olan araştırmamızın verilerine göre, Kuzey Kıbrıs bölgesinde HBV genotip D baskındır (53/68, %78) ve alt genotip dağılımı ile birlikte Türkiye ve Akdeniz havzası özelliği ile uyumlu görünmektedir. Genotip A (7/68, %10.3) ve E (8/68, %11.8) ise dikkat çekici prevalansa sahiptir. Bir ada ülkesi olmasına rağmen Kuzey Kıbrıs'ta HBV genotip/alt genotip dağılımının heterojen bir özellik göstermesi, birçok ülkeden buraya eğitim, çalışma ve turistik amaçla gelen farklı popülasyonlara ve adanın kozmopolit yapısına bağlanabilir.

Anahtar sözcükler: Hepatit B virusu; genotip; moleküler epidemiyoloji; Kuzey Kıbrıs.

ABSTRACT

Identification of hepatitis B virus (HBV) strains and understanding of molecular epidemiological characteristics are important for the effective surveillance of HBV infections. Genotype D is dominant in studies performed in Turkey but it is known that cases infected with genotypes A, E, G and H also exists. In contrast, there are no data regarding the molecular epidemiologic characteristics of the HBV in Northern Cyprus. The aim of this study was to determine the distribution of genotypes and subgenotypes of HBV among the people living, educating and working in Northern Cyprus. A total of 160 cases (1.2%) who were HBsAg seropositive out of 13.892 subjects admitted to Nicosia, Near East University Hospital microbiology laboratory for the routine control and to blood center for donor screening tests between November 2011 to September 2014, were included in the study. HBV-DNA levels in the HBsAg positive cases were detected by real-time polymerase chain reaction and genotypes/subgenotypes were determined by sequence analysis of the viral *pol* gene (reverse transcriptase [*rt*] region, between 80-250. aminoacids). Sixty samples (60/160, 37.5%) were excluded from sequencing analysis due to negative and/or very low (< 30 IU/ml) HBV-DNA levels, so 100 samples were included in sequence analysis. Ninety-six of those cases (13 female, 87 male; mean age: 35.51 ± 12.88 years) were anti-HBc IgG, 95 were anti-HBe and five were HBeAg positive, with a mean HBV-DNA level of $5.36 \times 10^6 \pm 3.58 \times 10^7$ IU/ml. As 32 (32%) samples yielded HBV-DNA level below the threshold of 1000 IU/ml, sequence analyses were unsuccessful, eventually 68 (68/160, 42.5%) samples could be phylogenetically analyzed. The distribution of HBV genotypes/subgenotypes were found as follows: 48 were (70.6%) D/D1; four were (5.9%) D/D2; one was (1.5%) D/D3, five were (7.4%) A/A1, two were (2.9%) A/A2 and eight were (11.8%) genotype E. Among the most frequent D1 strains, 60.4% (29/48) cases were from Turkish; single D/D3 strain from Benguela (Angola) and all eight genotype E strains were from Nigerian national cases. According to the data of this first study performed in TRNC on this subject, genotype D is dominant (53/68, 78%) in Northern Cyprus and consistent with the subgenotype distribution that is similar to Turkey and mediterranean basin. The prevalences of genotype A (7/68, 10.3%) and E (8/68, 11.8%) were also remarkable. In conclusion, although Northern Cyprus is an island country the heterogeneous distribution of HBV genotype/subgenotype may be contributed to the cosmopolitan characteristics of various populations from different countries who have come here for education, work or touristic purposes.

Keywords: Hepatitis B virus, genotype; molecular epidemiology; Northern Cyprus.

GİRİŞ

Hepatit B virusu (HBV), ters transkriptaz (RT) enziminin hata düzeltme (proofreading) aktivitesinden yoksun olması ve yüksek replikasyon kapasitesi nedeniyle ($> 10^{12}$ virion/gün) yüksek nükleotid değişim sıklığına (10^5 değişim/baz/döngü) sahiptir^{1,2}. Bu nedenle HBV, genotip ve alt genotip seviyesinde genomik ve coğrafik farklılıklar göstermektedir. Filogenetik analiz yöntemleriyle elde edilen dizilere göre, HBV, tüm genomda genotipler

için > %7.5, alt genotipler için > %4 nükleotid dizi farklılığı göstermektedir. Bu dizi farklılıkları dikkate alınarak yapılan analizlerde günümüze kadar HBV'nin kesinleşmiş A'dan H' ye kadar sekiz farklı genotipi ve 25 farklı alt genotipi tanımlanmıştır³⁻⁵.

HBV genotipleri, coğrafi bölgelere göre farklı dağılımlar göstermektedir. Kuzeybatı Avrupa, Kuzey Amerika ve Afrika'da genotip A baskın olarak görülürken (üç alt tipi mevcut olup Sahra Altı Afrika'da A1, Kuzey Avrupa'da A2 ve Batı Afrika'da A3 yaygındır), Doğu Asya ve Uzakdoğu ülkelerinde genotip B ve C (Japonya'da B1, Doğu Asya'da B2-B5, Kuzey Kutup bölgesinde B6; Çin, Kore, Güneydoğu Asya ve birçok Güney Pasifik ada ülkelerinde C3 bulunmaktadır) daha baskındır. Genotip D (D1-D7 olarak alt tiplere sahiptir) tüm dünya genelinde yaygın olmakla birlikte Akdeniz bölgesi, Yakın Doğu ve Ortadoğu ülkeleri ile Güney Asya'da daha sık görülmektedir. Batı Afrika'da genotip E; Orta Amerika bölgesinde genotip F (F1-F4 olarak alt tiplere sahiptir) daha baskındır⁶. Genotip G'nin kökeni tam olarak bilinmemekle birlikte Türkiye, Amerika, Fransa, Kanada, Almanya, Vietnam, Tayland ve Japonya'dan, genotip H ise Türkiye, Alaska, Orta ve Güney Amerika, aynı zamanda Polinezya'dan bildirilmiştir⁷⁻¹¹.

Yapılan çalışmalara göre Türkiye, Güneydoğu ve Doğu Anadolu bölgelerinde daha yüksek olmak üzere, %2.5 ile %9.1 arasında HBsAg pozitifliği ile orta/yüksek endemik ülkeler arasında yer almaktadır¹². Ayrıca, genotip A, E, G ve H ile enfekte olgular bildirilmekle birlikte, ülkemizde genotip D'nin baskın olduğu gösterilmiştir^{7-8,13-16}. Buna karşın Kuzey Kıbrıs'ta HBV genotip/alt genotip dağılımı hakkında elimizde hiçbir veri bulunmamaktadır. Bu çalışmanın amacı, Kuzey Kıbrıs'ta, HBV ile enfekte bireylerde filogenetik bir yaklaşımla HBV'nin moleküler epidemiyolojisini belirlemektir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Kasım 2011-Eylül 2014 tarihleri arasında Lefkoşa, Yakın Doğu Üniversitesi Hastanesi, rutin mikrobiyoloji laboratuvarına ve kan merkezine çalışma izni, oturma izni, öğrenci izni çıkartmak, rutin hepatit testleri ve/veya donör tarama testlerini yaptırmak üzere başvuran kişilerin, HBsAg pozitif olarak saptanan serum örnekleri çalışmaya alındı. HBsAg pozitifliği saptanan örnekler diğer HBV belirteçleri açısından değerlendirildi. HBV belirteçleri; HBsAg (Architect i200, Abbott, Illinois, ABD), anti-HBc, HBeAg, anti-HBe (Liaison XL Murex, DiaSorin, İtalya) kemilüminesan enzim immünolojik yöntemiyle araştırıldı. HBsAg test sonuçları örnek/eşik değer (sample/cut-off; S/Co) üzerinden değerlendirildi ve S/Co değeri < 1.0 ise negatif; ≥ 1.0 ise pozitif olarak rapor edildi. HBsAg testi pozitif saptanan örnekler, HBV-DNA, genotip ve alt genotip analizleri için -80°C'de saklandı.

Bu çalışma, Yakın Doğu Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Değerlendirme Etik Kurulu onayı (YDÜBADEK, 20.06.2013 tarih ve YDÜ/2013/16-88 karar no) ile gerçekleştirildi.

HBV-DNA Kantitasyonu ve Dizi Analizi

Serum örneklerinde HBV-DNA düzeyi, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemiyle üretici firmanın (Artus HBV QS RQG, Qiagen, Almanya) önerileri doğrultusunda çalışıldı. HBsAg pozitif örneklerin HBV genotip/alt genotipleri, HBV *pol* geninin (ters transkriptaz; rt bölgesi, 80-250. aminoasitler arası) dizilenmesiyle analiz edildi¹⁵. HBV *pol* geni amplifikasyonu (742 baz çifti) için, ileri (F: 5'-TCGTGGTGGAC

TTCTCTCAATT-3') ve geri (R: 5'-CGTTGACAGACTTTCCAATCAAT-3') primerler kullanıldı. PCR koşulları için 95°C'de 10 dk. ön denatürasyon, ardından 35 döngü 95°C'de 45 sn., 60°C'de 45 sn. ve 72°C'de 45 sn. ısı/zaman döngüsü kullanıldı. Tüm PCR ürünleri High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics, Almanya) ile saflaştırıldı. Dizileme protokolünde Phire Hot Start DNA polimeraz (Finnzymes Oy, Finlandiya) enzimi kullanıldı. Dizileme, BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech Inc., ABD), 36 cm kapiller ve POP-7 TM polimer kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems Inc., Foster City, ABD) platformunda gerçekleştirildi.

Filogenetik Analiz

HBV genotip/alt genotipleri, Neighbour-Joining yöntemi ile filogenetik olarak analiz edildi. Filogenetik ağaç CLC Sequence Viewer (CLC bio A/S, Qiagen, Danimarka) programı kullanılarak oluşturuldu (Şekil 1) ve Bootstrap değeri 1000 olarak alındı. Filogenetik ağaç oluşturulurken kullanılan referans diziler GenBank'tan (www.ncbi.nlm.nih.gov) elde edildi. Kuzey Kıbrıs'tan izole edilen HBV izolatlarının *pol* geni dizileri (parsiyel) GenBank'a yüklendi ve her birisi için bir erişim numarası sağlandı (BankIt1840514: KT284639- KT284707).

BULGULAR

Çalışmada değerlendirilen 13.892 serum örneğinin 160'ında (%1.2) HBsAg pozitifliği saptanmıştır. HBsAg pozitif örneklerin tümüne HBV-DNA kantitasyonu yapılmış; 60 (%37.5) örnek, negatif ya da düşük (< 30 IU/ml) viral yük nedeniyle dizileme dışı bırakılmıştır. Dizileme işlemine alınan 100 (%62.5) örneğin ait olduğu olguların demografik ve laboratuvar bulguları Tablo I'de verilmiştir.

HBV-DNA dizileme işlemine alınan örneklerin %32'sinde (32/100), viral yük 1000 IU/ml eşliğinin altında olduğundan başarılı sonuç alınamamış; %68'inde (68/100) ise HBV suşlarının dizi analizi yapılabilmemiş ve genotip/alt genotipleri filogenetik olarak belirlenmiştir (Şekil 1). Buna göre en sık saptanan HBV genotip/alt genotipinin D/D1 (%70.6) olduğu izlenmiş ve bu genotipin çoğunun (29/48, %60.4) Türkiye uyruklu olgularda

Tablo I. HBV-DNA Dizilemesi Yapılan Olguların Demografik Özellikleri ve Laboratuvar Bulguları (n= 100)

Özellik	
Cinsiyet (K/E) (n)	13/87
Yaş (Ort±SS) (yıl)	35.51 ± 12.88
Anti-HBc IgG pozitif olgu (n)	96
HBeAg pozitif olgu (n)	5
Anti-HBe pozitif olgu (n)	95
HBV-DNA düzeyi (Ort±SS) (IU/ml)	5.36x10 ⁶ ± 3.58x10 ⁷
ALT düzeyi (Ort±SS) (U/L)	22.54 ± 19.44
AST düzeyi (Ort±SS) (U/L)	27.88 ± 19.51

ALT: Alanin aminotransferaz; AST: Aspartat aminotransferaz; K: Kadın; E: Erkek; Ort.: Ortalama; SS: Standart sapma.

saptandığı görülmüştür. Ayrıca saptanan tek D/D3 suşunun Benguela (Angola) uyruklu; sekiz genotip E olgusunun tümünün de Nijerya uyruklu olduğu dikkati çekmiştir. Olguların HBV genotip ve alt genotiplerinin dağılımı ile uyrukları Tablo II'de sunulmuştur.

TARTIŞMA

Türkiye'de HBV'nin moleküler epidemiyolojisi ile ilgili bilgilerimizin yeterli olması^{12,17} rağmen, Kuzey Kıbrıs'ta HBV'nin epidemiyolojisi tam olarak bilinmemektedir. Çalışmamızın moleküler verileri, Kuzey Kıbrıs'ta HBV genotip A, D ve E'nin dolaşımında bulunduğunu göstermiştir (Şekil 1). HBV alt genotip çeşitliliğine bakıldığında; D genotipi için D1'in baskın olduğu, ancak D2 ve D3 alt genotiplerinin de bulunduğu; A genotipinin ise A1 ve A2 olarak çeşitlendiği anlaşılmaktadır. Bir ada ülkesi olmasına rağmen Kuzey Kıbrıs'ın heterojen karakterdeki HBV genotip/alt genotip dağılımı, birçok ülkeden çalışma, eğitim ve turistik amaçla gelen kitlelerin dinamiğine bağlı olabilir.

Türkiye'de yapılan çalışmalara bakıldığında; Kocaeli'nde genotip A, Adana'da genotip G, Konya'da genotip H ve Manisa'da genotip E ile enfekte kronik hepatit B olguları tanımlanmış, ancak HBV genotip D daima baskın olarak saptanmıştır^{8,13,17}. Bulgularımıza göre genotip D, Kuzey Kıbrıs'ta da yüksek bir oranda (53/68, %78) bulunmakta ve filogenetik olarak daha homolojik bir dağılım göstermektedir. HBV genotip D, dünya genelinde özellikle Akdeniz havzasında; genotip A kuzeybatı Avrupa, Kuzey Amerika ve Afrika'da; genotip E ise Afrika'da baskın olarak saptanmaktadır¹⁸. Elde ettiğimiz verilerde Kuzey Kıbrıs bölgesinde genotip D'nin baskın oluşu, Akdeniz havzası özelliği ile uyumlu görünmektedir. Filogenetik analiz metoduna dayalı çalışmalara göre HBV genotip D, D1-D7 alt gruplarından oluşmaktadır. D1 alt grubu Ortadoğu'da, D3 Alaska ve Güney Afrika'da, D4 Papua Gine ve Avustralya'da, D5 ise Japonya ve Hindistan'da tanımlanmıştır¹⁸. Türkiye'de yapılan çalışmalara göre alt genotip D1 (%81-100) baskın olarak saptanmakta, alt genotip D2 (%2-22), D3 (%2-9) ve D4 (%0.5-2) bunu takip etmektedir¹⁹⁻²¹. HBV tüm genom analiz yaklaşımı da Türkiye'de alt genotip D1 ve D2'nin sırasıyla daha sık rastlandığını doğrulamaktadır²². Bulgularımıza göre Kuzey Kıbrıs'taki HBV alt genotip dağılımı Türkiye ile benzerlikler göstermektedir; ancak genotip A (7/68, %10.3) ve E (8/68, %11.8) de dikkat çekici sıklığa sahiptir. Çalışmamızda, genotip A olguları, filoge-

Tablo II. Kuzey Kıbrıs'ta Saptanan Hbv Genotip ve Alt Genotiplerinin Dağılımı (n= 68)

Genotip	Alt genotip	Olgular	
		Sayı (%)	Uyruk (n)
D	D1	48 (70.6)	Türkiye (29), Kuzey Kıbrıs (12), Pakistan (3), Türkmenistan (2), Bulgaristan (1), Çin (1)
	D2	4 (5.9)	Türkiye (2), Nijerya (1), Suriye (1)
	D3	1 (1.5)	Benguela (1)
A	A1	5 (7.4)	Çin (2), Nijerya (2), Meksika (1)
	A2	2 (2.9)	Azerbaycan (1), Gürcistan (1)
E	E	8 (11.8)	Nijerya (8)

* Beş hastada birden fazla hastalık vardır.

netik ağaçta farklı evrimsel uzaklıkla karakterizedir. Bunun nedeni, genotip A olgularının farklı coğrafyalardaki farklı ülke uyruklu olmalarından kaynaklanabilir. Ancak genotip E olguları daha dar bir evrimsel uzaklık görünümü sergilemektedir. Bu durum, genotip E olgularının tümünün Nijerya kökenli olmasıyla açıklanabilir. Ayrıca, E genotipinin belirgin olarak sadece Afrika'dan gelen kişilerde saptanması, daha önceki epidemiyolojik çalışmalarla²³ uyumludur.

Günümüzde HBV'nin global kontrolünde zorluklara neden olabilecek gelişmeler yaşanabilmektedir. Türkiye'deki Suriye (2011 itibarıyla 1.7 milyon kişi) ve Afrika'lı mültecilerin sayısındaki olağanüstü artış; Afganistan, İran, Irak ve Somali kökenli bireylerin iltica taleplerindeki artış (Ocak 2015 itibarıyla 100.000 kişi); insan kaçakçılığının bölgemizi duraklama noktasına çevirmesi ve turizm hareketleri, HBV'nin bölgemizde daha fazla çeşitlenmesine yol açabilir^{24,25}. Diğer taraftan bütün bu insan hareketleri, dinamik HBV popülasyonlarına ve buna bağlı olarak rekombinant HBV kökenlerinde artışa neden olabilir⁶. Kitle hareketlerindeki çeşitlilik ve artış, HBV dolaşımını yakından izlemeyi gerektirmektedir.

HBV'nin genotip ve alt genotiplendirmesinde, nükleotid dizilerinin filogenetik analizi altın standart bir yaklaşımdır²⁶. Filogenetik yaklaşım ile geniş serileri analiz etmek mümkündür. Bu amaçla Neighbour-Joining (N-J) ve UPGMA metodları sıklıkla tercih edilirken, N-J metodu suşlar arasındaki evrimsel ilişkileri, Jukes Cantor ve Kimura nükleotid uzaklık ölçüm modelleri sayesinde, UPGMA metodundan daha iyi yansıtır. Hedeflenen nükleotid dizilerinin referans dizilerle benzerliklerini esas alan filogenetik analiz yaklaşımı, HBV suşları arasındaki evrimsel yakınlıkları anlamayı sağlamakta ve aynı zamanda elde edilen nükleotid dizilerinin uluslararası dizi veri havuzu olan GenBank'a yüklenmesi ile global sürveyansa katkı yapılmasını mümkün kılmaktadır⁶.

Sonuç olarak çalışmamız, Kuzey Kıbrıs'ta HBV'nin D, A ve E genotiplerinin, D1, D2, D3 ve A1, A2 alt genotiplerinin bulunduğunu göstermektedir. Genotip/alt genotip dağılımının filogenetik olarak tanımlanması HBV'nin dolaşımı ve bulaş dinamiklerini kavramada kesinlik sağlayabilir.

KAYNAKLAR

1. Schaefer S. Hepatitis B virus: significance of genotypes. *J Viral Hepat* 2005; 12(2): 111-24.
2. Locarnini SA. Clinical relevance of viral dynamics and genotypes in hepatitis B virus. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17 (Suppl 3): S322-8.
3. Emektaş G, Tezcan S, Aslan G, et al. Determination of hepatitis B virus genotypes in chronic hepatitis B patients in Mersin province, Turkey. *Mikrobiyol Bul* 2012; 46(3): 432-45.
4. 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(Pt 10): 2575-83.
5. Kurbanov H, Tanaka Y, Mizkokami M. Geographical and genetic diversity of human hepatitis B virus. *Hepatol Res* 2010; 40(1): 14-30.
6. Pourkarim MR, Amini-Bavil-Olyae S, Kurbanov F, Van Ranst M, Tacke F. Molecular identification of hepatitis B virus genotypes/subgenotypes: revised classification hurdles and updated resolutions. *World J Gastroenterol* 2014; 20(23): 7152-68.

7. Sayan M, Dogan C. Hepatitis B virus genotype G infection in a Turkish patient undergoing hemodialysis therapy. *Hepat Mon* 2012; 12(2): 118-21.
8. Ural O, Sayan M, Akhan S, Sümer Ş, Şimşek F. First case of hepatitis B virus genotype H infection in Turkey. *Mikrobiyol Bul* 2013; 47(3): 550-5.
9. Lindh M. HBV genotype G-an odd genotype of unknown origin. *J Clin Virol* 2005; 34(4): 315-6.
10. Stuyner 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(Pt 1): 67-74.
11. Silva AC, Spina AM, Lemos MF, et al. Hepatitis B genotype G and high frequency of lamivudine-resistance mutations among human immunodeficiency virus/hepatitis B virus co-infected patients in Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2010; 105(6): 770-8.
12. Sayiner A, Abacıoğlu H. Epidemiology of hepatitis B in Turkey, pp: 5-7. In: Van Damme P, Vorsters A, Van Herck K, Hendrickx G (eds), *Viral Hepatitis*. Vol. 18, Number 2, 2010. Viral Hepatitis Prevention Board, Antwerp, Belgium.
13. Sayan M, Şanlıdağ T, Akçali S, Arıkan A. Hepatitis B virus genotype E infection in Turkey: the detection of the first case. *Mikrobiyol Bul* 2014; 48(4): 683-8.
14. Sayan M, Akhan SÇ, Bozdayı M. Genotype A2/Adw2 strain of hepatitis B virus in Turkey: a case report. *Hepat Mon* 2010; 10(4): 302-5.
15. Sayan M, Sentürk O, Akhan SÇ, Hülagü S, Cekmen MB. Monitoring of hepatitis B virus surface antigen escape mutations and concomitantly nucleos(t)ide analogues resistance mutations in Turkish patients with chronic hepatitis B infection. *Int J Infect Dis* 2010; 14 (Suppl 3): e136-41.
16. Kalaycı R, Altındaş M, Gülamber C, Demirtürk N, Akcan Y, Demirdal T. Genotype distribution of chronic hepatitis B and hepatitis C patients and investigation of the resistance patterns in hepatitis B cases. *Mikrobiyol Bul* 2010; 44(2): 237-43.
17. Özdemir D, Balık İ. Ülkemizdeki Hepatit B virusu (HBV) genotip dağılımı. *Viral Hepatit Derg* 2002; 8(1): 451-4.
18. Kramvis A, Kew M, François G. Hepatitis B virus genotypes. *Vaccine* 2005; 23(19): 2409-23.
19. Sayan M, Akhan SC. Antiviral drug- associated potential vaccine-escape hepatitis B virus mutants in Turkish patients with chronic hepatitis B. *Int J Infect Dis* 2011; 15(10): e722-6.
20. Sayan M, Doğan C. Genotype/subgenotype distribution of hepatitis B virus among hemodialysis patients with chronic hepatitis B. *Ann Hepatol* 2012; 11(6): 849-54.
21. Sayan M, Akhan SC, Şentürk O. Frequency and mutation patterns of resistance in patients with chronic hepatitis B infection treated with nucleos(t)ide analogs in add-on and switch strategies. *Hepat Mon* 2011; 11(10): 835-42.
22. Bozdayı G, Türkyılmaz AR, İdilman R, et al. Complete genome sequence and phylogenetic analysis of hepatitis B virus isolated from Turkish patients with chronic HBV infection. *J Med Virol* 2005; 76(4): 476-81.
23. Wang B, Feng Y, Li Z, et al. Distribution and diversity of hepatitis B virus genotypes in Yunnan, China. *J Med Virol* 2014; 86(10): 1675-82.
24. UNHCR, The UN Refugee Agency. 2015 UNHCR country operations profile-Turkey. Available at: <http://www.unhcr.org/pages/49e48e0fa7f.html>
25. European Commission. Trafficking in human beings-EUROSTAT-2015 edition. Available at: https://ec.europa.eu/anti-trafficking/publications/trafficking-human-beings-eurostat-2015-edition_en
26. Bartholomeusz A, Schaefer S. Hepatitis B virus genotypes: comparison of genotyping methods. *Rev Med Virol* 2004; 14(1): 3-16.