

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KRONİK HEPATİT B VİRÜS (HBV) HASTALARINDA
HEPATİT D VİRÜS (HDV) GENOTİPLENDİRİLMESİ VE
FİLOGENETİK ANALİZİ**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. Pınar DEMİREL ÖNER**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Yasemin BULUT**

**ELAZIĞ
2012**

DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr. İrfan ORHAN

DEKAN

Bu tez uzmanlık tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Mustafa YILMAZ

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Yasemin BULUT

Danışman

Uzmanlık Tezi Değerlendirme Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Mustafa YILMAZ

Prof. Dr. Adnan SEYREK

Doç. Dr. Yasemin BULUT

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım boyunca, emeğini, bilgisini ve desteğini sonuna kadar benden esirgemeyen, sabırla destekleyen değerli hocam, tez danışmanım Doç. Dr. Yasemin BULUT'a saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca uzmanlık eğitimim sırasında yetişmemde önemli katkıları olan bilgi ve deneyim kazanmama olanak sağlayan değerli hocalarım; Prof. Dr. Mustafa YILMAZ, Prof. Dr. Zülal AŞÇI TORAMAN, Prof. Dr. Adnan SEYREK ve Prof. Dr. Ahmet KİZİRGİL'e teşekkür ederim.

Bir aile gibi olduğum araştırma görevlisi arkadaşlarıma, laboratuvarında beraber çalıştığım Mesut BELHAN ve diğer teknisyen arkadaşlarıma bana destek oldukları için teşekkürlerimi borç bilirim. Proje finansman desteklerinden dolayı Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (FÜBAP)'ne teşekkürlerimi bildiririm.

Son olarak çok sevdiğim ama işlerimden dolayı yeterince zaman ayıramadığım çocuklarım Miray ve Yağız'a, sevgili eşim Dr. Fatih ÖNER'e sonsuz teşekkürler.

Dr. Pınar DEMİREL ÖNER

ÖZET

Hepatit delta virüsü (HDV), hepatit B virüsü (HBV) ile enfekte hastalarda karaciğerle ilişkili mortalitelerin önemli bir sebebidir. HDV'nin genotiplerinin belirlenmesi HBV ile ilişkili karaciğer hastalıklarının patogenezinin daha iyi anlaşılmasında önemlidir. Bu tezin amacı HBV ile kronik olarak enfekte hastalarda HDV'un genotip veya genotiplerinin belirlenmesidir. Bu amaçla, bu çalışmaya HBV ile kronik olarak enfekte 113 hasta dahil edilmiştir. Hastalığın klinik gidişatının incelenmesi amacıyla, bu hastaların serumlarında HDV RNA, HBsAg, HBV DNA miktarları ve biyokimyasal parametreler belirlenmiştir. HDV'nin genotiplendirilmesi için, öncelikle, hasta serumlarından elde edilen RNA'lar kullanılarak cDNA çoğaltılması ve semi-nested polymerase chain reaction (PCR) gerçekleştirilmiştir. Genotiplendirme için, restriksiyon enzim analizine ek olarak, semi-nested PCR ürünlerinde 11'i jel purifikasyon kiti kullanılarak elde edilmiş, bu gen ürünleri öncü ve ters primerler ile çift yönlü olarak sekanslatılmıştır. Sekanslama işleminden sonra, elde edilen gen dizilimleri ClustalW programı kullanılarak sıralandırılmıştır ve gen bankasında elde edilen HDV'un dizilimleri ile kıyaslanmıştır. Daha sonra, bu dizilimlerin filogenetik ağacı PHYLIP bilgisayar programı ile komşu-birlikteliği metoduna göre tespit edilmiştir. Çalışma sonuçlarına göre, daha yüksek miktarlarda HDV RNA'ya sahip hastalarda HBV ve alanine aminotransferase (ALT)'in önemli derecede daha düşük miktarda buldukları tespit edilmiştir. Aynı hastalarda, aspartate transaminase (AST) ve gamma glutamyl transpeptidase (GGT)'in ise önemli derecede daha yüksek miktarda buldukları belirlenmiştir. HDV RNA miktarı ile yaş ve erkek cinsiyet arasında ters orantı tespit edilmiştir. Sekansların sıralama işleminde, 11 klinik örneğe ait genetik dizilimlerin birbirleri ile % 95-98 oranında benzer oldukları tespit edilmiştir. Bu dizilimlerin filogenetik analizi neticesinde tüm örneklerin HDV'nin genotip I grubunda olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, HBV ile enfekte kronik hastalarda HDV ile ilişkili karaciğer hastalıklarının patogenezinin ve klinik gidişatının daha iyi anlaşılması için serolojik ve moleküler metotların birlikte değerlendirilmesi gerekliliğini önermekteyiz.

Anahtar kelimeler: Hepatit delta virüsü, hepatit B virüsü, genotiplendirme, restriksiyon enzim analizi, filogenik analiz.

ABSTRACT

**GENOTYPES AND PHYLOGENETIC CHARACTERIZATION OF
HEPATITIS DELTA VIRUS (HDV) IN PATIENTS WITH CHRONIC
HEPATITIS B VIRUS**

Hepatitis delta virus (HDV) is a serious cause of liver-related mortality in patients who are infected with hepatitis B virus (HBV). Determination of genotypes of HDV is important for better understanding the pathogenesis of the liver diseases that are associated with HBV infection. The aim of this thesis was to determine the genotype or genotypes of HDV among patients chronically infected with HBV. A group of 113 chronic patients infected with HBV were included in this study. For investigation of the clinical progress, the amounts of HDV RNA, HbsAg, HBV DNA and the biochemical parameters from serum samples of these patients were determined. For genotyping of HDV, first, cDNA amplification and semi-nested polymerase chain reaction (PCR) were performed using the RNA extracted from serum samples of the patients. Next, restriction enzyme analysis were carried out with the semi-nested PCR products. For genotyping, in addition to restriction enzyme analysis, eleven of the semi-nested PCR products were purified using gel purification kit and the gene products were sequenced in both directions with the forward and reverse primers. The gene sequences were aligned using ClustalW program and compared to the sequences of HDV present in GenBank database. The position of the sequences in the phylogenetic tree was analyzed by a neighbour-joining method using the PHYLIP computer software. According to the results of this study, while the patients with higher levels of HDV RNA had significantly lower HBV and alanine aminotransferase (ALT) amounts, same patients had significantly higher aspartate transaminase (AST) and gamma glutamyl transpeptidase (GGT) levels. Reverse correlation was found between HDV RNA levels and demographic factors including age, male gender. In the result of alignment analysis, the sequences of eleven clinical samples were shown to be 95-98% similar. Phylogenetic analysis of the sequences showed that the all samples were infected with genotype I of HDV. As a result, for better understanding of clinical course of the patients and pathogenesis related with HDV among patients chronically infected with HBV, we recommend using both of molecular techniques along with serological methods.

Key words: Hepatitis delta virus, hepatitis B virus, genotyping, restriction enzyme analysis, phylogenetic analysis.

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK	i
ONAY SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLO LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ	x
KISALTMALAR LİSTESİ	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Hepatit B Virüs Enfeksiyonu	1
1.1.1. Tanım	3
1.1.2. Hepadnavirüslerin Taksonomik Sınıflandırılması	3
1.1.3. Virüs Partiküllerinin Yapısı ve Viral Genomun Organizasyonu	5
1.1.4. Hepatit B Virüsü Replikasyon Siklusu	9
1.1.5. Hepatit B Virüs Enfeksiyonları İçin Hayvan Modelleri	14
1.1.6. Hepatit B Virüsü'nün Epidemiyolojisi	15
1.1.7. Hepadnavirüs Enfeksiyonlarının Patogenezi	16
1.1.8. Hepatit B Virüsü'nün Klinik Seyri	17
1.1.8.1. Akut Enfeksiyon	18
1.1.8.2. Kronik Enfeksiyon	20
1.1.9. HBV Enfeksiyonunun Tanısı	21
1.1.9.1. Serolojik Testler	21
1.1.10. Mutant Virüsler	27
1.1.10.1. Basal Core Promoter/Precore ve Core Bölgesinde İzlenen Mutasyonlar	27
1.1.10.2. X Bölgesinde İzlenen Mutasyonlar	28
1.1.10.3. S Geni Mutasyonları	28
1.1.10.4. Polimeraz Bölgesinde İzlenen Mutasyonlar	28
1.2. Hepatit Delta Virüs Enfeksiyonu	30
1.2.1. Tanım	30

1.2.2. Virüsün Yapısı ve Viral Genomun Organizasyonu	31
1.2.3. Replikasyon	32
1.2.3.1. HDV RNA Sentezi	32
1.2.3.2. Antigenom Sentezi	33
1.2.3.3. HDAg Sentezi	34
1.2.3.4. Virüsün Oluşması ve Salınması	34
1.2.4. Delta Virüsü'nün Genotip Dağılımı	35
1.2.5. Delta Hepatit'in Epidemiyolojisi	36
1.2.6. Hepatit Delta Virüs Enfeksiyonunun Patogenezi	38
1.2.7. Delta Hepatit'in Klinik Seyri	39
1.2.7.1. Akut Delta Enfeksiyonu	40
1.2.7.2. Kronik Delta Enfeksiyonu	43
1.2.7.3. Asemptomatik HDV Olgularının İzlemi	44
1.2.8. Delta Hepatitin Tanısı	44
1.2.8.1. Serolojik Testler	44
1.2.9. Laboratuvar Bulguların Delta Hepatitinin Klinik Seyri Belirlemede Yeri ve Önemi	46
1.2.9.1. Hepatit D Ko-enfeksiyonunun Laboratuvar Tanısı	46
1.2.9.2. Hepatit D Süperenfeksiyonunun Laboratuvar Tanısı	47
1.2.9.3. Kronik Viral Hepatit D (KHD) Enfeksiyonunun Tanısı	47
1.2.10. Delta Hepatitlerin Tedavisi	48
1.2.11. Korunma	50
1.2.12. Viral Genotipleri Belirlemede Kullanılan Moleküler Yöntemler	50
2. GEREÇ VE YÖNTEM	53
2.1. Biyokimyasal Parametrelerin Ölçümü	53
2.2. Serolojik Parametrelerin Ölçümü	53
2.2.1. HBV DNA'nın Kantitatif Belirlenmesi	54
2.3. Kimyasal Maddeler, Sarf Malzemeler ve Cihazlar	54
2.3.1. Serum Örneklerinden Kalitatif HDV RNA Ekstraksiyonu	54
2.3.2. Oligonükleotidler (Primerler)	55
2.3.2. Stok Primerlerin Hazırlanışı	56
2.3.3. cDNA sentezi (RT-PZR Aşaması)	56

2.3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	56
2.3.5. PZR Optimizasyonu	57
2.3.6. PZR Ürünlerinin Görüntülenmesi	57
2.4. Restriksiyon Enzim Kesimi	58
2.5. İstatistiksel Analizler	59
3. BULGULAR	60
4. TARTIŞMA	72
5. KAYNAKLAR	87
6. ÖZGEÇMİŞ	105

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.	HBV serolojik testlerinin yorumlanması	25
Tablo 2.	HBV-HDV Koenfeksiyon ve süperenfeksiyonunun serolojik olarak karşılaştırılması	46
Tablo 3.	Çalışmada kullanılan HDV-I, II ve III primerleri	56
Tablo 4.	<i>SmaI</i> ve <i>XhoI</i> enzimlerinin restriksiyon tanıma bölgesi ile genotip kesim büyüklükleri	58
Tablo 5.	Hastaların biyokimyasal parametrelerinin değerlendirilmesi	61
Tablo 6.	Kadın ve erkek hastaların, virolojik parametrelerinin karşılaştırılması	61
Tablo 7.	HDV RNA düzeyi 400 kopya/ml'nin altında olan hastalar ile 400 kopya/ml'nin üstünde olan hastaların karşılaştırılması	61
Tablo 8.	HDV RNA düzeyi 400 kopya/ml'nin altında olan hastalar ile 400 kopya/ml'nin üzerinde olan hastaların karşılaştırılması	62
Tablo 9.	HBeAg pozitif ve negatif hastaların HDV RNA, HBV DNA ve HBsAg titre oranları açısından karşılaştırılması	62
Tablo 10.	HBeAg pozitif ve negatif hastaların demografik ve biyokimyasal olarak karşılaştırılması	63

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.	HBV'nin elektron mikroskopta görünümü	5
Şekil 2.	HBV genomik organizasyonu ve sentezlenen RNA'lar	8
Şekil 3.	HBV replikasyonunun şematik gösterimi	14
Şekil 4.	HDV genom ve antijenom şemaları	34
Şekil 5.	HDV'nin dünyada'ki genotipik dağılımı	36
Şekil 6.	Akut Delta koenfeksiyonunun klinik ve serolojik seyri	40
Şekil 7.	Akut Delta süperenfeksiyonunun klinik ve serolojik seyri	42
Şekil 8.	PZR ürünlerinin etidyum bromidle boyanmış jel görüntüsü.	63
Şekil 9.	PZR ürünlerinin <i>Xho I</i> ve <i>Sma I</i> enzimleri ile kesilip etidyum bromidle boyanmış jel görüntüsü	64
Şekil 10.	PZR pozitif 11 farklı klinik örneğe ait DNA dizileri ile bu dizilimler üzerinde bulunan primer ve enzim tanıma bölgeleri	68
Şekil 11.	PZR pozitif klinik örneğe (11 nolu örnek) ait dizilimin gen bankasında mevcut üç farklı HDV genomu ile BLAST dizi sıralama sonuçları	70
Şekil 12.	Onbir nolu örneğe ait gen diziliminin filogenetik ağaç sonucu	71

KISALTMALAR LİSTESİ

ALB	: Albumin
ALT	: Alanin aminotransferaz
AST	: Aspartat aminotransferaz
bç	: Baz çifti
CTL	: Sitotoksik T lenfositleri
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
GGT	: Gama glutamil transpeptidaz
HBV	: Hepatit B virüsü
HCV	: Hepatit C virüsü
HDag	: Hepatit D Antijeni
HDV	: Hepatit D virüsü
HIV	: İnsan İmmün yetmezlik virüsü
IFN	: İnterferon
IL	: İnterlökin
KHD	: Kronik Hepatit D
NK	: Naturel killer hücreleri
nm	: Bir milimetrenin milyonda biridir (nanometre)
nt	: Nükleotit
ORF	: Opening Reading Frame
pgRNA	: Pregenomik RNA
PLT	: Platelet
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RdRp	: RNA'ya bağımlı RNA polimerler
RE	: Restriksiyon
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphisim
RNA	: Ribonükleik asit
RT	: Reverse Transkriptaz
TBIL	: Total bilirubin

1. GİRİŞ

Çeşitli virüslerin sebep olduğu karaciğer hücre nekrozu ile seyreden, bulaşıcı karaciğer enfeksiyonları viral hepatit olarak tanımlanmaktadır. Bu enfeksiyonlardan sorumlu tutulan etkenler hepatit virüsleridir ve bu grupta en az altı virüs yer almaktadır. Bunlar; hepatit A, B, C, D, E ve G virüsleri olarak bilinmektedir. Her ne kadar bu virüslerin temel hepatit semptomları benzer ve hedef organları karaciğer olsa da, yapıları, replikasyon mekanizmaları, bulaş yolları ve hastalık süreçleri ile neden oldukları hastalıkların sekelleri yönünden önemli farklılıklar gösterirler. Ayrıca, Epstein Barr virüs, Cytomegalovirüs, Herpes simpleks virüsü, Varicella Zoster virüsü, Coxsackie B virüsü, Adenovirüsler, Rubella virüsü de hepatit geliştirebilen diğer virüslerdir. Virüslerin dışında çeşitli toksinler, ilaçlar, alkol ve diğer bulaşıcı etkenlerde hepatite neden olabilir (1).

Viral hepatitler tüm dünyada yaygın olarak görülen ve ülkemizi de yakından ilgilendiren önemli bir sağlık sorunudur ve ülkemizde en sık görülen enfeksiyon hastalıklarının başında gelmektedir. Özellikle hepatit B virüsü (HBV) ülkemiz için önemli bir sorundur. Dünya nüfusunun % 5'i (350-400 milyon) HBsAg (Hepatit B yüzey antijeni) taşıyıcısı olup, yaşayanların 1/3'ü HBV açısından seropozitifdir. Ülkemizde de benzer oranlar söz konusu olup, nüfusun % 5'i (3.5-4 milyon kişi) HBsAg taşıyıcısı ve 1/3'ü de antikor yönünden seropozitifdir. Ayrıca ülkemizde kronik hepatit B (KHB) sonucu her yıl yaklaşık 10.000-15.000 kişinin siroz ve komplikasyonlarından, 5000 kişinin de hepatosellüler kanser (HSK) nedeniyle kaybedildiği tahmin edilmektedir ve KHB tedavisinin de çok pahalı ve etkinliğinin arzu edilen düzeyde olmaması nedeni ile çok önemli bir sağlık sorunu ile karşı karşıya olduğumuz açıktır. Bunun yanında KHB hastalarının primer olarak hepatotropik bir virüs olan, patojenite ve tedaviyi etkileyen hepatit D virüs (HDV) ile birlikteliği de önemlidir (2).

Hepatit delta virüsü, replikasyonu için HBV'ne gereksinim duyan bir RNA virüsüdür. Daha önceleri defektif bir virüs olarak bilinen HDV, HBV ile ortak dizilerinin olmayışı nedeniyle, bugün HBV satellit virüsü olarak kabul edilmektedir. HDV, farklı hepatit tablolarına yol açar. Yüksek patojeniteye sahiptir ve hızlı ilerleyen bir hastalık tablosu oluşturmaktadır. Toplam olguların % 70 (%15'inde ilk 1-2 yılda)'inde siroz gelişir. HBV taşıyan hastalarda ek olarak HDV enfeksiyonu da

eklenince, siroz, HSK gelişimi ve buna bağlı ölüm riski de artmaktadır. HDV enfeksiyonunda ciddi KC hasarı her yaşta görülebilmektedir. Siroz gelişen HBV hastası çocukların yaklaşık olarak 3/5'nün delta antijeni taşıyıcısı olması bunun tipik göstergesidir (3).

Genetik çeşitlilik RNA virüsleri için önemli bir özelliktir. HDV, HDAg bölgesindeki farklılıklara göre sekiz genotipe ayrılır. Her genotip genellikle farklı coğrafi bölgelerde farklı dağılımlar göstermektedir. Tüm dünyada genotip I yaygındır (4).

Genotipler, hastalığın klinik gidişatını, tedavi ve tedaviye yanıtı etkileyebildiğinden ve coğrafi dağılımda rol oynadığından, bir popülasyonda farklı genotipleri belirlemek önemlidir. HBV ve HCV'nin farklı genotiplerinin olduğu, her genotipin farklı bir klinik tablo yarattığı ve bununda ne kadar önemli olduğu bilindiği gibi, HDV genotiplerinin de aynı nedenlerden dolayı önemli olduğu kabul edilmektedir (5, 6).

Hepatit delta virüs enfeksiyonu akut (koenfeksiyon, süperenfeksiyon, fulminan), kronik ve latent enfeksiyon şeklinde çeşitli klinik formlarda görülür ve genellikle ciddi KC hasarı yapar. Hastalığın klinik seyrini etkileyen en önemli faktörlerden birisi virüsün genotipidir. HDV virüsünün genetik farklılığı hastalığın prognozunu belirlemektedir (7).

Viral genotiplerin belirlenmesi, epidemiyolojik verilerin yanı sıra klinik anlam da taşımaktadır. Genotip belirlemelerinde, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), özgül PZR, hibridizasyon teknikleri, heterodubleks mobilite teknikleri, tek sarmallı konformasyon çeşitliliğine dayalı yöntemler SSCP (single-stranded conformational polymorphism), CFLP (cleavage fragment length polymorphism) analizleri kullanılmakla birlikte, genotiplere özgü ayırt edici nükleik asit dizileri bulunduran genomik bölgelerin seçilerek, elde edilen dizinin filogenetik analiziyle genotip belirleme altın standart olarak kabul edilmektedir. HDV'nin genotiplerinin belirlenmesi HBV ile ilişkili karaciğer hastalıklarının patogenezinin daha iyi anlaşılmasında önemlidir (8).

Bu çalışma da, bölgemizde daha önce belirlenmemiş olan HDV genotip veya genotiplerini belirlemek amaçlanmıştır.

1.1. Hepatit B Virüs Enfeksiyonu

1.1.1.Tanım

Hepatit B virüs enfeksiyonu, kronik hepatit, siroz ve hepatosellüler karsinomun başlıca nedeni olup, ciddi bir halk sağlığı sorunudur (9).

Blumberg ve ark. (10)'ı 1965 yılında, farklı insan popülasyonlarındaki genetik farklılıkları tanımlamak ve izlemek için yöntem araştırırken Avusturyalı Aborjinlerin serumlarında yeni bir antijen bulmuşlardır. Avustralya kökenli lösemili bir hastanın serumunda immünopresipitasyon ile bulunan ve Blumberg ve ark. (11)'na Nobel ödülünü kazandıran bu antijen, başlangıçta Avusturya antijeni olarak adlandırıldı. İlerleyen yıllarda bu antijen hepatit kliniği ile ilişkilendirildi ve spesifik bir tipi, serum hepatiti olarak adlandırıldı (12). Avusturya antijeni pozitif olan insanların serumlarında elektron mikroskopik olarak iki farklı tip partikül saptandı: Bunlar: 22 nm çapında, küçük sferik ve çomak-benzeri yapıli partiküller ve Dane partikülü denilen 42 nm çapında, insan hepatit B virüsü olarak adlandırılan (HBV) viral genom içeren intrensek enfeksiyöz virüs partikülüdür (13, 14). Daha sonraki çalışmalarda HBV-benzeri birkaç virüs daha saptanmıştır. Çoğu kısıtlı bir konak spektrumuna sahipti ve tüm bu virüsler *Hepadnaviridea* virüs ailesinde yer almaktaydı (15). HBV kanatlı ve memelilerde enfeksiyon oluşturan; genom organizasyonu, doku tropizmi ve replikasyon stratejisi açısından birbirine benzerlikler gösteren çeşitli virüslerden oluşan *Hepadnaviridea* ailesi içinde sınıflandırılmaktadır ve bu ailenin prototip üyesidir (16).

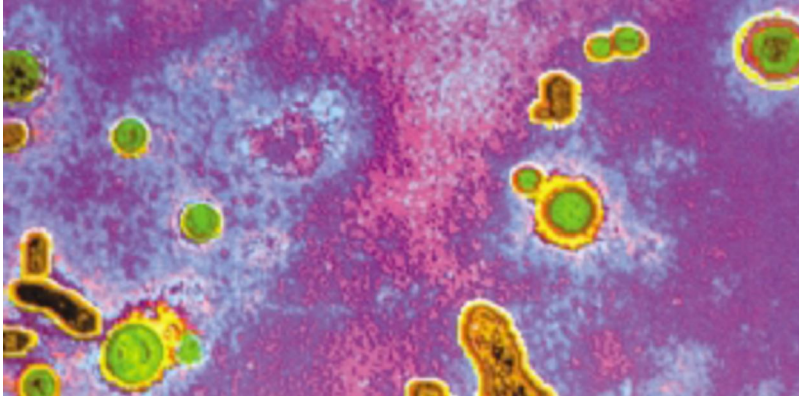
1.1.2. Hepadnavirüslerin Taksonomik Sınıflandırılması

"*Hepadnaviridea* ailesi" ismi enfeksiyonun klinik tablosu, hedef organı (karaciğer, eski Yunanda: hepar) ve virüsün nükleik asidi DNA baz alınarak oluşturulmuştur. *Hepadnaviridea* ailesi iki cinsi kapsar. Bunlar; sadece memelilerde enfeksiyona yol açan *Ortohepadnavirüsler* ve kuşları enfekte eden *Avihepadnavirüsler*. Taksonomik olarak, *Hepadnaviridea* günümüzde bilinen diğer başka viral ailelerde görülmeyen biyolojik özelliklerden dolayı kendi grubunu oluşturur. *Hepadnaviridea* bilinen en küçük (3-3.3 kilobaz çifti: kpb) patojen genoma sahiptir. Genom üzerindeki opening frame (OF) eşsiz bir replikasyon stratejisine imkan veren oldukça sıkıştırılmış ve örtüşen (overlap) bir şekilde organize olmuştur. Bu strateji, retrovirüs replikasyonunda da görülen fakat nükleik asid paketlenmesinin

retrovirüsün RNA'sı yerine hepadnavirüsün DNA'sında gerçekleştiği, reverse transkripsiyon basamağını içerir. İki cins arasındaki sınıflandırma, konaktaki farklılıklar ve buna ek olarak memeli ve avian hepadnavirüsleri arasındaki filogenetik farklılıklar baz alınarak yapılmıştır. Şimdiye kadar avihepadnavirüsler de iki major tür tespit edilmiş ve konak durumuna göre adlandırılmıştır; Bunlar: ördek hepatit B virüsü (DHBV) ve balıkçıl hepatit B virüsü (HHBV)'leridir. Ayrıca spesifik olarak kategorize edilmeyen birkaç farklı avihepadnavirüs de tanımlanmıştır. Diğer yandan, ortohepadnavirüs genusu en iyi bilinen dört farklı türü HBV, Dağsıçanı hepatit virüsü (WHV), yer sincabı hepatit virüsü (GSHV), yünlü maymun hepatit virüsü (WMHV) içerir. İnsan hepatit B virüsü (HHBV), insanları enfekte eden prototiptir ve deneysel olarak şempanzeleri enfekte etmede kullanılır. WHV iyi incelenmiş bir ortohepadnavirüstür. Virüs normalde dağsıçanlarında bulunur ve akrabası olan GSHV gibi diğer kemirgenlere transfer edilemez. İlginç olarak GSHV dağ sıçanlarını da enfekte edebilir ki bu da onun konak spektrumunun, WHV konak spektrumu kadar sınırlı olmadığını gösterir. Listedeki son tür, WMHV, HBV'nin aksine doğal konağı "insan olmayan primat" olmasına rağmen, şempanzeler için enfeksiyöz değildir (15).

Hepatit B virüsü günümüzde, tüm dünyadan yayınlanan çalışmalara göre 8 genotipe ayrılmıştır (A-H). Ancak bu durum gelecekte başka genotiplerin oluşmayacağı yada bu gruba dahil edilmeyeceği anlamı taşımamalıdır. A-H, % 8-17 arasında farklılık içeren çiftler şeklinde görülür (15). Bunun dışında HBs antijeninin yapısal farklılıklarına göre HBV serotipleri de tanımlanmıştır. Ortak "a" determinantı taşıyan HBV serotipleri günümüzde 9 grupta incelenmektedir. S geninin dizi analizi hem genotipleri hem serotipleri tanımlayabilir ancak, genotipler ve serotipler tam olarak birbiri ile örtüşmemekte, serotip benzerlikleri genetik ilişkiyi doğrulamamaktadır. Virüsün coğrafi dağılımı ile genotiplerin, serotipe göre daha uyumlu olduğu ve moleküler epidemiyolojik çalışmalar için genotiplerin kullanımının daha yararlı olduğu belirlenmiştir (17, 18).

1.1.3. Virüs Partiküllerinin Yapısı ve Viral Genomun Organizasyonu



Şekil 1.HBV'nin elektron mikroskopta görünümü

Hepadnaviridea, nükleokapsidi oluşturan core proteini ile uyum içinde sirküler, parsiyel çift-zincirli genom içeren zarflı DNA virüslerdir. Hepatositlere tropizmi nedeniyle karaciğerde replike olur ve klinik olarak hepatit oluşturur. HBV ile enfekte hastaların kanında elektron mikroskobu ile üç ayrı viral partikül gösterilmiştir. 42-47 nanometre (nm) çapındaki sferik partiküller, tam bir viriyon olup enfeksiyözdür. "Dane partikülü" olarak adlandırılan bu partiküller, 25-27 nm çapında elektron yoğun bir çekirdek ve yaklaşık 7 nm kalınlığındaki lipid zarf yapısı nedeniyle çift katmanlı olarak görülür. 17-25 nm çapında ve değişken uzunluktaki (yaklaşık 200 nm) filamentöz yapılar ile 17-25 nm çapındaki küçük yuvarlak partiküller ise enfeksiyöz değildir (19). Bu sferik ve filamentöz partiküller, enfekte kişilerin plazmasında mililitrede birkaç yüz mikrogram düzeylerinde bulunabilmekte ve bu partiküllerin antikorlarla oluşturduğu komplekslerin HBV ile enfekte kişilerde izlenen immün kompleks reaksiyonlarından sorumlu olduğu bilinmektedir. Yuvarlak partiküllerin kandaki konsantrasyonu 10^{14} partikül/ml'ye ulaşabilir. Kronik HBV enfeksiyonunda kandaki virüs konsantrasyonu ise 10^9 viryon/ml kadardır. Viral partiküllerin endoplazmik retikulum ve golgi yolları aracılığı ile sekretuar yollarla taşındığında oluşan lipid zarf üzerinde üç formda; büyük (L), orta (M) ve küçük (S) viral yüzey antijenleri (HBsAg) bulunur (15). HBV yüzey antijenleri filamentöz ve sferik yüzey antijeni partiküllerinin de yapısını oluştururlar (20). Dane partikülünün iç kısmını oluşturan nükleokapsid 28 nm'dir ve viral genomun tekli kopyasının yanı sıra viral genoma kovalent bağla bağlı viral polimerazı da içerir ve böylece HBV enfeksiyonlarının moleküler tanısında probleme sebep olur. Genel olarak tüm zarflı virüslerde olduğu gibi, HBV partikülleri de konağın olduğu

farzedilen proteinleri de içerir (21). İzolattan izolata ve genotipten genotipe farklılık göstermekle beraber viral genom; yaklaşık 3200 nükleotidden meydana gelir. Oldukça küçük, kısmen çift (~% 70), kısmen de tek iplikli (~% 30) çembersel DNA'dan oluşur. İkozahedral bir kapsid içerisinde bulunur. HBV bir DNA virüsü olmasına karşın revers transkriptaz (RT) enzimi kodlar ve RNA aracısı üzerinden replike olur. HBV, enfekte hücre çekirdeğinde bir mini kromozom şeklinde bulunan ve kovalent bağlı çembersel DNA (covalently closed circular DNA, cccDNA) adı verilen replikasyon ve transkripsiyon aracısı moleküle dayanan karmaşık bir replikasyon stratejisine sahiptir. Zarflı bir virüs olmasına rağmen eter, düşük pH, ısı, dondurma ve çözmeye oldukça dirençlidir. Bu özellikler virüsün kişiden kişiye geçişteki etkinliğine katkıda bulunur ve dezenfektanlara direncini sağlar (22).

Dane partikülü içindeki genomun negatif zinciri tamdır ve bu ip tüm genomu taşır. Aksine, pozitif zincir 3'- ucu boyut olarak değişebilmekle beraber genomun 2/3 uzunluğunu içerir (23, 24). Viral polimeraz negatif zincire fosfotirozin bağı ile kovalent bağlıdır. Pozitif zincirin 5'-ucunda pregenomik RNA rezidüsünden kaynak alan kısa bir RNA oligomeri viral DNA sentezinin ardından kovalent bağlı olarak yer alır. Pozitif zincirin aksine negatif zincir, 8-9 nükleotid uzunluğunda ve r-bölgesi olarak adlandırılan hem 5'- hem de 3'- ucu olan küçük bir kalıntı içerir. Bu kalıntı yapılar viral replikasyon için esansiyeldir (25-27).

Viral genom; tümü negatif zincir tarafından kodlanan, 6 start kodonu, 4 promoter, 2 transkripsiyon güçlendirici element, 1 poliadenilasyon sinyal motifi ve birkaç adet DNA replikasyon sinyalinden oluşan 4 açık okuma bölgesi (Open Reading Frame = ORF) içerir. Tüm ORF'ler benzer bir oryantasyondadır ve en azından kısmi olarak örtüşmektedir. Bunlar S, C, X, P bölgeleridir. Bu dört gen bölgesi birbirleri ile iç içedir ve farklı bölgelerden okunmaya başlayarak farklı proteinlerin kodlanmasında rol alırlar (3). Genomdaki nükleotid dizilerinin yarısı, birden fazla mRNA sentezi için kullanılır. Ayrıca aynı ORF içerisinde birden fazla başlangıç kodonu bulunur. Bu şekilde birbiri ile ilişkili, birden fazla proteinin sentezi sağlanır. Genom içerisinde bu proteinleri kodlayan genler şunlardır:

1. S (Pre S1, pre S2 ve S) geni: Viriondaki zarf proteini (HBsAg) ve diğer partiküllerdeki inkomplet HBsAg' ini kodlar. Bunlar sırası ile S dizisi, preS2+S dizisi

ve preS1+ preS2 +S dizisi tarafından kodlanan 24.000 (S-küçük), 33.000 (M-orta) ve 39.000 (L-büyük) daltonluk proteinlerdir.

2. P (Pol) geni: Proteinleri kodlayan en büyük gendir. DNA polimeraz, revers transkriptaz ve RNaz H aktivitesine sahip olan viral polimeraz enzimini kodlar.

3. C (Özyapı, core) geni: İki ayrı protein sentezletir. Bunlar; 21 kD'luk çekirdek proteinini (HBcAg) kodlar ve bu proteinin 30 aminoasitlik pre C ürününü taşıyan 16 kD 'luk bölümü enfektivite proteini olan (HBeAg)' dir.

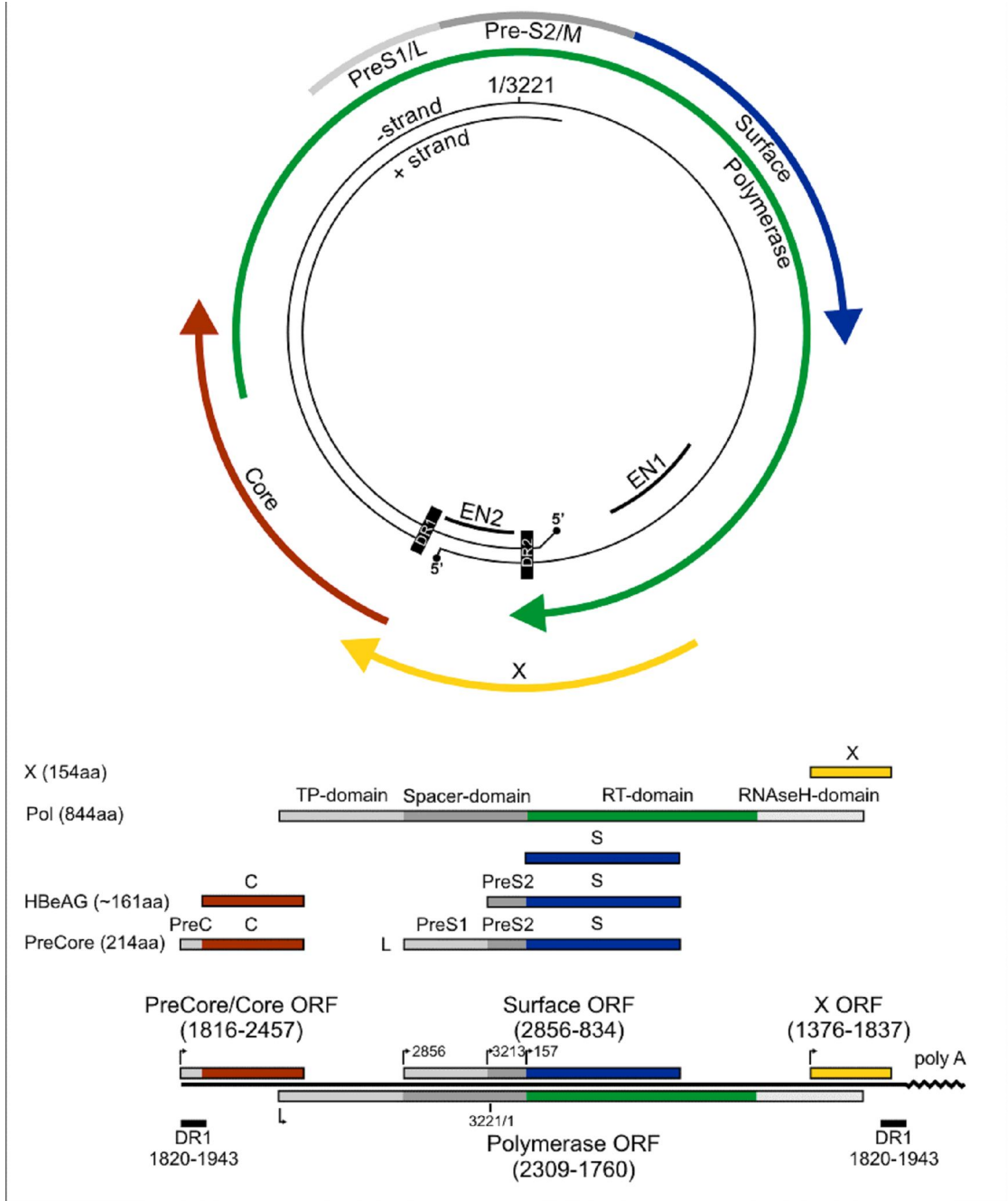
4. X geni: X proteinini kodlar. Özyapı (core, C) ve X ORF'leri de zarf ORF'si ile kısmi olarak üst üste binmiş şekilde bulunur (19).

Translasyon C başlangıç kodonundan başladığında tam uzunluktaki C polipeptidi (HBcAg) sentezlenir. Ancak, sentez pre C başlangıç kodonundan başladığında ise (HBeAg) proteini açıklatılır. Bu olay pre C dizisinin sinyal dizisi gibi davrandığını düşündürür. Pre C dizisinde, stop kodon mutasyonu taşıyan HBV mutantlarında HBeAg sentezlenememekte, ancak HBcAg sentezlenmektedir. Bu mutant suşlar fulminan hepatit patogeneğinde önem taşımaktadır (28).

Core proteini nükleokapsid oluşumu için esansiyel iken, tüm core genini içeren e antijeni de pre-core/core bölgesinden sentezlenen ürünün proteolizi ile posttranslasyonel olarak oluşur. Bu protein non-esansiyel bir protein olarak virüs-konak immün etkileşiminde önemlidir ve aktif viral replikasyonun bir göstergesidir (15). Core proteinlerinin subviral ikozahedral partikülleri meydana getirmesi için; protein ünitelerinin disülfid bağları ile stabilize edilerek dimerleşmesi ve dimerlerin bir çekirdek yapı oluşturması gereklidir. HBeAg'nin ilk bölümü molekülün endoplazmik retikulum lümenine taşınması için bir sinyal peptidi görevini yapar. Karboksi terminalinden 29 aminoasit golgi aygıtında çıkarıldıktan sonra, olgunlaşan HBeAg kana salınır. HBx proteini ise indirekt etkiyle viral ve bazı hücrel genlerin transkripsiyonunu arttırabilme özelliği taşır (29).

Viral polimeraz, HBV genomu tarafından kodlanan tek bir enzimdir ve RNazH aktivitesine sahip bir RNA bağımlı DNA polimerazdır. HBV polimeraz 3 fonksiyonel bölge ile “ara bölge” de denilen N-terminalinde lokalize, negatif zincir sentezinde bir primer olarak görev alan “terminal proteinden” (TP) oluşur. C-terminali ara bölge ile ayrılır ve RT-polimeraz ve RNazH şeklinde görev yapar (15). Üç yüzey proteini; L, M ve S, C terminallerinin s domainlerini paylaşırlar ve 3 start

kodonunu (L için bir, preS1; M için bir, preS2; S için bir preS3) kodlayan bir ORF ile kodlanırlar. Nükleus ve iskeletle ilişkisi olmasına rağmen X proteininin fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir. Fakat uygun in vivo enfeksiyon oluşması için hepatit B X *proteini* gerekmektedir (30, 31).



Şekil 2. HBV genomik organizasyonu ve sentezlenen RNA'lar (15)

1.1.4. Hepatit B Virüsü Replikasyon Siklusu

Hepatit B virüsü çok hızlı replike olabilen bir virüstür ve günde 10^{11} - 10^{13} virüs salınır (32). Kronik HBV enfeksiyonunda her gün vücutta bulunan virüslerin % 50'si yeniden oluşur. Virüsün plazma yarı ömrü yaklaşık 4 saattir ve hepatosite girdikten sonra replikasyonu 17 saat - 1,5 gün kadar sürer (33). HBV replikasyonu sitopatik değildir ve hücrede belirgin morfolojik değişiklik yapmaz. Üretken enfeksiyon çok kısıtlı hücrede gerçekleşir ve HBV'nin tek kanıtlanmış replikasyon bölgesi hepatositlerdir. Safra kanalı epitel hücreleri, pankreasın bazı endokrin ve ekzokrin hücreleri, böbrek ve lenfoid doku da enfeksiyon hedefi olabilir. Fakat hepatosit dışı replikasyon bölgelerinin viral patogeneze rolü olmadığı düşünülmektedir. Lenfositlerdeki replikasyon virüs persistansı için ikincil bir rezervuar olabilir (19).

Uzun yıllardır devam eden HBV araştırmalarına rağmen, HBV veya başka bir *Hepadnaviridea* üyelerinin üretimi için uygun hücre kültürleri tanımlanmamıştır. *Hepadnaviridea* ailesinin replikasyon siklusu üzerindeki çalışmalar primer hepatositlerle yapılan küçük serilerle sınırlıdır (34-36). Fakat intakt karaciğerden alınan bu primer hepatositler ancak kısa bir süre çalışmak için uygundur. Günümüzde viral giriş ve hepadnavirüs konak spektrumunun, virüsün geniş yüzey antijeninin N-terminaline bağlı olduğu varsayılmaktadır (37-41). Ayrıca, intrinsik HBV reseptörü bilinmemektedir. Fakat primer ördek hepatositlerindeki DHBV çalışmalarında, virüsün hücreye 16 saati bulan yavaş alımı, hücre başına yaklaşık 10^4 reseptör molekülünün hızlı bağlanmaya aracılık ettiği varsayılmaktadır (42, 43). Hepatosite giriş ve uncoating'i (virüsün zarını bırakması) takiben, viral nükleik asidinin salındığı nükleokapsid hücrenin çekirdeğine transport olur. Viral DNA salınımının ve nükleokapsidin disintegrasyonunun nükleer core kompleksinde gerçekleştiği kabul edilir (44).

Hepatit B virüsü replikasyonu genomun asimetric yapısı, endojen polimeraz ve revers transkriptaz reaksiyonları nedeniyle özellik gösterir. DNA replikasyonu bir RNA kalıbı aracılığı ile revers transkripsiyonla olur. Virüsün karaciğer hücrelerine tropizmi vardır. Bu tropizm bazı viral faktörlerle düzenlenir (3). HBV'nin hepatositleri enfekte etmesiyle uyumlu olarak, viral genom transkripsiyonunu regüle eden neredeyse tüm elementlerin transkripsiyon faktörlerinin bağlanması için

karaciğer spesifik bağlanma bölgeleri vardır (45, 46). Viral transkripsiyonu regüle eden en azından birkaç faktör ve etkileşim bilinmesine rağmen, HBV transkripsiyonunun kesin mekanizması belirsizliğini korumaktadır. Ancak viral transkripsiyonun nükleusta gerçekleştiği bilinmektedir. Hem mRNA hem de pregenomik RNA'lar sırayla tercüme edildikleri veya yavru genom üretimi için model olarak kullanıldıkları sitoplazmaya taşınır. Sitoplazmada çeşitli kinazlarla fosforile edilebilen core proteini nükleokapsidin temelini oluşturur. Bu protein pregenomik RNA'nın bağlanması ve paketlenmesi, viral polimerazın göçü ve böylece RT-polimeraz/RNA kompleksinin yeni oluşan nükleokapsidlerle beraber reverse transkripsiyonu başlatmasında aktif rol oynar (47-52). HBV' nin 3 yüzey proteininin iki major özelliği vardır. Birincisi, bunlar transmembran proteinleri gibi viral zarf içinde bulunurlar yani virüsün yüzeyinde lokalizedirler ve günümüzde henüz bilinmeyen viral reseptöre bağlanmadan sorumludurlar. İkinci olarak, bu üç yüzey proteini fonksiyonel nükleokapsid içermeyen subviral partikül olarak salgılanırlar. Proteinler, L ve M proteinlerinde daha uzun olan N-terminallerindeki proteinlere bağlı olarak değişkenlik gösterirler. Tüm proteinler ortak bir S domaini, ek olarak preS2' nin de olduğu M domaini ve hem preS1, hem de preS2'nin bulunduğu L domaini bulundururlar. Memeli *Hepadnaviridea*'ların yüzey proteinlerinin N- ve O- glikozile olduğu gösterilmiştir (53-57). Bu glikozilasyonlar yavru viral genomların uygun şekilde salgılanmasından sorumlu tutulmuştur. Bu nedenle de glikozilasyon inhibitörleri terapisi için yeni bir hedef olabilmektedir (15).

Hepatit B virüsü replikasyonu hepatosite tutunma ile başlar ve virüsün salınımına kadar çeşitli aşamalar gösterir. Virüsün tutunması ve hücre içine girişi hepatosit reseptörü ile virüsün preS proteini etkileşmesiyle olur. PreS1 ve preS2 proteinlerinin hepatosite özgü bölümleri tanımlanmıştır. PreS1 proteininin 3 -77. aminoasitleri viral enfektivite ile ilişkilidir. 10-36. aminoasitleri arasındaki bölgenin HepG2 hücrelerine tutunduğu gösterilmiştir (58, 59). PreS2, serum albüminine bağlanır ve hepatosite bağlanmada albümini aracı olarak kullanır. Viral tutunmayı takiben membran füzyonu ile nükleokapsid sitoplazmaya girer, pasif difüzyon veya tübüler taşınım ile çekirdeğe taşınır. Viral replikasyonun başında viral polimeraz enzimi, pozitif ipçiğin 5' ucuna tutunmuş olan kısa RNA dizisinden başlayarak pozitif ipçiği tamamlar. Daha sonra polimeraz, oligonükleotid RNA ve negatif

ipçikteki 8 nükleotitik (nt) fazla diziler molekülden ayrılır. Her iki ipçik 3' ve 5' uçlarından birbirine bağlanarak kovalan bağlarla kapanmış halkasal DNA (covalently closed circular DNA = cccDNA) yapısı oluşur (19). cccDNA viral genlerin transkripsiyonu için kalıp görevi yaparken, kimyasal ve yapısal olarak bir ekstrakromozomal epizomal DNA olarak görev yapar. Bu yapı plazmid-benzeridir (58) ve enfeksiyonun başladığını gösterir. Virüs enfeksiyonu başladıktan 24 saat sonra karaciğerde cccDNA varlığı gösterilmiştir. cccDNA oldukça stabil bir yapıdır ve hepatosit içinde DNA giraz ile topoizomerazların etkisiyle süpersarmal oluşturur. Enfekte hepatositlerde yaklaşık 25-50 kopya bulunan cccDNA'nın yarı ömrü 14-50 gün kadardır. Hepatosit çekirdeğindeki cccDNA rezervuarı, HBV enfeksiyonunun persistansında en önemli faktördür (15). Sentezlenen HBsAg ise cccDNA oluşumunu inhibe eder. Bunlar virüs replikasyonunun (+) ve (-) feed back mekanizmaları olabilir.

cccDNA'dan hücresel RNA polimeraz II enzimi kullanılarak 4 tip mRNA sentezlenir.

1. 3.5 kb mRNA: Genomdan daha büyük olan bu mRNA, hem genom replikasyonu için kalıp görevi görür hem de precore/core ve polimeraz proteinlerini sentezletir.

2. 2.4 kb mRNA: Üç ayrı başlangıç kodonu aracılığı ile büyük, orta ve küçük yüzey proteinlerini sentezletir. mRNA'nın amino terminalindeki başlangıç kodonundan başlayan sentez ile preS 1, preS2 ve S proteinlerini içeren büyük (L) yüzey proteini oluşur. Orta (M) yüzey proteini, ikinci okuma kodonundan başlayarak sentezlenir; preS2 ve S proteinlerini içerir. Küçük (S) yüzey proteini en küçük protein olup, üçüncü başlangıç kodonundan başlayarak sentezlenir.

3. 2.1 kb mRNA: Sadece preS2 ve S proteinlerini sentezletir.

4. 0.7 kb mRNA: X proteinlerini sentezletir.

Sentezlenen mRNA'lar sitoplazmada P, C, preS/S ve X gen ürünlerinin sentezini sağlarlar. Bu sırada 3.5 kb mRNA'ların bir kısmı selektif olarak P gen ürünleri ile birlikte, yeni sentezlenen çekirdek (core) partikülleri içine yerleşirler. Bu RNA'lar genom sentezinde kullanıldığı için pregenomik RNA (pgRNA) olarak adlandırılır (3, 19).

Major RNA transkriptleri poliadeniledir, 3' uçları ortaktır ve C genindeki poliadenilasyon sinyali ile oluşturulur (61).

Hepatit B virüsü'nün mRNA sentezini yöneten dört promoter bölgesi vardır. Bunlar: PreC/C, PreS 1, S ve X promoter'lardır. Bu promoter bölgeleri, farklı başlangıç kodonlarını kullanarak yedi ayrı proteinin sentezlenmesini sağlar. Bu bölgelerin aktivitesi de, genomun (enhancer) Enh I ve Enh II olarak adlandırılan bölgeleri tarafından düzenlenir. Hepatositlerde bulunan bazı moleküller bu bölgelerin güçlü aktivasyonunu sağlar. Bu nedenle HBV hepatositlerde daha güçlü replike olmaktadır. "Core promoter" bölgesi viral replikasyonun merkezidir ve pregenomik RNA (pgRNA) olarak adlandırılan 3.5 kb'lık en büyük RNA'yı sentezletir. pgRNA Poli-A kuyruğu taşıdığı için viral genomdan yaklaşık 150 nt daha büyüktür (62). pgRNA, hem revers transkripsiyonla viral genom sentezi için kullanılır, hem de diğer mRNA'lar gibi translasyona uğrayarak çekirdek proteini (HBcAg), HBeAg ve polimeraz proteinlerini sentezletir (19).

Hepadnaviral genom tarafından kodlanan tek enzim olan viral polimeraz, üç fonksiyonel domainden terminal protein, reverse transkriptaz, RNAaz H domaini ve bir de terminal domaini polimeraz domainlerden ayıran "ara domain" den oluşur. Terminal domain, reverse transkripsiyon için "primer" olarak da görev yapar (63). cccDNA oluşumundan önce yada oluşumu sırasında, terminal protein ve büyük ihtimalle hücrel ligazlara yada başka enzimlere bağlı olarak ancak tam anlaşılabilen bir mekanizma ile cccDNA oluşur. Hücrel DNA tamir mekanizmalarının aktive olduğu ve gevşek sirküler formu, cccDNA ya çevirdiği kabul edilmektedir (15). pgRNA önce 200-300 molekül HBcAg sentezletir, sonra polimeraz sentezine izin verir. Polimeraz sentezi pgRNA'nın "core" bölgesi içinde kalan başlangıç kodonundan başlar. Polimerazın sentezlenmesi pgRNA sentezini durdurur. pgRNA, 5' ve 3' uçlarda bulunan ikincil bir yapıya 'ε yapısı' kavuşur. 5' ucundaki ε kıvrımları viral polimeraz tarafından ilk olarak algılanan bölgelerdir ve başlangıç paketleme sinyali olarak görev yaparlar (64, 65). Böylece viral kapsit yapımı başlamış olur. Bu, ε yapısı, çekirdek içine bir kopya nükleik asit yerleşmesini sağladığı gibi viral DNA sentezini başlatmada da rol oynar (66). HBcAg, ikişer ikişer bir araya gelir ve disülfid bağları ile stabilize olur. Bu birimlerden 180-240 tanesi

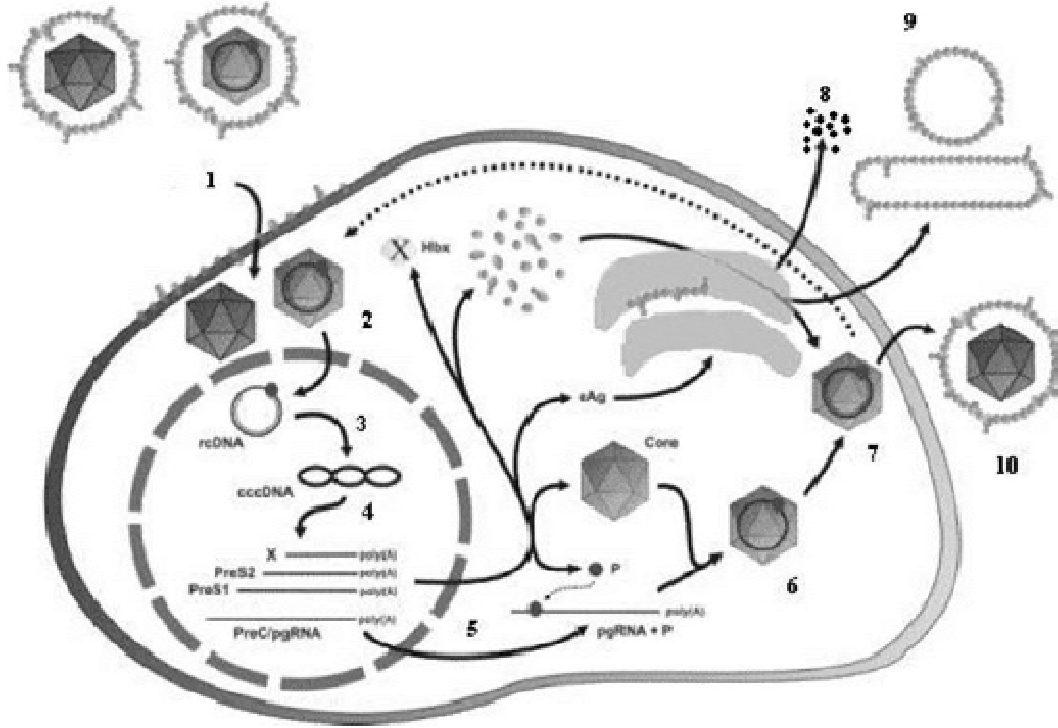
biraraya gelerek ikozahedral kapsidi oluşturur. PgRNA'dan revers transkripsiyon ile negatif DNA ipçığının sentezi; hücre sitoplazmasında, viral kapsit içinde gerçekleşir.

Negatif DNA zincir sentezi, terminal protein domaininin tirozin Y65 rezidüsü ile dGMP arasındaki kovalent bağ oluştuktan sonra başlar. Başlangıçtaki bu dGMP yi takip eden birkaç nükleotid, ϵ yapısının küçük bir parçasını tamamlar (67). Ardından küçük terminal protein bağlı primer, bilinmeyen bir mekanizma ile 3' ucuna transloke olur ve sürekli kovalent bağlı olarak kalır. Bu süreç yeni oluşan nükleokapsiddeki yavru genomun doğru katlanması için olası bir ön şarttır. Son olarak, sentez sırasında enzimin C-terminalinde bulunan RNaz H bölgesi, pgRNA yıkımını da gerçekleştirir. Ancak enzimin revers transkriptaz ve RNaz H aktiviteleri gösteren katalitik bölgeleri arasındaki 18 nt'lik mesafe nedeniyle pgRNA'nın 5' ucundaki 18 baz yıkılamaz ve sentezlenen negatif ipçiğe bağlı olarak kalır. Bu negatif zincir, reverse transkripsiyon reaksiyonu ile bütünüyle sentezlenir (3).

Takip eden pozitif zincir sentezi, pgRNA'nın 5' ucundan kalan 18 nt'lik RNA tarafından başlatılır (68). Pozitif ipçiğin boyu değişkendir ve kapsidin zarflanma zamanı ile ilişkilidir. Zarf yapısı dNTP geçişine izin vermez, bu nedenle kapsid içindeki dNTP miktarı pozitif ipçiğin boyunu belirler. Viral kapsid önemli bir replikasyon makinesidir. Bu sayede HBV viriyonlarının hepsi enfektif olarak sentezlenir (15).

Kısmi çift iplikli DNA molekülü oluştuğunda nükleokapsid partikülleri, endoplazmik retikuluma tomurcuklanma ile zarf yapılarını kazanmalarına imkân sağlayacak olgunlaşma sürecine girerler. Oluşan nükleokapsidlerin bir kısmı hücre çekirdeğine geri dönerek hücre içindeki cccDNA kopya havuzunu artırma işlevi de yapabilmektedir. Core proteinlerinin LHBsAg amino terminali kısmına bağlanmaları partiküllerin endoplazmik retikulumdan tomurcuklanmasına neden olur. Her üç zarf proteinlerini içeren virionlar endoplazmik retikulum'dan golgi kompleksine taşınır. Bu aşamalar sırasında zarf proteinlerinin glikozilasyonu tamamlanır ve olgun virion kan dolaşımına salınır (29). cccDNA'nın enfekte hepatositlerde stabil kalabileceğine dair kanıtların varlığı ve bu durumun da kronik HBV enfeksiyonuna katkıda bulunabileceği varsayılmaktadır. Bu ise cccDNA pozitif hücre eliminasyonunun uzun dönem tedavilerde önemli olabileceğine göstergeci. Son replikasyon basamağı,

HBV Dane partiküllerinin birleşmesi ve salınıdır. Bu aşama tam olarak anlaşılammıştır (15).



- | | |
|--|---|
| 1. Tutunma, adsorpsiyon ve penetrasyon | 2. Özyapının (core) çekirdeğe taşınması |
| 3. cccDNA'nın oluşması | 4. Transkripsiyon / viral RNA'lann sentezi |
| 5. Translasyon / viral proteinlerin sentezi | 6. Pre-genomik RNA ve viral polimerazın enkapsidasyonu |
| 7. Revers transkripsiyon ile DNA sentezi | 8. HBe antijeni salınımı |
| 9. Sferik ve filamentöz partiküllerin salınımı | 10. Olgun, enfeksiyöz viriyonun (Dane partikülü) salınımı |

Şekil 3. HBV replikasyonunun şematik gösterimi

1.1.5. Hepatit B Virüs Enfeksiyonları İçin Hayvan Modelleri

Yukarıda bahsedildiği gibi, viral enfeksiyonların biyolojilerini ve klinik özelliklerini çalışmak için uygun model sistemlerinin kullanılması oldukça önemlidir. Ancak, dar konak spektrumuna bağlı olarak bu seçenek HBV çalışmaları için sınırlıdır HBV primer hepatosit dışında replike olmamaktadır. Dolayısı ile, dünyadaki birçok araştırmacı HBV enfeksiyonunun en azından bazı aşamalarını kısmen üretmek için hayvan modelleri ve hücre kültür sistemlerinin geliştirilmesine çalışmaktadırlar (15).

1.1.6. Hepatit B Virüsü'nün Epidemiyolojisi

Tüm Dünya'da akut ve kronik HBV enfeksiyonu önemli bir halk sağlığı problemi oluşturmaktadır. Afrika, Asya ve Pasifik kıyılarında HBV'ye bağlı hastalıklar en önemli üç ölüm nedeninden biridir. Dünya üzerinde yaklaşık iki milyar kişi HBV ile karşılaşır, bunların 400 milyonu kronik enfektedir ve yılda 500.000-1.200.000 kişi siroz ve hepatosellüler karsinom (HCC) gibi HBV ile ilişkili nedenlerle ölmektedir. Dünya'daki HCC olgularının %60-80'i HBV ile ilişkilidir. Bu enfeksiyon açısından kırsal kesimde oturanların daha fazla risk altında olduğu belirtilmektedir (69). Enfeksiyonun dünyadaki dağılımı coğrafi bölgelere göre düşük, orta ve yüksek olmak üzere 3 bölgeye ayrılmıştır. Sınıflandırmada; bölgedeki HBsAg ve anti-HBs pozitifliği oranları, enfeksiyonun alınma yaşı ve virüsün en sık hangi yolla bulaştığı göz önünde bulundurulmuştur. HBsAg pozitifliği Dünya genelinde % 0.1-20 arasında değişmektedir (70).

Hepatit B virüsü endemisinin düşük olduğu bölgelerde (ABD, Kanada, Batı Avrupa, Avustralya, Yeni Zelanda) HBsAg pozitif olanların prevalansı % 0.1-2'dir. Ancak bu bölgelerdeki eşcinsellerde, çok eşli heteroseksüellerde, damar içi uyuşturucu bağımlılarında, Eskimolar'da, Yeni Zelanda Maorileri'nde, Avustralya yerlilerinde ve Amerikalı zencilerde enfeksiyon oranı yüksektir. Enfeksiyon genellikle yetişkin çağda kazanılır. Erişkinler için enfeksiyonla karşılaşma oranı % 20'yi geçmez. Cinsel temas ve perkütan temas en önemli bulaş yoludur. Ancak perinatal ya da erken çocukluk döneminde alınan enfeksiyon, HBV enfeksiyonuna önemli ölçüde kaynaklık eder (70).

Enfeksiyonun epidemiyolojisine etki eden faktörlerden biri de HBV'nin genotipleridir. Enfeksiyon açısından düşük endemik bölgeler olan Kuzeybatı Avrupa ülkelerinde virüsün baskın genotipi genotip A'dır (71). Orta endemik bölgelerde (Japonya, Orta Asya, Orta Doğu, Orta Amerika) HBsAg pozitifliği % 2-5 oranındadır. Yetişkinlerin % 20-60'ında anti-HBs pozitifdir. Enfeksiyon çoğunlukla çocukluk, ergenlik ve genç erişkinlik döneminde alınır. Başlıca bulaş yolu perkütan ya da horizontaldir. Özellikle Akdeniz ülkelerindeki annelerde HBeAg pozitifliği az olduğu için perinatal bulaş nadirdir. Bu bölgelerden Batı Amazon bölgesinde HBV'ye bağlı fulminant hepatit siktir ve enfeksiyonun en önemli geçiş yolu cinsel temastır. Baskın HBV genotipinin genotip F ve H olduğu belirtilmektedir (72).

Yüksek endemi bölgelerinde (Sahra altı Afrika, Güneydoğu Asya, Çin, Alaska) HBsAg pozitifliği % 5-20 oranındadır ve erişkinlerde HBV ile karşılaşma oranı %70-90 kadardır. Enfeksiyon sıklıkla kronikleşme riskinin yüksek olduğu yenidoğan ve erken çocukluk döneminde kazanılmaktadır. Bu dönemde asemptomatik enfeksiyon geçirilmesi nedeniyle akut hastalık tanısı az, fakat kronik karaciğer hastalığı ve hepatosellüler kanser oranı yüksektir. Maternal, perinatal ve horizontal bulaş ana bulaş yoludur. Asya'da perinatal bulaşma, Afrika'da horizontal bulaşma ön plandadır. Dünya'da yılda beş milyondan fazla akut hepatit B olgusu ortaya çıkmaktadır. Akut enfeksiyondan sonra yetişkin hastaların % 5'i kronik olarak enfekte kalmaktadır. Eğer enfeksiyon 1-5 yaş arası alınmışsa kronikleşme % 20-50 olmaktadır. Hepatit B'de HBV DNA pozitifliği ile giden gizli HBV enfeksiyonuna ve izole olarak HBV core antijenine karşı total anikorların (anti-HBc total) pozitifliğine de sık rastlanılmaktadır. İngiltere ve ABD'de izole anti-HBc total pozitifliği olan kişilerin de önemli bir kısmında HBV DNA negatif tespit edilmiştir. Gizli HBV enfeksiyonu daha önce HBV enfeksiyonu geçirip iyileşenlerde % 18 oranında, geçirmeyenlerde % 8.1 oranında bulunmuştur (70, 73).

Orta endemik ülkeler arasında yer alan ülkemizde HBsAg pozitifliği % 1- 14.3 arasında bildirilmiştir. İstanbul ve İzmir gibi Batı illerinde %3- 4.5 gibi daha düşük oranda HBsAg pozitifliği bildirilirken Diyarbakır, Elazığ, Van gibi Güneydoğu ve Doğu Anadolu illerinden %8- 14.3 gibi yüksek oranlar bildirilmiştir (29).

1.1.7. Hepadnavirüs Enfeksiyonlarının Patogenezi

Hepatit B virüsü ve diğer hepadnavirüs ailesi üyelerinin geçişi, vücut sıvılarının değişimi ile vertikal ve horizontal olarak gerçekleşir. Serumda ya da vücut sıvısının her ml'sinde maksimum 10^{10} - 10^{12} genom kopyası bulunabilir. Kronik enfeksiyonlarda +/-1 \log_{10} kadar doğal dalgalanmalar görülebilir (74). Kronisite oranı çalışmaya bağlı olarak, neonatal enfeksiyonlarında >% 90, erişkin enfeksiyonlarında yaklaşık % 10-15'tir. Transfüzyona bağlı ve nozokomiyal bulaş riski optimum moleküler tanı yöntemlerinin geliştirilmesi, daha sıkı hijyen ve yasal düzenlemelerle son iki dekada azalmıştır fakat sağlık çalışanlarının dikkatsiz davranışlarına bağlı bulaş hala önemli düzeydedir.

Hepatit B virüsü konağa girdiğinde major hedef hücresi olan hepatosite, replikasyonun ve persistansın temel yerine ulaşır ve neredeyse tüm hepadnavirüsler

farklı düzeyde karaciğer tropizmi gösterirler. Daha da ötesi, diğer hücre tipleri memeli hepadnavirüsleri için non-hepatik rezervuar durumundadırlar. İmmünkompetan konağın enfekte karaciğerinde sitotoksik T lenfositleri (CTL) tarafından gerçekleştirilen sürekli bir hepatosit hasarı vardır, bu da kollajen fiberlerinin aralıksız şekilde ekspresyonuna yol açarak ağır seyirli ve tedavi edilmemiş vakalarda siroza neden olur (75-77). Bu nedenle, HBV'nin hepatosit için sitotoksik olduğuna dair bir kanıt bulunmadığını belirtmek yerinde olacaktır. Karaciğeri enfekte eden diğer virüslerin aksine HBV, enfeksiyon durumunda sitopatik etkiyi uyarmaz (78-80). Karaciğer hasarının (fibrozis, siroz ve muhtemelen hepatosellüler kanser) devam eden immün reaksiyon ve karaciğerdeki sürekli inflamasyonu tarafından uyarıldığı düşünülmektedir. Sonuç olarak genelde enfekte hepatositin ölümüyle sonuçlanan masif sitotoksik T lenfositleri (CTL) ve naturel killer hücreleri (NK) hücre aktivasyonu enfeksiyonun eliminasyonun da esansiyel olarak kabul edilir (81-83). Enfeksiyonun kronikleştiği vakalarda, başlangıç immün yanıt oldukça zayıftır ve enfeksiyonu kontrol etmede yetersizdir. Enfeksiyonun akut fazdan kronik faza geçme mekanizmaları şimdiye kadar belirsizliğini korumuştur yani viral siklusun bu konuyla ilgili kısmı hakkındaki yorumlar sadece spekülasyondan ibarettir. CD8 (+) CTL, NK ve sitokinleri (TNF alfa, IL-12, IL-15 vb) kapsayan yeterli bir Th1 cevabı, geçici enfeksiyonların baskılanmasında önemli bir yer tutmaktadır (15). Yalnızca S proteinine karşı oluşan antikorlar nötralize edici özellikte ve immünite için major belirteç olmasına rağmen, geçici enfeksiyonun interferon gamma ve immün hücrelerden salınan diğer sitokinler tarafından kontrol edildiği, böylece viral replikasyonun durdurulduğu düşünülmektedir. Fakat HBsAg'ye karşı oluşan antikorların nedeni sadece virüsü temizleyen hastalarda oluştuğunu açıklamaz (15).

1.1.8. Hepatit B Virüsü'nün Klinik Seyri

Virüsün hepatosite girmesinden sonra HBV enfeksiyonu, bazı immünolojik markerlerin belirlediği dört evrede gelişir.

Evre 1: İmmünotolerans ile karakterizedir. Hastalığın asemptomatik dönemi olup HBVDNA ve HBsAg'nin yüksek titrelerde bulunmasına karşın transaminazlar normal yada hafif yüksektir. Yenidoğanda onlarca yıl sürebilir. Virüs replikasyonu yüksektir. HBeAg / Anti-HBe serokonversiyonu enderdir. Hepatositlerdeki HBcAg

yalnızca hücre nükleusu içerisine yerleşmiştir. Karaciğer biyopsisi normal ya da minimal hepatit bulguları gösterir.

Evre 2: İmmünolojik yanıt dönemidir. Aktif, semptomatik hepatitle karakterizedir. Enflamatuar yanıt ile hücre harabiyeti gelişir. Sağlıklı erişkinde akut hepatit tablosu görülür. Enfekte hücre ölümü ile HBV-DNA ve HBsAg titresini daha düşük olmakla birlikte pozitif, transaminazlar ise yüksektir. Kronik olgularda bu dönem 10 yıl ya da daha fazla sürebilir HBcAg hepatosit sitoplazmasında da gösterilebilir. Hastaların çoğunda HBeAg devam etmektedir. Karaciğer biyopsilerinde belirgin enflamatuvar aktiviteye rastlanır.

Evre 3: Viral replikasyonun baskılandığı dönemdir. Konak immün yanıtı ile viral replikasyon sonlanır. HBeAg kaybolur, anti-HBe ortaya çıkar. Hepatositlerde HBcAg görülmez. HBV-DNA negatifleşmiştir. Aminotransferazlar normal düzeye iner. HBV bu dönemde hepatosit DNA'sına entegre olur ve hastalarda HBsAg halen pozitifdir. Konak immün yanıtının gelişmesi ile karakterizedir. Karaciğer biyopsilerinde nekroenflamatuvar aktivitenin azalmış olduğu dikkati çeker. Minör derecede iltihap ve fagositik aktivite enfeksiyonun başlangıcından sonra bir yıl hatta daha uzun kalabilir.

Evre 4: Virüsün klirensi ve immünitenin tam oluşması ile karakterizedir. HBsAg (-), anti-HBs (+), HBV-DNA (-), anti-HBc (+), HBeAg (-), anti-HBe (+) olup transaminazlar normaldir. HBV ile enfekte olan kişilerde bu dönemlerin gelişmesi bazı faktörlerle etkilenir. Genetik özellikler, diğer virüslerle enfeksiyonlar, immünosupresyon, cinsiyet ve HBV mutantları gibi faktörler, enfeksiyonun bu dönemlerden birinde duraklamasına neden olarak kronik enfeksiyon gelişimine yol açar (3, 87).

Hastalarda görülen klinik tablo, asemptomatik enfeksiyondan fulminan hepatite ve hepatosellüler karsinoma kadar uzanır. HBV enfeksiyonu klinikte şu tablolar ile görülür:

1.1.8.1. Akut Enfeksiyon

Akut hepatit B (AHB), HBV ile karşılaşılmasını takiben, genelde 6 hafta ile 6 ay arasında değişen bir inkubasyon periyodundan sonra gelişmekte ve asemptomatik enfeksiyondan, fulminant hepatite kadar değişebilen bir klinik görünüm içerisinde seyretmektedir. Akut B hepatitinde başlangıç semptomları

iştahsızlık, bulantı ve kusma, halsizlik, karın ağrısı gibi spesifik olmayan belirtiler şeklindedir. Bu dönem 3-7 gün kadar sürer. Bu evrede bazı hastalarda serum hastalığına benzeyen ateş, artralji /artrit ve deri döküntüleri gelişebilir. Bu son belirtiler ikterin ortaya çıkması ile gerileyip kaybolurken halsizlik, iştahsızlık gibi yakınmalarda ağırlaşma gözlenir (84).

Akut HBV enfeksiyonu geçirenlerin %10-20'sinde antijen-antikor komplekslerine bağlı olarak ekstrahepatik belirtiler görülür. Bunlar; serum hastalığı benzeri sendrom, poliarteritis nodosa, membranoproliferatif glomerülonefrit ve çocuklarda papüler akrodermatittir. Birçok olguda yeterli immün yanıt ile virüs karaciğerden temizlenir ve iyileşme görülür. Oluşan anti-HBs antikorları kişiyi yeni enfeksiyonlardan korur (3). Kendi kendine sınırlanmış bir enfeksiyon kliniğinde, viral antijenlerin kaybından sonra ve antiHBs antikorlarının görülmesinden sonra dahi, kanda düşük düzeyde HBV DNA, tüm yaşam boyu olmasa da yıllar boyu saptanabilir (85).

Akut hepatit B geçiren bir hastada beklenen iyileşme süresi 6 aydan kısadır. Bu süre (6 ay) sonunda HBsAg pozitifliğinin devam etmesi durumunda enfeksiyonun kronikleştiği kabul edilir. Hastalığın akut evredeki klinik seyri ve kronikleşme olasılığı enfeksiyonun başladığı yaş ile yakın bir ilişki göstermektedir. Neonatal dönemde alınan bir enfeksiyonda kronikleşme oranı % 90 civarında iken bu oran çocuklukta % 10'a, erişkin hayatta ise % 1'e kadar düşmektedir. Bu ilişkinin dikkat çekici diğer bir yönü ise kronikleşen olguların çoğunun akut hepatit evresinin semptomsuz seyretmiş olmasıdır. Karşılaşılan kronik B hepatitli hastaların birçoğunun özgeçmişinde sarılık öyküsünün bulunmayışı bu nedene bağlıdır (84). Akut hepatit B enfeksiyonunun seyrinde bir diğer olası durum fulminant hepatittir. Precore ve core promoter mutasyonlarına sahip virüslerle fulminant seyir ve kronisite arasında bağlantı olabileceği bildirilmiştir. Ancak fulminan hepatit patogenezinde tek faktörün bu olamayacağı, konağa ve virüse bağlı pek çok faktörün düşünülmesi gerekliliği kanısına varılmıştır (86). Akut HBV enfeksiyonuna eşlik eden HCV veya HDV enfeksiyonu durumunda da fulminan seyir olasılığının yüksek olabileceği göz ardı edilmemelidir. İkter başladıktan sonra genellikle 2 hafta içerisinde veya semptomları takiben ilk 8 hafta içerisinde gelişen hepatik ensefalopati, fulminan gidişin ilk bulgusu olabilir. % 0.1 civarında görülebilen bu klinik tabloda karaciğer

yetmezliği ve ensefalopati ile birlikte yüksek mortalite oranı dikkati çekmektedir. Uykuya meyil, dalgınlık hali ve komaya kadar ilerleyebilen bilinç değişiklikleri, fizik muayenede flapping tremor, karaciğerde küçülme, serum transaminaz düzeyinde ani azalma, protrombin zamanında uzama, oligüri, azotemi ve asit gelişmiş olması önemli bulgulardandır. Ayrıca ateş, lökositoz, hemorajiler ortaya çıkabilir (87).

1.1.8.2. Kronik Enfeksiyon

Altı aydan uzun süre devam eden HBsAg pozitifliği “kronik hepatit B enfeksiyonu” olarak tanımlanır. Viral replikasyon karaciğerde devam eder ve hem karaciğer, hem de kanda titresi değişmekle birlikte viremi devam eder. Karaciğerde hepatosit ölümüne eşlik eden inflamatuvar infiltratların varlığı kronik viral hepatit için karakteristiktir. HBV enfeksiyonunun kronikleşme olasılığı, etkenin bulaşım yoluna göre değişiklik gösterir. Yüksek endemik bölgelerde enfekte anneden yenidoğana perinatal enfeksiyon ve erken çocukluk döneminde HBsAg pozitif aile üyelerine, temas sonucu horizontal enfeksiyon HBV bulaşındaki ana yolları oluşturur (3).

Enfeksiyonun kronikleşmesi ile yaş ve immün sistemin durumu arasında sıkı bir ilişki vardır. Doğumda enfeksiyonu alan bebeklerde kronikleşme %80- 90, altı yaşın altında enfekte olanlarda % 30, erişkinlerde ise % 5-10 civarındadır. Kronik enfeksiyon riski; hemodiyaliz hastaları, organ transplantasyonu alıcıları ve kemoterapi hastalarında da yüksek bulunmuştur (3).

Kronik HBV enfeksiyonu genellikle asemptomatiktir ve hastalar genellikle enfekte olduklarının farkında değildirler. Bir kısım hastada halsizlik, yorgunluk bulantı, üst abdominal ağrı, kas ve eklem ağrıları gibi nonspesifik şikayetlere rastlanılabilir. Birçok hastada biyokimyasal testler normaldir. Karaciğer biyopsisinde normal histolojik yapı ya da portal alanda minimal mononükleer hücre infiltrasyonu görülebilir. Bu özellikteki kronik enfeksiyonlar kronik persistan hepatit olarak adlandırılır. Ayrıca hastalarda anksiyete başta olmak üzere bir takım psikiatrik semptomlar, endişe hali, düşüncelerini yoğunlaştırmada güçlük, kas gerginliği, uyku bozuklukları, depresyon görülebilir. Bu bulguların hastaların yaşam kalitesini olumsuz etkilediği, mental ve genel sağlık skorlarında düşüklüğe sebep olduğu gösterilmiştir (87).

Yenidoğan ve infant döneminde enfeksiyon kazanıldığında, % 95 civarında kronikleşme görülürken, neonatal periyod sonrası ilk 6 yaş içerisinde bu oran % 30

civarındadır. İmmun tolerans dönemi olarak da adlandırılan bu dönemde virüsle enfekte hepatositlere karşı yeterli immün cevap oluşmadığından virüs yüksek miktarda çoğalmakta ancak, hepatositlerde hasar oluşmadığından transaminaz yüksekliği saptanmamaktadır. Bu hastalarda HBeAg pozitif olarak saptanır ve serokonversiyon olasılığı da çok düşüktür. HBeAg pozitif kronik hepatit olarak adlandırılır. HBV enfeksiyonu replikatif ve non replikatif (veya düşük replikatif) faz olmak üzere, virüs-konak ilişkisine dayalı dinamik bir seyire sahiptir. Düşük endemi gösteren bölgelerde enfeksiyon primer olarak adolesan ve erişkin çağda, cinsel ilişki veya intravenöz ilaç bağımlılığı, kan transfüzyonu gibi yollarla kazanılır. Bu şekilde erişkin çağda akut HBV enfeksiyonu geçirildiğinde ise, hastaların sadece % 3-5 kadarında ve özellikle erkek hastalarda kronik HBV enfeksiyonu gelişir ve genellikle asemptomatik seyreder. Kronik enfeksiyon gelişme oranındaki bu farklar büyük olasılıkla, etkenle karşılaşıldığında konağın immün cevabının gelişimi ile ilgilidir. Bu olguların bir kısmında virüsün precore bölgesindeki mutasyon nedeni ile HBeAg yapılamaz. Bu durumda HBV DNA düzeyleri düşüktür veya saptanamaz, aminotransferazlar normal seviyededir. Bu klinik tablo "inaktif HBsAg taşıyıcılığı" olarak anılır. Eğer HBV DNA ve aminotransferaz düzeyleri yüksek ise HBeAg negatif kronik hepatit kliniği söz konusudur (87).

Kronik hepatit B enfeksiyonunun en önemli komplikasyonları siroz, portal hipertansiyon, asit, özofagus varis kanaması, hepatorenal sendrom ve hepatosellüler karsinom olarak sıralanabilir. Bu olguların % 15-20'sinde 5 yıl içerisinde siroza ilerleme görülürken, sirozlu hastaların % 20'sinde ise hepatosellüler karsinoma saptanır. Kronik HBV enfeksiyonu olan olguların her yıl % 1-10 kadarında spontan HBeAg/AntiHBe serokonversiyonu görülür ve genellikle karaciğer hastalığında alevlenme ile birlikte gelir. HBsAg kaybının görülme olasılığı ise yılda % 1-2 civarındadır (87).

1.1.9. HBV Enfeksiyonunun Tanısı

1.1.9.1. Serolojik Testler

Bir HBV enfeksiyonunda yapılacak ilk test, enfeksiyonun akut yada kronik olup olmadığını teşhis etmeye yöneliktir. HBV ile enfeksiyon oluştuğunda organizmada virüse ait çeşitli antijenlere (HBsAg, HBcAg ve HBeAg) karşı antikorlar meydana gelmektedir. HBV enfeksiyonlarının özgül tanısını yapmak

amacıyla hasta serumunda bu antijenlerin ve antikorların varlığı araştırılmaktadır. Bunların saptanması için günümüzde duyarlılığı, özgüllüğü ve verimliliği yüksek serolojik yöntemlerden faydalanılmaktadır. Bu amaçla başlangıçta RIA yöntemleri kullanılırken, bugün bunlar yerlerini ELISA testlerine bırakmışlardır. Bu testlerden; akut ve kronik enfeksiyonun ayrımında, enfektivitenin değerlendirilmesinde, bağışıklık durumunun tayininde, kan ve organ vericilerinin taranmasında yararlanılmaktadır (88).

HBcAg: Hem akut hem de kronik enfeksiyonlar da önemli ölçüde eksprese olur ve HBV enfeksiyonunun açık bir göstergesidir. Viral HBcAg dolaşıma katılmadığı ve sadece hepatositler içinde bulunduğu için serolojik olarak saptanamamaktadır. Anti-HBcAg antikorları sonucu pozitif çıktıktan sonra, yüzey antijenine (HbsAg) karşı oluşan antikorlar aranır. Negatif anti-HBcAg antikorlarının ve anti-HBsAg antikorlarının varlığı durumunda birey HBV'ye karşı başarılı şekilde aşılanmış demektir (15).

HBsAg: Akut enfeksiyon da semptomların başlamasından 3-5 hafta önce kanda saptanabilir düzeye ulaşır. İyileşmeyle sonlanan hastalık tablosunda, akut dönemde tepe düzeye ulaşır ve sonra 4-6 ay içinde yavaş yavaş azalarak saptanamayacak düzeye iner. HBsAg'nin saptanması HBV enfeksiyonu olduğunu gösterir; fakat akut ve kronik enfeksiyonu, viral partiküller ile non-enfeksiyöz partikülleri ayırt edemez. Akut enfeksiyondan sonra HBsAg'nin altı aydan fazla pozitif kalması kronik enfeksiyon geliştiğini gösterir. Bu hastalarda genellikle HBeAg de pozitifdir. Fulminan seyreden akut hepatitlerde HBsAg kandan hızla temizlenir ve virüsün üreyebileceği hepatosit kalmaması nedeniyle kanda antijen saptanamayabilir. HBV ve HDV ko-enfeksiyonlarında da HBsAg sekresyonu baskılanır ve saptanamayacak düzeylere inebilir. Çocuklarda HBV aşılmasını izleyerek kanda geçici olarak HBsAg pozitifliği saptanabilir. Bu durum olgunun izleminde diğer HBV göstergelerinin ortaya çıkmaması ve antijeneminin geçici olması ile ayırt edilebilir (3).

Kantitatif HBsAg kitleri ile yapılan çalışmalarda HBsAg düzeyinin serum HBV DNA düzeyi ile korele olduğu gösterilmiştir. Ancak lamivudin tedavisi alan hastalarda HBsAg miktarındaki azalma HBV DNA düzeyindeki düşüşe göre daha yavaş olmaktadır (89).

HBeAg: Akut enfeksiyonda HBsAg'yi izleyerek pozitifleşir, genellikle HBsAg'den önce kaybolur. HBeAg'nin pozitif olması kanda virüsün fazla miktarda olduğunu, aktif viral replikasyonu gösterir. HBeAg pozitif olan hastaların bulaştırıcılığı fazladır. Akut enfeksiyon da HBeAg pozitifliğinin 8- 10 haftadan uzun sürmesi, hastalığın kronikleştiğini gösterir. Kronik enfeksiyon da ise HBeAg'nin pozitif olarak devam etmesi, ağır karaciğer hastalığı gelişme riskini artırır. Enfeksiyon eskidikçe hastaların %50'sinde aktif viral replikasyon azalır ve HBeAg kaybolur, anti-HBe antikorları saptanır (3).

Anti-HBe: HBeAg'ye karşı antikorlar; erken nekahat döneminde, HBeAg'nin kaybolmasını takiben hemen veya 1-2 hafta sonra ortaya çıkar. Bazı olgularda çok kısa bir dönem HBeAg ile birlikte pozitif bulunabilir. Akut enfeksiyonda anti-HBe'nin saptanması, viral replikasyonun azaldığının göstergesidir ve hastalığın iyileşmeye yönlendiğinin habercisi olarak kabul edilir. Anti-HBe antikorları hastaların üçte birinde altı ay içinde saptanamayacak düzeylere iner; diğerlerinde ise 4-6 yıl kadar devam eder. Anti-HBc ve anti-HBs antikorlarıyla birlikte saptanması, yakında geçirilmiş akut HBV enfeksiyonunu gösterir. Kronik HBV enfeksiyonunda anti-HBe antikorlarının oluşması da, enfektivitenin ve viral replikasyonun azaldığının göstergesi olarak kabul edilmekteydi. Ancak "precore" mutantları varlığında, HBeAg sentezi durmasına karşın viral replikasyon sürmekte ve anti-HBe ile beraber HBV DNA pozitifliği görülmektedir. Kronik HBV enfeksiyonunun da tedavi ile HBeAg'nin kaybolması, anti-HBe antikorlarının oluşması hedeflenmektedir. Bu nedenle anti-HBe, tedavi izleminde HBsAg ve HBV DNA ile birlikte önemli bir göstergedir (3).

Anti-HBcIgM: Akut HBV enfeksiyonunun göstergesidir. Akut enfeksiyon da hastalık belirtileri ile birlikte pozitifleşir, erken nekahat döneminde tepe düzeyine ulaşır ve 3-12 ay içinde azalarak saptanamayacak düzeye iner. Anti-HBcIgM; HBsAg pozitifliğinden 1-4 hafta sonra saptanır ve bazen akut HBV enfeksiyonunun tek göstergesi olarak bulunabilir. "Pencere dönemi" olarak adlandırılan bu dönemde HBsAg ve HBeAg kaybolmuş, fakat bu antijenlere karşı antikorlar henüz saptanabilir düzeye ulaşmamıştır. Bu dönemde HBV enfeksiyonunun tek göstergesi; anti-HBcIgM pozitifliği veya onunla birlikte anti-HBcIgG antikorları olarak saptanır. Pencere dönemi ortalama 2-8 hafta kadar sürer. Bazen bir hafta kadar kısa olduğu, ya

da bir yıla kadar uzayabileceği de bildirilmektedir. Ayrıca; kronik HBV enfeksiyonunun akut alevlenme dönemlerinde ve HBeAg serokonversiyonu sırasında anti-HBcIgM antikorları tekrar artarak saptanabilir. Kronik enfeksiyon boyunca anti-HBcIgM antikorları düşük düzeyde salgılanmaya devam etmektedir (3).

Anti-HBcIgG ve total Anti-HBc: Akut HBV enfeksiyonun da anti-HBcIgG, anti-HBcIgM'i izleyerek pozitifleşir ve erken nekahat döneminde tepe düzeyine ulaşır; hayat boyunca saptanabilir düzeyde kalır. Anti-HBcIgG akut enfeksiyon döneminde pozitifleştiği ve hayat boyu saptanabildiği için akut, kronik veya önceden geçirilmiş HBV enfeksiyonunun göstergesidir ve kişinin HBV ile karşılaşmış olduğunu gösterir. Bazı hastalarda HBV enfeksiyonunun kanıtı olarak sadece anti-HBcIgG saptanabilir. Diğer serolojik göstergeler olmaksızın saptanan salt anti-HBcIgG antikorları; uzamış pencere dönemini, HBsAg'nin saptanamayacak kadar düşük olduğu kronik enfeksiyonları, mutant virüslerle oluşmuş ve bu nedenle ticari kitlerle HBsAg saptanamayan kronik enfeksiyonları gösterebileceği gibi pasif antikor aktarımına ya da serolojik çapraz reaksiyonlara bağlı olabilir (3).

Anti-HBs: İyileşmeyle sonlanan akut enfeksiyonda HBsAg kaybolduktan sonra saptanabilir düzeye ulaşır. Anti-HBs antikorlarının oluşması, hastalığın iyileşme ile sonlandığını ve bağışıklığı gösterir. Anti-HBc antikorları ile birlikte genellikle hayat boyunca saptanabilir düzeyde kalır. HBV aşılamasından sonra da anti-HBs antikorları gelişir; bu durumda anti-HBc antikorları negatiftir ve bağışıklığın izlemi için anti-HBs titrelerinin izlenmesi gerekir. Aşılamadan sonra saptanan 10 IU/L'nin üzerindeki anti-HBs düzeyleri koruyucudur. Aşı olmamış kişilerdeki sadece anti-HBs pozitifliği, enfeksiyöz olmayan HBsAg ile karşılaşmayı akla getirmelidir. Özellikle sağlık çalışanlarında bu yolla immünizasyon görülmektedir. Kronik HBV enfeksiyonunda, HBsAg ile immün kompleksler oluşturduğundan, genellikle anti-HBs saptanamaz (3).

Anti-HBcAg pozitif ancak anti-HBsAg negatif bir hasta pre-core mutant HBV ile kronik olarak enfekte olabilir ya da vahşi tip HBV ile düşük seviye replikasyonu olabilir. Bu durumlarda, çok sayıda parametre incelenmelidir, örneğin serumda ml başı ölçülen erken antijen (HbeAg), anti-HBeAg, HBsAg, HBcAg ve son olarak viral yük. HBeAg normal olarak sadece aktif replikasyonlu akut ve/veya devam eden enfeksiyon durumunda eksprese olur. Ancak, siroz ya da hepatoselüler karsinoma

(HCC) dönüşmesi bakımından yüksek risk taşıırken, HBeAg yi eksprese etmeden aktif replikasyon gösteren pre-core mutant denilen virüsler mevcuttur. HBeAg serokonversiyonun deneklerin %98'inden fazlasında oluştuğu ve iyileşmenin bir göstergesi olmasa da vahşi tip HBV'de bulunacağı için kürün bir göstergesi olmadığı da not edilmelidir. Serolojik tarama tamamlandıktan ve replikatif bir HBV enfeksiyonu öngörüldükten sonra HBV DNA gibi daha pahalı moleküler yöntemler uygulanır. Önemli olan genellikle tedaviye başlayıp başlamamaya karar vermek, tedavinin etkililiğini ve tedaviye uyumunu izlemek, dirençli suşları ve HBV'nin pre-core mutant zincirlerini belirlemektir (15).

Tablo 1. HBV serolojik testlerinin yorumlanması (3).

HBsAg	HBeAg	Anti-HBe	Anti-HBcIgM	Anti-HBcIgG	Anti-HBs	HBV DNA	YORUM
+	-	-	-	-	-	+	Erken enfeksiyon dönemi
+	+	-	+	+/-	-	+	Akut enfeksiyon
-	-	-	+	+/-	-	-	Erken nekahat döneminde akut enfeksiyon (pencere dönemi)
-	-	+	+	+	-	-	Akut hastalığın nekahat dönemi
-	-	+/-	-	+	+	-	Geçirilmiş enfeksiyon
+	+	-	-	+	-	+	Kronik enfeksiyon (enfektivitesi yüksek)
+	-	+	-	+	-	+ / -	Kronik enfeksiyon
-	-	+	-	+	-	+ / -	Kronik enfeksiyon
-	-	-	-	+	-	+	Salt anti-HBc pozitifliği (Düşük düzey enfeksiyon)
-	-	-	-	+	-	-	Salt anti-HBc pozitifliği (Eskiden geçirilmiş enfeksiyon?, yalancı test pozitifliği?)
-	-	-	-	-	+	-	Aşılama ile kazanılmış bağışıklık

1.1.9.2. Moleküler Testler

Hepatit B virüsüne ait antijenlerin veya antikorların hasta serumunda saptanmasını sağlayan serolojik testler enfeksiyonun hangi evrede olduğunu belirlemede ve enfektivitenin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Serolojik testlerin yetersiz kaldığı durumlarda ve atipik serolojik vakalarda tanıya gitmede, antiviral tedavinin izlenmesinde, çeşitli mutasyonların tespitinde moleküler biyoloji tekniklerinin kullanıldığı görülmektedir (29).

Çoğu bilimsel topluluklar, kronik olarak enfekte HBV hastalarının yönetimi için konsensus belgeleri ve/veya kılavuzları yayımlamıştır (90). Bu araştırmacıların hepsi viral yükün başlangıç sayısını ve takip süresince sürekli ölçümlerin yapılmasını tavsiye ederler. Hasta takibinin, tedaviye başlama ya da hastaya verilen ilaç rejimini değiştirme konusunda karar vermek açısından önemli olduğu düşünülmektedir. Buna

ek olarak, precore mutasyonlu HBeAg negatif suşlar gibi hepatoselüler karsinom gelişimi için yüksek risk taşıyan suşlarla enfekte hastalarda bulunan düşük seviyedeki vireminin tespit edilmesi için kantifikasyona yönelik hassas yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Son zamanlarda kullanımı gittikçe yaygınlaşan real-time polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR) tekniği HBV DNA'nın miktarının belirlenmesine imkan sağlayan hızlı ve basit bir testtir. Bu yöntem, termocycle süresince oluşan PZR ürünün vermiş olduğu fluoresansın belirli zaman aralıklarında ölçülmesi temeline dayanır. Sonuçta, HBV yüzey geni için düzenlenmiş bir prob ve bilinen konsantrasyonları içeren referans standartlarla HBV DNA miktarı belirlenir. Bu teknikle serumda çok az miktarda HBV DNA genom kopyası varsa bile tespit edilebilir. Ancak kantitatif PZR metodlarının yüksek orandaki sensitivitelere rağmen standardizasyon, kontaminasyon ve yeniden tekrarlanabilirlik gibi birtakım problemleri bildirilmiştir (29).

Kronik HBV enfeksiyonunun, serum ya da plazmada en az 6 ay süresince viral DNA olarak ölçülen tespit edilebilir bir viral yük olduğuna dair kriterler üzerinde anlaşılmıştır. Bu durumda $>20,000$ IU/ml ya da $>100,000$ kopya/ml tespit edildiğinde, aktif replikasyon olduğu düşünülür. Aynı zamanda, HBV negatif kronik hepatit B virüs enfeksiyonlarında, HBV DNA, izlenmesi gereken tek göstergedir (15). Buna ek olarak viral DNA'nın kalitatif ve kantitatif ölçümü, diğer bir durum olan okült (occult) hepatitin izlenmesi için önemlidir. Bu tespit edilebilir HBsAg yokluğunda ölçülebilir DNA seviyeleri ile HBV enfeksiyonu olarak karakterize edilir. Okült hepatit B virüs enfeksiyonunun araştırılması immunosupresyon öncesi, solid organ transplant donörlerinde, pozitif HBV serolojisi (HBcAg antikoru) durumlarında ve kriptojenik karaciğer hastalığında önerilir (91). HBV tedavisi süresince ya da kronik HBV enfeksiyonunu izlemek için viral yükün her 3-6 ayda bir ölçülmesi tavsiye edilir. Buna ilaveten, tedaviye başladıktan sonra viral yükün ölçümü yararlıdır ve tedaviye cevap vermeyenleri belirlemek için standart bir yöntemdir (92, 93). Tedavi sırasında HBV DNA konsantrasyonundaki artmalar ilaç dirençli varyantları akla getirir, bu nedenle tedaviyi izlemek açısından HBV DNA'nın kantitasyonu önemlidir. Ayrıca HBV DNA kantitasyonu invaziv cerrahi girişim yapılacak HBV taşıyıcısı kişilerde enfeksiyon riskini saptamada da kullanılabilir (94).

1.1.10. Mutant Virüsler

Hepatit B virüsü ile enfekte kişilerde enfeksiyon yaşı büyüdükçe, viral popülasyonda mutant virüslerin ortaya çıktığı saptanmıştır. Deneysel olarak HBV'nin mutasyon hızı, her enfeksiyon yılında 10 000 baz çifti (bç) için bir nükleotid olarak hesaplanmıştır. Bu mutasyon hızı diğer DNA virüslerinden 10- 100 kez fazla olup, HBV'nin RNA aracısı kullanarak revers transkripsiyonla replike olmasına bağlıdır. Kronik, uzun süreli bir enfeksiyon olan HBV enfeksiyonunda viral replikasyon hızının ve revers transkriptaz hata oranının yüksek olması, popülasyon içinde mutant kökenlerin zamanla birikmesine neden olur. Antiviral tedavi verilmesi durumunda, "wild type" virüse göre replikasyon üstünlüğü olan mutant virüslerin seleksiyonu ile virüs yeni koşullara hızla uyum sağlayabilmektedir (3).

1.1.10.1. Basal Core Promoter/Precore ve Core Bölgesinde İzlenen Mutasyonlar

Güney Avrupa ve Asya'da ağır karaciğer hastalığı ve aktif viremi olan birçok hastada HBeAg'nin negatif olduğu görülmüştür. Bu hastalarda precore/core geninde 1896. nükleotidin mutasyonu (TGG; TAG) ile stop kodon oluşmakta ve HBeAg translasyonu durmaktadır. HBcAg sentezi bu kodondan daha sonra başladığı için mutasyondan etkilenmemektedir. HBeAg negatif olarak adlandırılan bu varyant virüsler, fulminan hepatit ve ağır kronik karaciğer hastalarında da tanımlanmıştır (3).

Hepatit B virüsü genotipleri B, D, E ve G'de ve bazı C genotiplerinde 1858. nükleotid timidin şeklindedir ve mutasyon sonucu oluşan stop kodonu A-T baz çifti oluşturarak fonksiyonel sekonder yapıyı stabilize etmektedir. HBV genotipleri A, F ve bazı C genotiplerinde ise 1858. pozisyonda sitozin bulunmakta; bu genotiplerde pre-core stop kodonu mutasyonu nadiren izlenmektedir (29).

"Core promoter" bölgesi, HBV'nin replikasyonu ve morfogenezinde en önemli rolü üstlenen gen bölgesidir. pgRNA ve çekirdek proteini mRNA'sının transkripsiyonunu yönetir. HBcAg ekspresyonunu posttranskripsiyonel olarak düzenler. Bu bölgede HBV genotipine bağlı olarak "precore" mutasyonları görülür mRNA transkripsiyonu baskılanır ve HBeAg salınımı %70 oranında azalır. Bu mutasyonlar aynı zamanda Enh II bölgesini etkiler ve viral replikasyon güçlenir. "precore" mutasyonları viral replikasyonu tek başına fazla etkilememektedir, lamivudine dirençli mutantlarda ise replikasyon kapasitesinin onarımına katkıda

bulunabilirler (3). Genel olarak bu mutasyon tipi sıklıkla A genotipi ile enfekte kişilerde ortaya çıkmaktadır. Core geninde izlenen mutasyon oranları pre-core stop kodonu mutasyonlarının varlığı, HBe antijeni sentezi ve karaciğer hastalığının aktivitesi ile ilişkilidir (95).

1.1.10.2. X Bölgesinde İzlenen Mutasyonlar

X geninde olan mutasyonlar transkripsiyonun kontrolünü ve HBx fonksiyonunu etkilemektedir. HBx, serin proteazı inhibe ederek viral transkripsiyonu arttırır. Hücre içinde p53 proteinine bağlanır, birçok sinyal yolunu, pürin ve primidin metabolizmasını aktive eder. p53 geninin HBV üzerindeki baskılayıcı etkisini kaldırır. Bazal core promoter bölgesindeki delesyonlar eksik HBx sentezine yol açar. Bu mutasyonda p53 bağımlı transkripsiyonel baskılama bölgesi kaybolduğundan, HCC oluşumunda önemli olabilir (3).

1.1.10.3. S Geni Mutasyonları

Hepatit B virüsü'ne karşı nötralizan antikor yanıtına neden olan "a" determinantındaki 124-147. aminoasitler arası, tüm subtiplerde oldukça korunmuş bir bölgedir. 145. pozisyonda bulunan glisin, arjinine değişmesine neden olan mutasyon (sG 145R) virüste büyük antijenik değişikliğe neden olur. HBsAg'nin üç boyutlu yapısında olan bu değişiklik, anti-HBs'nin nötralizan etkisinden kurtulmasına ve replikasyona devam etmesine neden olur. S geninde olan mutasyonlar, aynı dizileri kapsayan P genini de etkiler. Lamivudin ile azalmış viral replikasyon hızı bu mutasyonlarla artmaktadır (3).

1.1.10.4. Polimeraz Bölgesinde İzlenen Mutasyonlar

Revers transkriptaz inhibitörü olan nükleotid/nükleozit analogu ilaçların kullanımından sonra görülmeye başlanmıştır. P geni en uzun genidir, genomun %80'ini kapsar ve diğer üç genle ortak dizileri kullanır. Kodladığı polimeraz proteini pgRNA'dan sentezletilir. Polimeraz proteini multifonksiyonel bir proteindir, revers transkriptaz, DNA polimeraz ve RNaz H aktivitelerine sahip bölümleri bulunur. Enzimin revers transkriptaz aktivitesi gösteren C katlantısında yer alan tirozin (Y), metiyonin (M), aspartat (D), aspartat (D) aminoasitlerinden oluşan bölümü (YMDD motifi) nükleotid bağlayan katalitik bölgesidir. Lamivudin kullanımı ile bu bölgedeki metiyoninin izolösün veya valine değişmesi (rtM204I veya rtM204V) virüsün replikasyon kapasitesini düşürür (3).

Tedavide İnterferon ile birlikte en sık kullanılan ilaç olan Lamivudin'e karşı oluşan bu direnç, tedavi alan hastaların % 14-32'sinde ilk yılda izlenmekte; 4 yılın sonunda ise % 70'e kadar çıkmaktadır. YMDD motifinde aminoasit değişimi taşıyan dirençli mutantların in vitro replikasyon etkinliğinin wild-type virüslere göre daha düşük olduğu saptanmıştır (29).

1.1.11. Antiviral Direnç Testleri

Son on yılda klinik uygulamaya gittikçe daha çok antiviral ajanların girmesiyle, HBV enfeksiyonları için yeni ve kombine tedavi seçenekleri gittikçe artmaya devam etmektedir. Birçok yeni antiviralin yan etkisi olarak, direnç mutasyonlarının gelişimi de artmaya başlamıştır ve HBV'de gözlemlenen antiviral direnç sorununun, bugün HIV tedavisinde yaşananlar kadar karmaşık hale geleceği öngörülmektedir. Genotipik analizle, direnç ile bağlantılı bazı mutasyonlar tanımlanabilir. Polimeraz YMDD gibi mutasyonlar tedavi sırasında ortaya çıkarsa, bu bulgu direncin başlıca kanıtını oluşturur. Asıl sorun, bilinen mutasyonlardan hiçbiri saptanamadığında ortaya çıkar. Bu gibi durumlarda, henüz dirençle bağlantılı olmayan diğer yeni mutasyonların tedavi başarısızlığına ne derece katkıda bulunduğunu hesaplamak gerekir. Bu durumda, oldukça az sayıda HBV laboratuvarlarında oluşturulan in vitro fenotipleme prosedürlerinin uygulanması gerekir. Ne yazık ki, ticari yöntemlerle sadece bilinen mutasyonlar tespit edilebilir ve sınıflandırılabilirken, yeni mutasyonlar spekülatif kalır; böylelikle fenotiplemede muhtemelen önemli mutasyonlar tespit edilememiş ya da göz ardı edilmiş olur. Bununla birlikte sekanslama sonuçlarının yorumlanmasında yeni e-öğrenme veritabanı çözümlerinin kullanılması muhtemelen yardımcı olacaktır (15).

1.1.12. Sonuç ve İleriye Dönük Projeksiyonlar

HBV tanısıyla ilgili gelecekte karşılaşılabilecek en büyük sorunlar immün kaçış mutantları, okkült hepatit ve HBeAg negatif kronik hepatit ve gittikçe artan direnç mutasyonlarıdır. HIV direncini gösteren yöntemlere benzer şekilde genotip sonuçlarının veritabanı yorumuna dayanan görüntüsel fenotip gibi yeni yöntemler laboratuvar sonuçlarının yorumlanmasına yardımcı olabilir. Bununla birlikte, gelişmiş bu tanı araçlarının üretimlerindeki hızlı artışın kötü tarafı, tedavi kararlarını belirleyecek ve suboptimal HBV tedavisini önlemeye yardımcı olabilecek bu testlerin fiyatlarıdır (15).

1.1.13. HBV Direnç ve Teröpatik Stratejilere Yönelik Çıkarımlar

1990'lı yılların ortalarından beri interferon monoterapisi kronik hepatit B enfeksiyonunun standart tedavisi olmuştur. Başlıca interferon direnci, HBeAg ya da HBsAg antijen kaybı ya da serokonversiyon olarak ortaya çıkar ve bu durum HBV B,C ve D genotiplerinde, HBV genotip A'ya göre daha az sıklıkta bildirilmiştir. Bununla beraber, tedavi sırasında interferona direnç gelişimi şimdiye kadar bildirilmemiştir (15).

Günümüzde HBV polimeraz inhibitörleri ile tedavi farklı direnç profilleri olan, direnç gelişiminin kontrolü ve antiviral etkinlikleri farklı olan iki aktif alt sınıf ile sınırlıdır. Bir ajanla suboptimal tedaviye bağlı olarak direnç, kısmi ya da tam çapraz dirence bağlı olarak ardından verilen ajanların etkisini azaltır ya da tamamıyla ortadan kaldırır. Bu durum lamivudin, telbivudin ve entecavir için kesin olarak ortaya konmuştur. Entecavir ile tenofovir arasında oluşacak kısmi çapraz-direnç ihtimaline işaret eden bazı veriler mevcuttur. Adefovirin tenofovire direnç oluşturma potansiyeli üzerinde yeterli çalışma yapılmamıştır ve bu konu hala tartışılmaktadır.

Hepatit B virüsü için de novo kombinasyon terapisinin ardışık monoterapiye olan üstünlüğü, çok yüksek HBV viremisi gösteren hastalar için muhtemeldir ancak bu prospektif klinik çalışmalarla kanıtlanmaya muhtaçtır. Düşük ya da orta viremisi olan hastalarda, hızlı HBV replikasyon supresyonu sağlandığı taktirde yüksek genetik bariyerli ilaçların kullanımı da direnç gelişim riskini oldukça düşürür.

İlk tedavi stratejisinin seçimi gelecekte uygulanacak tedavi yöntemlerini belirleyecek ve suboptimal tedavi durumlarında, sadece birkaç yıl içinde seçeneklerin hızla tükenmesiyle sonuçlanabilecektir (15).

1.2. Hepatit Delta Virüs Enfeksiyonu

1.2.1. Tanım

Hepatit D virüsü (HDV), bir *Deltavirüs* olup, insan patojenleri içinde en küçük genoma sahip olan RNA virüsüdür (96, 97). HDV enfeksiyonunda, HBV'nin yardımcı fonksiyonunun boyutu henüz tam olarak bilinmemektedir. HDV'nin HBV'ye bağımlılığı sadece virüsün tümleşmesi için HbsAg'nin sağladığı olanakla sınırlıdır. Kısaca HDV, tam replikasyon ve transmisyon için hepatit B virüsü (HBV) yüzey antijenine (HBsAg) ihtiyaç duyan defektif bir RNA virüsüdür (98-100). Retrovirüsler dışındaki tüm RNA virüsleri, replike olmak için kendi kodladıkları

RNA'ya bağımlı RNA polimerazları (RdRp) kullanırken, HDV bitki viroidlerine benzer şekilde RdRp'den yoksundur ve ancak bir hücre içerisine girdikten sonra replike olabilmektedir (96). Hepatit delta sadece HBsAg pozitif olan bireylerde akut ko-enfeksiyon olarak ya da kronik hepatit B'li hastalarda süper enfeksiyon olarak görülür. Yapılan bazı çalışmalar, kronik HDV enfeksiyonunun, daha hızlı ilerleyen fibrozis, artmış hepatosellüler karsinom riski ve yerleşmiş siroz durumunda erken dekompanzasyona sebep olmasıyla, kronik HBV mono-enfeksiyonuna göre daha ciddi bir karaciğer hastalığına yol açtığını ortaya çıkarmıştır. Şempanzelerde eşzamanlı HBV ve HDV enfeksiyonunun, tek başına HBV enfeksiyonundan daha ciddi olduğu da ortaya konmuştur. Şimdiye kadar sadece interferon alfa tedavisinin HDV'ye karşı önemli antiviral aktivite gösterdiği tespit edilmiş ve uzun süreli gidişatı düzeltmeyle ilişkilendirilmiştir. Pegile interferon kullanımı ile ilgili edinilen son veriler önceki bulguları doğrular niteliktedir. PEG-IFN hastaların yaklaşık dörtte birinde virolojik cevap oranlarının kalıcı olmasına yol açar (98).

1.2.2. Virüsün Yapısı ve Viral Genomun Organizasyonu

Delta virüs viriyonu yaklaşık olarak 36-43 nm büyüklüğündedir ve HDV RNA ve delta antijeni içerir. Viral genom 1679 baz çifti (bç) uzunluğunda, tek-zincirli, negatif polariteli ve sirküler RNA yapısındadır. HDV 1700 bç içeren, insan hepatit virüslerinden en küçük genoma sahip defektif bir RNA virüsüdür. Hepatit B virüsünün pre-S ve S antijenlerinden (HBsAg) gelen kılıf proteini ile kaplıdır. HBsAg, virüsün matürasyonu, hücreden hücreye geçebilmesi ve varlığını sürdürebilmesi için gereklidir. Nükleokapsidi 19 nm çapındadır ve polihedral simetridedir; genomik RNA ve delta antijeninden (HDAg) oluşur. Delta antijeni virüsün kodladığı tek proteindir; büyük ve küçük olmak üzere iki formda bulunur. HDV RNA, dizilerindeki % 74 oranındaki baz eşleşmesinden, G+C oranının yüksek olmasından dolayı katlanarak dallanmamış çomak (rod-like) şeklinde bulunur. Bu formdaki RNA molekülü daha stabildir ve transkripsiyonu başlatabilir. Denatüre olduğunda ise dairesel yapıda görülür (96, 101, 102).

Deltavirüs RNA'sı üçü genomik zincirde diğer üçü ise antigenomik zincirde olmak üzere altı "open reading frame'e" (ORFs) sahiptir. Bir ORF, HDAg'i kodlarken diğer ORF'ler aktif olarak kopyalanmaktadır. Virüsün iki HDAg'i mevcuttur. Bunlar: küçük HDAg (S-HDAg) (24 kD) 155 amino asit uzunluğundadır

ve büyük HDAg (L-HDAg) (27 kD) 214 amino asit uzunluğundadır. S-HDAg sekansında oluşan tek bir nükleotid değişikliği (A-G) L- HDAg'nin sentezine yol açar. HDAg, virüs biyolojisindeki birçok önemli olayı düzenler. Replikasyon sırasında genomu hücre çekirdeğine yönlendirir, genomik RNA'yı bağlar, dimerize olarak nükleokapsidi oluşturur. Küçük HDAg genom sentezini artırırken, HDV RNA sentezini inhibe eden büyük HDAg, virion morfogenezisi için gereklidir, HBsAg ile birlikte virüsün kurulmasında rol oynar (98).

1.2.3. Replikasyon

1.2.3.1. HDV RNA Sentezi

Hepatit Delta virüsü'nün hayat siklusundaki en önemli faktör HBV replikasyonudur (103). HDV, karaciğer hücrelerinde replike olur. Virüsle enfekte kişilerde deneysel olarak enfeksiyon oluşturulan şempanzelerde başka bir replikasyon bölgesi gösterilememiştir. Virüsün hepatosite girmesi HBsAg nin Pre-S1 bölgesi ile hepatosit yüzey moleküllerinin etkileşimi sonucunda gerçekleşir. Hücre içinde S-HDAg tarafından çekirdeğe yönlendirilir.

Delta virüs replike olurken, multimerik lineer yapıya kavuşmak için genomik zincirin konak RNA polimerazını kullanarak replike olduktan sonra lineer monomerlerine ayrılır ve projeni virüsün sirküler HDV RNA'sına bağlanarak "ikili dönen dairesel model" doğrultusunda replikasyonunu gerçekleştirir. Virüsün RNA polimeraz enzimini bulundurmaması ve hücresel RNA polimeraz II aracılığı ile replike olması en önemli özelliğidir. DNA'dan RNA sentezleten bu hücresel enzimin viral RNA'ya yönlendirilmesi HDV'ye özgüdür.

HDV ile enfekte hücrelerde üç ayrı RNA görülür. Bunlar;

-Sirküler yapıda olan genomik RNA

-Antigenom olarak adlandırılan, genoma komplementer pozitif polariteli sirküler RNA

-HDAg sentezleten pozitif polariteli, lineer yapıda 800 nt.lik mRNA'dır (103).

Hem genomik hemde antigenomik formlar karaciğer hücrelerinde gösterilebilir, ancak serumda sadece antigenomik form bulunabilir (104, 105).

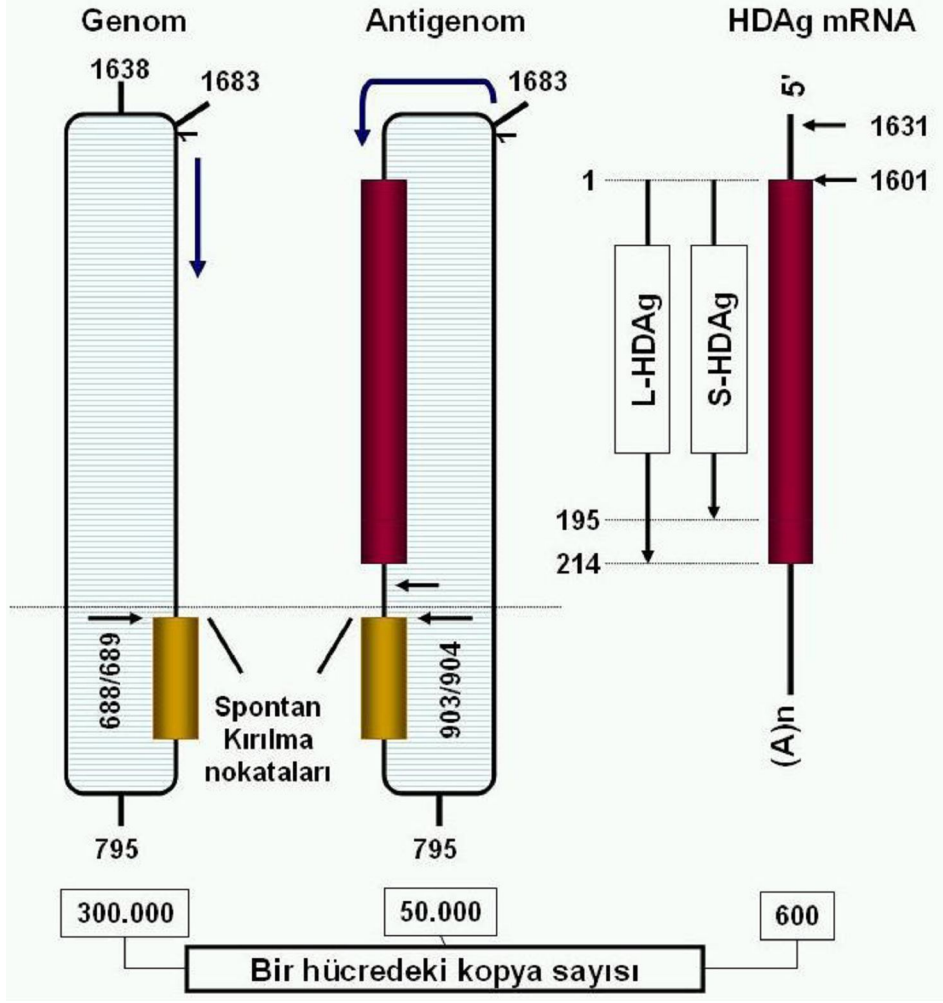
Delta virüs genomunun ve antigenomunun ribozim aktivitesi vardır. Seksenbeş nt.lik "ribozim kesim bölgesi"nde, oto-katalitik olarak genomunu kesme

ve bağlama işlemleri yapabilir. Antigenom, genomun tam komplementeridir, ancak üzerindeki HDAG kodlayan bölgenin 3'-ucunda poli-A sinyali bulunur. Bu bölgedeki poli-A dizileri transkripsiyon sonrası düzenleme ile kazanılır. Replikasyon sırasında hücre içinde 30 000 kopya antigenom ve 600 kopya HDAG mRNA'sı bulunur (96).

Her RNA özgül olarak spontan kırılmanın olduğu tek bir bölgeye sahiptir. Bu kırılma bölgeleri psödoknot olarak bilinen 4 köklü yapı oluşturan viral RNA'ya karşılık gelen bölgelerdir. Genomik ve antigenomik RNA'larda kırılmanın olduğu bölgelerde spontan bağlanma reaksiyonları ortaya çıkar. Ayrıca HDV RNA'daki spontan kırılma aktivitesi viral yaşam siklusu esnasında inhibe edilmesi gereken potansiyel letal aktivitedir. Çomaksı düzenleme ribozim dizileri arasında oluşur ve viral genomda 'attenuator diziler' olarak adlandırılır. Bu olay ribozim aktivitesi için gereken psödoknot yapının oluşumunu engelleyerek, viral genomun kendi kendini ikiye bölmesini engeller (104, 105). Viral replikasyon esnasında konak spesifik faktörler (veya RNA chaperonlar) bu attenuator dizilerle ilişkisini önleyerek replikasyon esnasında ribozimi aktive eder (106). HDV, genom replikasyonu için hücrel RNA polimeraz II enzimini kullanır. HDAG direkt olarak RNA polimeraz II'ye bağlanarak molekülün negatif uzama faktörünün yerini değiştirir ve enzim aktive olur. Genomun transkripsiyonu başlatma bölgesi 1630 nt.'de, HDAG mRNA' sının 5' ucundadır. RNA sentezi burada başlar, sirküler genom üzerinde devam ederek lineer tek bir RNA molekülü meydana gelir. Bu uzun molekül çok sayıda HDAG mRNA'dan oluşur. Ribozim kesim bölgesinden kesilerek molekülden ayrılan diziler 5'-cap ve 3'-poli-A kuyruğu kazanarak olgunlaşır. Hücre sitoplazmasına geçerek HDAG sentezine başlarlar (96).

1.2.3.2. Antigenom Sentezi

Antigenom sentezi de yukarıda belirtilen mekanizmaya benzer. Ancak antigenom sentezini başka bir enzimin, muhtemelen RNA polimeraz I enziminin yaptığı düşünülmektedir. Sentezlenen uzun lineer molekül, oto-kesim ve bağlama yaparak, çok sayıda sirküler antigenom RNA oluşur. Yeni oluşan antigenom RNA'lar L-HDAG için yeniden düzenlenir. Ayrıca hücrel RNA polimeraz II enzimini bağlayarak genom sentezini başlatır. Uzun lineer bir molekül halinde sentezlenen genomik RNA' da kendisini kesim bölgesinden ayırıp iki ucu bağlar ve sirküler genom oluşur (96).



Şekil 4. HDV genom ve antigenom şemaları (107)

1.2.3.3. HDV Sentezi

Her iki HDV'de aynı başlangıç kodonundan sentezlenmeye başlar. Ancak L-HDAg'nin karboksi ucunda fazladan 19 amino asit daha vardır. Antigenomik RNA'da olan "RNA editing" ile S-HDAg'nin stop kodonunda değişiklik olur ve translasyon devam eder. Bu düzenleme, hüresel ADAR (RNA adenosin deaminaz) enzimi aktive edilerek yapılır. ADAR, antigenomun 1012. nt. deki adenosini amin grubunu ayırarak inozine çevirir. İzleyen transkripsiyonlarda bu pozisyondaki inozin, guanozin olarak devam eder. 'RNA editing' ile S-HDAg nin 195. Pozisyonundaki 'UAG' sonlandırma kodonu, triptofanı kodlayan 'UGG' haline dönüşür. Bu sayede S-HDAg dizilerinden sonra sentez triptofanla devam ederek 214 aa.lik L-HDAg oluşturulur. Her iki HDV'de translasyon sonrası izoprenilasyon, asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon gibi değişikliklere uğrarlar (96).

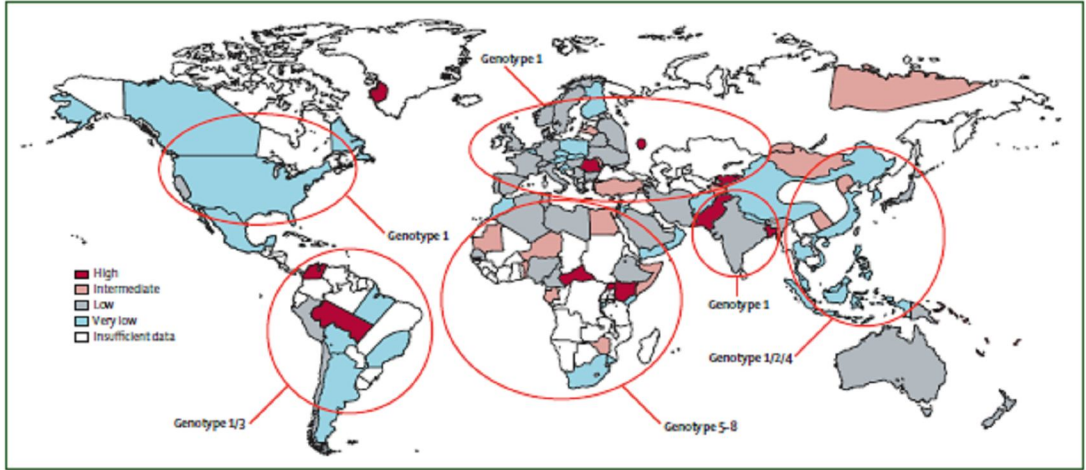
1.2.3.4. Virüsün Oluşması ve Salınması

Sentezlenen genomik RNA'lar HDAG ile bağlanır. Bir yandan da HDAG dimerizasyonu ile nükleokapsit oluşur. Bir viriyonda yaklaşık 70 molekül HDAG bulunur. Hücre çekirdeğinde oluşan nükleokapsit endoplazmik retikulumda HBsAg ile etkileşerek zarfını kazanır. Zarflanma için L-HDAG'nin karboksi ucundaki sisteinin izoprenilasyonu gereklidir. Bu olayla lipofilik bir özellik kazanan molekül hem HDV RNA, hem de HBsAg'ye bağlanarak virüsün zarfını kazanmasını sağlar. Hücre dışına salınma aşamasının HBV'ye benzer şekilde olduğu düşünülmektedir.

Delta virüs replikasyonunda "RNA editing" olayı replikasyonun biyolojik regülatörü olarak düşünülmektedir. Bu olay ile S-HDAG ve L-HDAG miktarları üzerinden replikasyon düzenlenir. L-HDAG miktarı arttıkça replikasyon baskılanır, ancak viral salınım ile azalması tekrar replikasyonu destekler (96).

1.2.4. Delta Virüsü'nün Genotip Dağılımı

Daha önceki çalışmalara göre, dünyanın farklı bölgelerinden HDV genomları analiz edilip üç farklı genotip elde edilmiş (108, 109). Ancak günümüzde yapılan yeni çalışmalara göre sekiz HDV genotipi olduğu ortaya çıkarılmıştır (99, 110-112). En sık görülen genotip, Genotip-I'dir (108, 109, 113) ve özellikle Avrupa, Orta Doğu, Kuzey Amerika ve Kuzey Afrika olmak üzere bütün dünyaya yayılmış durumdadır. Genotip-II (daha önce genotip IIa olarak adlandırılıyordu). Doğu Asya ve Rusya'nın Yakutya bölgesinde yaygındır (114, 115). Genotip III en yaygın olarak Amazon Havzasında görülür (116). Genotip-IV (önceden genotip IIb (117-120) olarak adlandırılıyordu) Japonya, Taiwan'da görülürken, Genotip-V ve VIII ise Kuzey Avrupa'ya göç etmiş olanlarda dahil olmak üzere Afrika kökenli bireylerde bulunur (121). Almanya, Türkiye ve Yunanistan'ı kapsayan geniş kapsamlı Avrupa Hep-Net International Delta hepatitis Intervention Trial (HIDT-1) tedavi çalışmasına dahil edilen tüm hastaların HDV genotip I ile enfekte olduğu kanıtlanmıştır (122).



Şekil 5. HDV'nin dünyada'ki genotipik dağılımı (122)

1.2.5. Delta Hepatit'in Epidemiyolojisi

Hepatit delta virüs enfeksiyonu bütün dünyada görülen önemli bir karaciğer hastalığıdır. HDV ilk defa 1977 yıllarında tarif edilmesine rağmen oldukça eskiden beri var olan bir virüstür. 1930'larda Brezilya'da yapılan ve saklanan karaciğer biyopsi örneklerinde HDV'ye rastlanmıştır. Ayrıca 1947'lerden beri saklanan ABD ordusu kan örneklerinde HDV tespit edilmiştir.

Delta virüs enfeksiyonu endemisinin yüksek olduğu bölgelerde HDV süperenfeksiyonu şeklindedir. HDV çocukluk ve adolesan çağında alınır, yakın temas ön plandadır. HDV enfeksiyonu epidemiyolojisi zaman daha çok çocuklar ve genç erişkinleri tutar, fulminant seyir ve ölüm görülebilir. Bu örneğe en çok Amazonlar'da rastlanmaktadır. Endemilerin düşük olduğu bölgelerde ise HDV koenfeksiyon şeklindedir. Erkeklerde sıklığı ve parenteral bulaşım ön plandadır.

Hepatit delta virüs enfeksiyonunun dünyadaki epidemiyolojik özellikleri genel çizgileri ile HBV'ye benzemektedir. Ancak HDV ile HBV epidemiyolojisi arasında bazı önemli farklar da vardır. HBV'nin orta düzeyde endemik olduğu bazı bölgelerde HBV ile HDV sıklığı benzerlik göstermemektedir. Güneydoğu Asya, Çin, Japonya, Afrika ve Alaska'da HBV sıklığı yüksek buna karşılık HDV sıklığı düşüktür. Buna karşılık Akdeniz Ülkeleri'nde HDV sıklığı HBV'ye paralellik göstermektedir. Örnek olarak HBV'ye bağlı kronik karaciğer hastalığında anti-HDV pozitiflik oranı İtalya'da % 20-30 iken, Japonya'da % 3'den azdır. Bu bölgesel farkın nedeni bilinmemektedir (123).

Delta hepatiti Güney Avrupa'da oldukça endemiktir. 1980 ve 90'larda yapılan çalışmalar HBsAg-pozitif bireyler arasında anti-HDV prevalansının % 20'den yüksek olduğunu göstermiştir. Türkiye'de, HBsAg-pozitif hastalarda HDV prevalansları Türkiye'nin batısında <%5 ile Güney Doğu'sunda >%27 arasında değişmiştir (124). Yüksek delta hepatit prevalansının görüldüğü diğer bir ülke ise kronik hepatitli vakaların üçte birinin HDV enfeksiyonundan kaynaklandığı Mongolya'dır (125).

Amerika Birleşik Devletleri'nde delta hepatitin epidemiyolojisi ile ilgili sınırlı sayıda veri mevcuttur. 1985 ile 1993 arasında yayınlanmış çalışmalarda HDV prevalansının İllinois eyaletinde, homoseksüel erkekler arasında %2 olduğu (126), hemofilikler (127) ve hayat kadınları (128) arasında yaklaşık %20 olduğu, hepatit B taşıyıcıları arasında ise %30'dan fazla olduğu bildirilmiştir (129). Bununla birlikte 1983'ten beri önemli sayıda vakayı kapsayan çalışma yayımlanmamıştır. Amerikan toplumu içinde özellikle, IV ilaç kullanıcıları gibi yüksek risk taşıyan bireyler arasında HDV prevalansı bilinmemektedir.

Dünya çapında 350 milyondan fazla insanın HBV ile kronik olarak enfekte olduğu düşünülmekte ve bunlardan 15-20 milyonunun anti-HDV pozitif olduğu tahmin edilmektedir (112, 130).

Günümüzde Batı Ülkeleri'nde HDV artık seyrek rastlanan bir hastalıktır. Ülkemizde de son yıllarda HDV enfeksiyonu azalmakta ve HDV'li hastaların yaş ortalaması giderek artmaktadır. HBV'nin hekimlerce daha iyi tanınması, korunma yöntemlerinin halk tarafından daha çok bilinmesi ve HBV aşısının eskiye nazaran yaygın kullanımı HDV ile karşılaşma oranlarındaki düşüşü açıklayacak nedenler olabilir. Bunun yanında eskiden aktif enfeksiyon tanısında yalnızca anti-HDV IgM kullanılırken, bugün HDV RNA testinden de yararlanılmaktadır. Tanı testlerinin duyarlılıklarının ve özgüllüklerinin geliştirilmiş olması da HBV ve HDV ile enfekte hastaların daha kolay tanınmasına, enfeksiyonun yayılımının önlenmesine neden olmuştur. Son yıllarda Batı Avrupa'da, Doğu Avrupa'dan gelen göçmenler ve benzer şekilde yurdumuzda Doğu ve Güneydoğu Anadolu'dan Batı Anadolu'ya göçler nedeni ile HDV sıklığında artma izlenmektedir (123, 131).

1.2.6. Hepatit Delta Virüs Enfeksiyonunun Patogenezi

Delta hepatit enfeksiyonunun patogenezi ile ilgili bilgiler sınırlıdır. Hepatit delta hastalığında klinik gözlemler genellikle immün aracılıklı bir sürecin olduğunu göstermiştir. HDV replikasyonu sitopatik değildir. Hücre içinde biriken fazla miktardaki S-HDAg'nin toksik olduğu gösterilmiştir. Akut enfeksiyon sırasında virüsün sitopatik etkisinin hakim olduğu düşünülmektedir. Ancak kronik enfeksiyonda virüse ait faktörlerden genotip ve HDAg tipi, konağın immün yanıtı, yardımcı virüs olan HBV'nin genotipi ve replikasyon düzeyinin patogenezi etkin olduğu düşünülmektedir (96). Bununla birlikte, sitopatik viral hastalığa işaret eden bulgular da gözlenmiştir. Bu hastalığın tipik bir örneği olarak Güney Amerika'nın kuzey bölümünde görülen ciddi hepatit salgını verilebilir (132). Çoğunlukla fulminan seyreden bu hepatit vakaları, Genotip-III delta virüs'ten kaynaklanmıştır. Kronik HDV enfeksiyonunda karaciğer biyopsisinde hepatositlerin çevresinde inflamatuvar hücreler görülmesi ve çeşitli otoantikorların oluşması immünopatogenezi desteklemektedir. Virüse karşı oluşan özgül antikorlar, akut enfeksiyonda düşük, kronik enfeksiyonda yüksek titrelerde saptanır. Bu nedenle virüsü nötralize etmediği düşünülür. HDAg'ye karşı oluşan IgM antikorlarının nötralizan etkisi ise kesin değildir; çeşitli çalışmalarda farklı sonuçlar alınmıştır (96). HDV viremisinin doğrudan karaciğer hastalığının evresiyle ilişkili olmaması da önemlidir. Hepatit D virüsüne karşı hücresele immün cevap birkaç araştırmacı tarafından tanımlanmıştır (133, 134) ve T-hücre cevaplarının kalite ve kantitesi enfeksiyonun kontrolü ile bağlantılıdır. Sitotoksik CD4+T hücrelerinin sayısı delta hepatit hastalarında, HBV ya da HCV enfeksiyonu olan bireylere oranla daha yüksek olduğu bulunmuştur (135). Bir araya getirilen sınırlı bilgiler, en azından HDV genotip I enfeksiyonunun da HDV'nin esas olarak immün-aracılıklı bir hastalık olduğunu ileri sürmektedir. Antiviral tedaviler bu yüzden enfeksiyonun uzun süreli kontrolünü sağlamak için anti-HDV immünitesini artırmayı da hedeflemelidir. Tedaviye yanıt HDV'ye spesifik immün yanıt ile ilişkili olabilir (99). Rados ve Samoa adalarında HDV antikorları pozitif, ancak karaciğer hastalığı olmayan grupların ortaya konması, HBV replikasyonunun HDV seyri üzerine etkisinin irdelenmesine yardımcı olmuştur. HDV'nin HBV replikasyonunu baskıladığı sıkça ortaya konmuştur (136, 137). Delta hepatitli hastaların % 70 ila % 90'ı HBV seviyeleri düşük olan HBeAg negatif

bireylerdir. Bu hastalarda ALT düzeyleri ile HBV DNA arasında ilişki bulunmaması, karaciğer hasarında HDV'nin etkin olduğunu düşündürmüştür. Taiwan'da bir grup kronik HDV hastasında HDV RNA düzeyleri düşerken ALT ve HBV DNA düzeylerinde artış olduğu gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, HBeAg (+) delta hepatitin seyri üzerine yeterli çalışma yapılmamıştır. HBeAg pozitif olan damar içi ilaç bağımlılarında aktif HBV replikasyonu ve HDV patojenitesinde artış bildirilmiştir (96). HBeAg-pozitif olan hastaların HDV ko-enfeksiyonu durumunda HBV DNA'larının negatif olabileceğini belirtmek önemlidir. Diğer bir taraftan, HBV pre-core stop kodonları delta hepatitli olan hastalarda da gelişebilir ve böylelikle HBeAg-negatif olan hastalarda önemli HBV DNA seviyeleri görülebilir bu da hepatit B'ye karşı antiviral tedavilerin uygulanmasını gerektirir. HDV'nin sadece HBV replikasyonunu değil, tri-enfekte olan hastalarda HCV replikasyonunu da baskıladığına yönelik artan kanıtlar da mevcuttur (99). Edinilen deneyimlere göre anti-HCV/HBsAg/anti-HDV-pozitif olan bireylerin beşte birinden azının HCV RNA'ları pozitifdir. Anti-HCV-pozitif/HCV RNA negatif olan hastaların kaçının HCV enfeksiyonunun iyileştiği ve kaç hastanın viral enfeksiyon durumunda sadece baskılanmış HCV replikasyonu gösterdiği açık olarak bilinmemektedir. Viral baskınlığın zaman içinde değişebileceği de not edilmelidir. Böylelikle üçlü enfekte hastalar yakından takip edilmelidir ve baskın virüs tedavisi düşünülmelidir (98).

1.2.7. Delta Hepatit'in Klinik Seyri

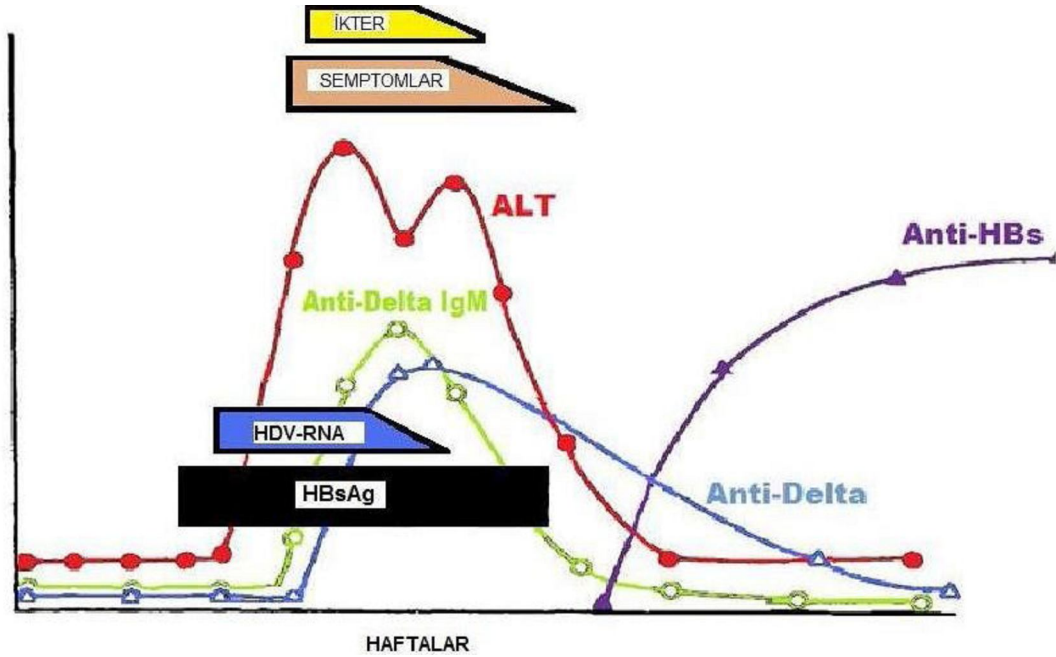
Hepatit D virüs enfeksiyonunun doğal seyrini ve karaciğer hastalığının bundan sonraki gelişimini belirleyen iki önemli aşama bulunmaktadır. Bunlardan birincisi hastalıkla karşılaşıldığında bağışıklık oluşturarak enfeksiyonu sonlandırabilme şansı, diğeri ise enfeksiyonun kronikleşmesi durumunda bunun asemptomatik taşıyıcılık veya kronik hepatit şeklinde seyretmesidir. Akut hepatit evresinin iyileşme veya kronikleşme şeklindeki yönelişinde enfeksiyonun başladığı yaş (bir anlamda da enfeksiyonun alınış biçimi) önem taşımaktadır. Enfeksiyonun vertikal yolla alındığı neonatal dönemde çoğunlukla asemptomatik (iktersiz) hepatit gelişip, % 90'a varan bir oranda kronikleşme sözkonusu iken, erişkin yaşta ikterli seyir daha fazla, kronikleşme oranı ise çok daha düşüktür (< %10). Hastalık sürecinin bundan sonraki seyri, bireyin immün yanıtı ile virüs arasındaki denge tarafından belirlenir (138, 139). Karaciğer hasarıyla HBV-DNA ve ALT düzeyi arasında anlamlı bir ilişki

olmaması bu olgularda gelişen karaciğer hasarının doğrudan HDV ile ilişkili olduğunu göstermektedir.

Hepatit delta virüs enfeksiyonunun muhtemel seyir şekilleri; akut, kronik, fulminan ve siroz/ hepatosellüler karsinom şeklinde sıralanabilmektedir (140).

1.2.7.1. Akut Delta Enfeksiyonu

Hepatit delta virüs taşıyan hastaların klinik seyrinde ve histopatolojik bulgularında bir kötüleşme olduğu daha ilk dönemlerde fark edilmiştir. Akut HDV enfeksiyonu üç farklı şekilde gözlenebilmektedir. Bunlardan ikisi toplumda koenfeksiyon veya süperenfeksiyon şeklinde görülmektedir. Üçüncü şekil ise sadece HBV ile ilişkili karaciğer transplantasyonu yapılan hastalarda belli bir süre sonra görülen sessiz HDV akut enfeksiyonudur (141, 142).

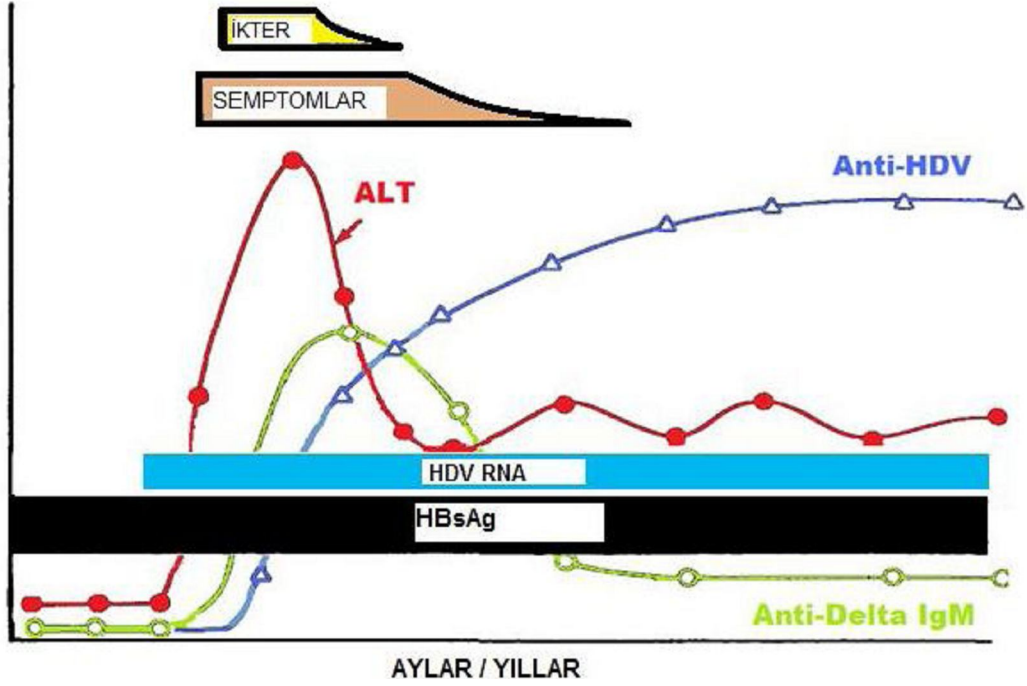


Şekil 6. Akut Delta koenfeksiyonunun klinik ve serolojik seyri (143)

Koenfeksiyon: Delta virüsünün hepatit B ile birlikte alınması koenfeksiyon olarak adlandırılmakta olup bu hastalık formunda klinik seyir büyük ölçüde tipik bir akut hepatit B enfeksiyonuna benzemektedir. Koenfeksiyonda fulminan hepatit riskinin arttığına ilişkin bazı bilgiler bulunmasına rağmen bu konu hala tartışmalıdır. Koenfeksiyonların kronik HDV enfeksiyonuna dönüşme oranı %2-20'dir. Delta koenfeksiyonu sık karşılaşılan bir durum olmayıp bu konuda yapılmış olan çalışmalar da sınırlı sayıdadır (104).

Hepatit delta virüs defektif bir virüs olduğu için koenfeksiyonun oluşabilmesi için iki virüsün aynı anda alınması gerekmektedir. Bu nedenle iki virüsün aynı anda bulunduğu bir kaynağa ihtiyaç vardır. Bu kaynak her iki virüsün canlılığını da korumuş olması gerekmektedir. Aynı kaynaktan alınan bu iki virüsün bulaşından sonrada HBV replikasyonu başlayana kadar HDV'nin kişinin immün yanıtından kaçarak varlığını sürdürüp daha sonra patojen hale gelmesi gerekmektedir. Kısacası bunun teorik olarak mümkün görünmesine rağmen pratikte zor görülen bir enfeksiyon formu olduğu muhakkaktır (144). Bir koenfeksiyon olgusunda serum aminotransferazları tipik olarak ortalama 2-5 hafta arayla iki kez yükselme gösterirler. İlk ALT yükselmesi HBV'ye immün yanıtın, ikincisi ise HDVAg'ye immün yanıtın göstergesidir. Hastalık, genellikle, 2-10 haftalık bir süre içerisinde kendiliğinden iyileşir, aminotransferazlar normale döner ve viremi göstergeleri serumdan kaybolur (104).

Akut HBV/HDV ko-enfeksiyonu vakaların %90'ından fazlasında iyileşme sağlar ancak genellikle fulminan seyir açısından yüksek risk içeren ciddi akut hepatite de sebep olabilir (145). Bunun aksine, kronik HBsAg taşıyıcısı olan hastalarda HDV süperenfeksiyonu durumunda hastaların sadece küçük bir kısmında HDV spontan olarak temizlenir. Eş zamanlı HBV ve HDV enfeksiyonunun histopatolojisinin tek başına HBV enfeksiyonunda görülenden daha ciddi olduğu yönündeki gözlem, şempanzelerle yapılan deneylerle de doğrulanmıştır (146). Hastalarda akut delta hepatitin çok ciddi seyrettiği birkaç salgın dünyanın farklı bölgelerinde tanımlanmıştır (138, 147, 148). Bununla birlikte, aşılama programlarının uygulanmaya başlamasına bağlı olarak Batılı ülkelerde son yirmi yılda akut delta hepatit oldukça nadir görülmeye başlamıştır.



Şekil 7. Akut Delta süperenfeksiyonunun klinik ve serolojik seyri (143)

Süperenfeksiyon: HBsAg pozitif bir kişinin sonradan HDV ile enfekte olması durumudur. Burada klinik seyir fulminan hepatite kadar gidebilen ağır bir akut hepatit atağı şeklinde başlamakta ve daha önceden mevcut olan hepatitin klinik, biyokimyasal ve histopatolojik bulgularında belirgin bir ağırlaşma ile devam etmektedir. Bu olgularda klinik seyir akut başlar daha şiddetlidir. İnkübasyon süresi koenfeksiyona göre daha kısa olduğu kabul edilmektedir. Kronikleşme oranı %70-95 olduğu ve özellikle genotip-III'ün daha hızlı kronikleştiği kabul edilmektedir.

İyi bilinen bu iki hastalık şeklinin dışında sonraki yıllarda karaciğer nakli yapılan hastalarda görülen ve HBV enfeksiyondan bağımsız olarak ortaya çıkan yeni bir delta hepatiti formu daha tanımlanmıştır. Delta süperenfeksiyonunun kronik hepatit B'nin doğal seyri üzerindeki etkisinin göstergesi kronik hepatit B olguları içerisinde Delta süperenfeksiyonunun farklı sıklıkta bulunması ve bunun hastalığın ağırlığı ile ilişkili olduğudur.

Hepatit delta virüsü'nün yaptığı enfeksiyonlar diğer hepatitlerle benzer olmakla birlikte daha ağır seyirlidir. Her iki formda da daha sık fulminan seyir görülmektedir. Kuluçka süresi ortalama 21-60 gündür. Yorgunluk, bulantı, iştahsızlık en sık görülen klinik yakınmalardır. Klinik belirtilerden 3-7 gün sonra sarılık ve karaciğer fonksiyon testlerinde yükselmeler izlenmektedir. Akut enfeksiyon tablosu genelde 15-75 gün sürmektedir (144).

Delta virüs enfeksiyonunu etkileyen önemli bir faktör üçlü enfeksiyonlardır. Birçok çalışmada HDV'nin HBV ve HCV'den daha baskın bir faktör olduğu ve onları inhibe ettiği görülmüştür. Öte yandan HIV ile birlikteliğin HDV enfeksiyonunu, HDV'ye immün cevabın çok zayıf olduğu durumlar dışında pek etkilemediği gösterilmiştir (149).

Delta hepatitinin doğal seyrine ilişkin veriler daha sınırlıdır. Bu noktada Delta hepatiti patogenezinin hala tam olarak anlaşılmamış olması klinik gözlemlerden elde edilen neticelerin değerlendirilmesini güçleştirmektedir. Hastaların akut evreden sonra düzenli ve uzun süreli prospektif takibinin yapılmıyor olması da doğal seyir ile ilgili doğrudan verilere ulaşmadaki bir diğer sıkıntıdır (139).

1.2.7.2. Kronik Delta Enfeksiyonu

Kronik hepatit formunda anormal karaciğer enzim değerleri, HBsAg (+) varlığı, anti-Delta (+) ve serumda HDV-RNA pozitifliğinin en az 6 ay süresince saptanmasıdır. HBV-DNA genellikle baskılandığı için saptanmamaktadır. Kronik HDV enfeksiyonu genelde, delta süperenfeksiyonu sonucu oluşmaktadır. Kronik HDV olguları tipik değildir ve klinik olarak diğer hepatitlerden ayrılmazlar. Kronik HDV enfeksiyonunda anti-HDV IgM ve IgG serumda görülür ve HDAg'de karaciğer dokusundan immünohistokimyasal boyalar veya hibridizasyon ile gösterilir (149).

1989 yılında Taiwan'da yapılmış olan bir araştırmada akut evrede saptanan 30 delta süperenfeksiyonu olgusu 6-96 ay arasında değişen sürelerle ileriye dönük olarak izlenmiştir. Anti-Delta (+) vakaların % 69'unda sürekli ALT yüksekliği, % 46'sında Kronik aktif hepatit ve yılda % 9,4'ünde siroz gelişimi izlenmiştir. Buna karşın kontrol grubunda bu oranlar anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Bu çalışmada siroz gelişme oranı % 9,4 /yıl olarak bulunmuştur. Vakaların % 25'i üç yıl, % 50'si 6-7 yıl içerisinde siroza dönüşmüştür (149).

Yapılan bazı çalışmalar, artmış fibrozisin progresyonu, artmış hepatoselüler karsinom riski ve siroz durumunda erken dekompanzasyonun eşlik ettiği kronik HDV enfeksiyonunun, kronik HBV monoenfeksiyonundan daha ciddi karaciğer hastalığına yol açtığını ortaya koymuştur (150, 151). Türkiye'nin güneydoğusunda, HDV, karaciğer sirozu ve hepatosellüler karsinom vakalarının yarısını oluşturur (117, 144). Yakın zamanda Tayvan'da yürütülen uzun dönemli gözlemsel bir çalışmada HDV-genotip I ile enfekte hastaların kümülatif sağkalım oranlarının 15

yıldan sonra % 50 kadar az olduğu bildirilmiştir (152). HDV enfeksiyonu aynı zamanda HIV ko-enfekte hastalarda daha yüksek karaciğer sirozu gelişmesi riski ile bağlantılıdır. İspanya’da yapılan bir kohort çalışmaya göre bu oran HIV/HBV/HCV/HDV-enfekte hastalarda % 66 iken, karaciğer sirozu görülen HBV/HCV/HIV-enfekte hastalarda sadece % 6’dır (153).

1.2.7.3. Asemptomatik HDV Olgularının İzlemi

Hepatit B virüsü enfeksiyonunun en önemli kaynağı asemptomatik taşıyıcılar olup, yine bu enfeksiyonla mücadelede en etkili yol asemptomatik taşıyıcıların ortaya çıkarılmasıdır (154).

Yapılan bir araştırmada anti-HDV pozitif olguların anti-HDV pozitif olguların % 59’unda HDV-RNA düzeyi yüksek saptanmış bu olguların ALT yüksekliği ile viral yük arasında bir ilişki bulunmamıştır (155). Anti HDV’si pozitif ve ALT düzeyi normal olan olgular asemptomatik HDV olarak tanımlanırlar. Bunların seyrinde HBV baskılandığı için HDV karaciğerde daha hızlı nekroz ve fibrosis yapar. Asemptomatik HDV olgularında çok nadiren HBeAg pozitif bulunabilir ama hep HBV-DNA düzeyi düşüktür. Yapılan bir çalışmada % 9.1 oranında anti HDV pozitif, ALT yüksek HBV taşıyıcılarında HDV-RNA negatif bulunmuştur (156). Asemptomatik HDV olgularında ALT yüksekliği HDV-RNA düzeyi ile ilişkili olup (157) bunların HDV-RNA açısından değerlendirilerek interferon tedavisi ile viral replikasyon baskılanması gerekir. HDV-HBV koenfeksiyonunda siroz gelişme oranı normal kronik HBV olgularından daha yüksek olduğu için asemptomatik HDV olgularında yakından izlenmesi gereklidir (144).

1.2.8. Delta Hepatitin Tanısı

HBV enfeksiyonu olmayan kişilerde HDV araştırılmasına gerek yoktur. HDV enfeksiyonunun tanısında serumda serolojik göstergeler ve HDV-RNA araştırılır. Ko-enfeksiyon ve süperenfeksiyon ayrımı için anti-HBc IgM testinden yararlanır. Süperenfeksiyonda hastalarda HBsAg’nin negatif bulunabileceği de unutulmamalıdır (96).

1.2.8.1. Serolojik Testler

HDaG: Akut enfeksiyon da antikorlar oluşmadan önce kanda kısa bir süre saptanır. Aktif viral replikasyonu gösterir. Serokonversiyondan sonra antikorlar ile immünokompleks oluşturduğu için saptanamaz. Kronik enfeksiyon da genellikle

negatiftir. HDAg'nin "immünoassay" testleri ile saptanabilmesi için viral zarfın denatürasyonu gerekir. Akut enfeksiyonun erken tanısı için yararlıdır, ancak tekrarlayan testlerle araştırılması gerekir. İmmünesupresyonlu hastalarda daha uzun süreler kanda kalabilir.

Anti-HD Ig M: Akut enfeksiyon da HDAg'den daha sonra pozitifleşir. Akut enfeksiyon da düşük titrelerde, kronik enfeksiyonda çok yüksek titrelerde saptanır. Ancak kronik enfeksiyon da saptanan IgM antikorlarının monomerik yapıda olduğu gösterilmiştir. Anti-HD IgM antikorlarının azalması ve kaybolması hastalığın iyileşmeye yönlendiğini gösterir. Tedavi izleminde yararlıdır.

Total anti-HD veya anti-HD IgG: Ko-enfeksiyon da klinik belirtiler ortaya çıktıktan 3-8 hafta, süperenfeksiyonda ise iki-üç hafta sonra pozitifleşir. Hem kronik olgularda, hemde iyileşen olgularda pozitif bulunmuştur. Miktarı HDV replikasyonu ile koreledir. Yüksek titrelerde olması, kronik enfeksiyon da kötü prognozu gösterir (96).

1.2.8.2. Moleküler Testler

Hepatit delta virüs enfeksiyonunun teşhisi için kullanılan serolojik testler yeterli ancak sensitivitesi ve spesifitesi düşüktür. HDV RNA hibridizasyonu ve tersine transtranskripsiyon (RT-PZR) gibi moleküler tekniklerdeki gelişmeler tanının ve hassasiyetin artmasını ve hastalığın seyrinin daha iyi anlaşılmasını sağlamıştır. Bu gelişmeler enfeksiyonun evresini doğru değerlendirmek, tedaviye cevap ve KC transplantasyonu sonrası reenfeksiyon oluşumu için klinisyene yardımcı olur (151, 159).

HDV-RNA saptanması: Viral replikasyonun en iyi göstergesidir.

Hibridizasyon testleri: HDV RNA saptanmasında ilk kullanılan testlerdir. Referans merkezlerinde uygulanan bu "in-house" testlerle 104-106 genom/ml HDV RNA saptandığı bildirilmiştir

Kalitatif Revers Trankripsiyon (RT)-PZR: HDV RNA'nın daha duyarlı bir yöntemle saptanmasını sağlar. Duyarlılığı 10-100 genom/ml kadardır. HDV'nin genetik değişkenliği göz önüne alınarak çoğaltma hedefi, genomun en korunmuş bölgelerinden seçilmelidir. Sıklıkla HDAg'ni kodlayan bölgenin C-terminali çoğaltılır. Enfeksiyonun tanısında şu an için en güvenilir testtir. Tedaviye yanıtın değerlendirilmesinde, transplantasyon sonrasında re-enfeksiyonun araştırılmasında

da kullanılır. Ancak "in-house" olarak yapılan bu testlerin standardizasyonu gereklidir (96).

Kantitatif Revers Trankripsiyon RT-PZR: Gerçek zamanlı PZR yönteminin kullanıma girmesinden sonra HDV RNA'nın hem duyarlı, hem de kantitatif olarak saptanmasına yönelik çalışmalar olmuştur. Bu amaçla Japonya ve Fransa'da yapılan çalışmalarda 100 kopya/ml duyarlılığında ve tüm genotipleri saptayabilen testler geliştirilmiştir. Rutin kullanımda hem tedaviye yanıtın izlenmesinde, hem de HDV patogenezinin aydınlatılmasında yararlı olacağı düşünülmektedir (96).

Tablo 2. HBV-HDV Koenfeksiyon ve süperenfeksiyonunun serolojik olarak karşılaştırılması

HDV testleri				HBV testleri				YORUM
HDV RNA	HDAg	Anti-HD IgM	Total anti-HD	HBsAg	Anti-HBc IgM	Anti-HBc IgG	Anti-HBs	
+	+	-	-	+/-	+	-	-	Akut ko-enfeksiyon, erken dönem
+	-	+	+	+/-	+	+	-	Akut ko-enfeksiyon, geç dönem
+	+/-	+/-	+/-	+/-	-	+	-	Akut süperenfeksiyon
+	-	+	+	+	-	+	-	Kronik enfeksiyon
-	-	-	+	-	-	+	+	Geçirilmiş enfeksiyon
-	-	-	-	-	-	-	-	Enfeksiyon yok

1.2.9. Laboratuvar Bulguların Delta Hepatitinin Klinik Seyri Belirlemede Yeri ve Önemi

1.2.9.1. Hepatit D Ko-enfeksiyonunun Laboratuvar Tanısı

Ko-enfeksiyonların çoğu klinik olarak akut ikterik hepatit B enfeksiyonuna benzer. Karaciğer nekrozu tipik olarak iki pik yapar. İlki HBV'ye bağlı ikincisi HDV'ye bağlıdır. Koenfeksiyonda erken antijenemik faz olmayabilir. HDV'e karşı IgG ve IgM antikorlarının artışı ile karakterizedir. Akut hepatitin başlangıcından itibaren HDV'ye karşı antikor cevabı yavaştır. Başlangıçta HDV'ye karşı IgM cevabı yavaştır. Günler hatta haftalarca gecikebilir. IgG cevabı ilk önce konvalesan fazda görülür. HBsAg pozitifliği ile başvuran hastada HDV koenfeksiyonunu doğrulamak için uzun süreli takip gerekir. Koenfeksiyonda HBsAg pozitif, anti-HBc IgM pozitif, anti-HDV IgM pozitif, HDV RNA RT-PZR ile pozitifdir (160).

1.2.9.2. Hepatit D Süperenfeksiyonunun Laboratuvar Tanısı

ALT'de bifazik seyir genellikle görülmez. Daha önce HBsAg pozitifliği bilinen (kronik hepatit B'li) bir olguda akut hepatik hasar var ise (ALT üst sınırın 10 kat ve üzeri) nedenlerinden biri olarak anti-HDV araştırılmalı ve pozitifliği durumunda süperenfeksiyon düşünülmelidir. HBsAg pozitif, anti-HBc IgM negatif olan bir olguda anti-HD IgM, total anti-HD, HDV RNA veya HDAg'nin herhangi birinin pozitifliğinde tanı konur (160).

1.2.9.3. Kronik Viral Hepatit D (KHD) Enfeksiyonunun Tanısı

HBsAg, anti-HBc IgG, yüksek titrede [1/1000 (100-1000) ve üzeri] total anti-D pozitif ve anti-HBc IgM negatif bir olguda 6 aydan fazla süren serum HDV RNA PZR ve serum HDAg'nin herhangi birinin pozitif bulunması durumunda kronik hepatit D düşünülmelidir. Altıncı ay ve sonrasında şüpheli olgularda karaciğer biyopsisinde HDAg saptanması ile tanı kesinleştirilebilir (160). HBsAg-pozitif olan her hastaya en az bir kez anti-HDV antikoları bakılmalıdır. Anti-HDV yokluğunda HDV RNA'nın doğrudan yapılmasının bir yarar sağlayıp sağlamadığı hakkında bir kanıt mevcut değildir. Anti-HDV'nin pozitif sonuç vermesi "aktif" delta hepatit varlığına işaret etmeyebilir çünkü HDV-RNA negatif gelebilir, bu da HDV enfeksiyonunun iyileştiği anlamına gelir. Aynı zamanda uzun süre içinde anti-HDV antikoları, iyileşmeden sonra kaybolabilir. Bununla birlikte, hastada HBsAg serokonversiyonu oluştuğunda bile anti-HDV yıllarca devam edebilir (98). "Aktif" replikatif delta hepatit varlığı, HDV RNA'nın tespit edilmesiyle de doğrulanmalıdır. HDV RNA pozitifse, karaciğer hastalığının derece ve evresinin değerlendirilmesi, hepatoselüler karsinom açısından takip edilmesi ve antiviral tedavinin düşünülmesi gerekmektedir. HDV RNA kopyası bazı laboratuvarlar tarafından sayılabilmektedir. Fakat günümüze HDV RNA seviyeleri ile karaciğer hastalığının klinik belirteçleri arasındaki korelasyona yönelik herhangi bir kanıt bulunmamaktadır. Bu yüzden günümüzde HDV RNA quantifikasyonu sadece antiviral tedavi endike olduğu durumlarda yararlıdır. Viral yükün azalma seviyesine bağlı olarak, antiviral tedavinin sonlandırılmasına yönelik kurallar halen araştırılmaktadır. 24 haftalık tedavi sonrasında HDV RNA seviyelerinde 3 log'dan daha az düşüş görülen hastalar, PEG-2 α -2b antiviral tedavisinden fayda görmeyecektir (161).

1.2.10. Delta Hepatitlerin Tedavisi

Kronik HDV enfeksiyonu olan kişilerde, sadece HBV enfeksiyonu olanlara göre karaciğer hastalığı daha hızlı gelişir. Bu yüzden tanı konar konmaz tedavinin planlanması gerekir. HBV enfeksiyonunun tedavisinde kullanılan birçok nükleozid ve nükleotid analoglarının HDV'ye karşı etkisiz olduğu gösterilmiştir. Famsiklovir 1990'larda HBV enfeksiyonunu tedavi etmek için kullanılmış (162). Türkiye'de yapılan bir çalışmada lamivudin, famsiklovir ve ribavirinin HDV'ye karşı önemli antiviral aktiviteye sahip olmadığı gösterilmiştir. Pegile interferon kullanımı ile daha kalıcı yanıt elde edildiği bildirilmiştir (163). Tedavide yüksek doz interferon kullanılması FDA tarafından onaylanan tek seçenektir. Tedaviye yanıt % 70 civarındadır. Tedavi ile ALT'nin normal düzeye inmesi ve HDV RNA'nın kaybolması hedeflenir. Anti-HD IgM'in düşmesi yanıtın uzun süreli olduğunu düşündürür. Relapslar geç, genellikle bir yıl sonra görülür (96). Yine lamivudin başka delta hepatit çalışmalarında da etkisiz bulunmuş (164-166). İnterferonla kombine kullanılan ribavirin tedavisi ümit verici bulunmuştur. HBV/HDV/HIV-enfekte hastaların HAART (highly active anti retroviral therapy) aldığı ortalama 6 yıldan daha fazla süreli gözlemsel bir çalışmada, bu süreden sonra, hastaların HDV RNA düzeylerinde $7 \log_{10}$ 'dan $5,8 \log_{10}$ 'a düşüş gözlemlendiği ve 16 hastanın 3'ü HDV RNA negatif hale geldiği belirtilmiştir (167). Bu nedenle, HBV polimeraz inhibitörleri ile çok uzun süreli tedaviler muhtemelen HBsAg seviyelerindeki düşmeye bağlı olarak delta hepatit için yararlı görülmüştür. Günümüzde onaylanmış HBV polimeraz inhibitörlerine alternatif diğer bir ümit verici tedavi Klevudindir. Klevudin, hepatit B tedavisi için geliştirilmiş bir nükleozid analogudur ve son zamanlarda dağışçanlarında delta virüs viremisini inhibe ettiği gösterilmiştir. İnsanlarda henüz HDV için klevudin tedavisine dair bilgi yoktur (168).

Prenilasyonu inhibe eden ajanlar da L-HDAg prenilasyonunu engelleyerek virüs partikülünün oluşmasını yani replikasyonunu durdurabilmektedir. Konu ile ilgili çeşitli çalışmalar yapılmaktadır (96).

1.2.10.1. Rekombinant İnterferon Alfa

IFN-alfa delta hepatitinin tedavisinde 1980'lerin ortalarından beri kullanılmaktadır (169). O zamandan bu yana HDV enfekte hastalarda interferon alfanın farklı süre ve dozlarda kullanılabileceği gösterilmiştir. Fakat çalışmalarda

sonlanım noktaları farklı olduğundan, verilerin karşılaştırılması zordur ve az sayıda çalışmada zaman sürecinde HDV RNA seviyeleri takip edilmiştir. Yüksek doz IFN alfa' nın kullanıldığı bir randomize İtalyan çalışması, delta hepatitinde IFN tedavisinin uzun süreli faydalı sonuçlar doğurması açısından özellikle önemlidir (170). Bazı çalışmalarda uzun dönem IFN kullanmıştır ve iki yıllık tedavinin HDV RNA klerensi açısından üstün olduğu görülmüştür (171).

1.2.10.2. Pegile İnterferon Alfa

Son zamanlarda, pegile IFN delta hepatitin tedavisinde küçük çalışmalarda kullanılmış ve % 20 civarında kalıcı virolojik cevap oranları elde edilmiştir (171,172).

Bir çalışmada kronik HDV enfeksiyonu ve kompanse karaciğer hastalığı olan 90 hasta (Almanyadan 42, Türkiyeden 39 ve Yunanistandan 9) PEG-IFN α -2a ve adefovir dipivoxil ile farklı şekil ve dozlarda toplam 48 hafta tedavi planlanmış (98). Hastalarda üç gruba ayrılmış. HBV DNA ve HDV RNA real-time PZR ile ölçülmüştür. Hastalığın ilerlemesine ya da IFN ilişkili yan etkilere bağlı olarak toplam 10 hasta 48 haftalık tedavi sürecini tamamlayamamıştır. 48. haftayla beraber, tüm PEG-IFN gruplarında yalnızca adefovir monoterapisi alan gruba göre ortalama HDV RNA seviyelerinde anlamlı düzeyde daha fazla düşüşler görülmüştür. HDV RNA sırasıyla hastaların % 21, % 30 ve % 8 inde negatif olmuş (PEG-IFN vs. adefovir, $p=0,06$). Sadece PEG-IFN α -2a ya da adefovir monoterapisi alan hastaların 0. ve 48. haftalardaki HBsAg seviyeleri benzer iken, PEG-IFN α -2a/adefovir kombinasyonu alan grupta 48. haftada HBsAg seviyelerinde $1.1 \log_{10}$ IU/ml düşme saptanmıştır ($p < 0,001$). Bu veriler, Yunanistan'da yapılmış olan ve delta hepatitli hastalardaki uzun süreli IFN tedavisi ile HBsAg seviyelerinde elde edilen anlamlı düşüşlerinin saptandığı bir çalışmayla paraleldir. HIDIT-1 çalışması sonuçlarına göre; (1) PEG-IFN α -2a, 48 haftadan sonra hastaların % 40' indan daha fazlasında HDV'ye karşı anlamlı antiviral etkinlik göstermiştir ve bunların % 25'inde HDV RNA negatifleşmiştir; (2) adefovir dipivoxil HDV RNA düşürmede önemsiz bir etkiye sahiptir fakat ciddi HBV replikasyonları olan hastalarda düşünülebilir (3) PEG-IFN α -2a + adefovir kombinasyonunun, HBV DNA yada HDV RNA düşürülmesinde avantajı yoktur (4) HBV enfekte hastalarda PEG-IFN + nükleotid kombine terapisi HBsAg seviyelerini düşürmede monoterapiye karşı üstündür. Şu

anda, delta hepatitin tedavisinde PEG-IFN α -2a + tenofovir kombinasyonlarının etkinliği araştırmaları devam etmektedir. Ayrıca, alternatif tedavi seçeneklerinin de keşfedilmesi gerekmektedir. Prenilasyon inhibitörleri bunlar arasında ümit vericidir. HDV replikasyonu prenilasyon basamağına bağlı olur ve prenilasyon inhibitörleri malignite tedavisinde kullanılmak üzere yeni geliştirilmiştir (98).

1.2.11. Korunma

Delta virüs enfeksiyonu için etkili bir tedavi olmadığından korunmaya önem verilmelidir. HDV'nin replikasyonu HBV'ye bağımlı olduğundan, HBV enfeksiyonundan korunma HDV'den de koruyacaktır. Bunun için Hepatit B aşısı kullanarak HBV enfeksiyonunu önleyerek HDV enfeksiyonunu da engellemiş oluruz. Birçok ÷lkede hepatit B'ye karşı geniş çaplı aşılama kampanyaları başlatılmıştır. Bunun sonucu olarak HBV ve HDV enfeksiyonu sıklığında azalma beklenmektedir. Deneysel çalışmalarda rekombinant HDAg aşıların koruyucu etkinliği gösterilememiştir. HDV'den korunmada temel prensip hepatit B hastalığı geçirmemiş veya bağışık olmayanların aşılanması, kronik hepatit B hastalarının ise cinsel temasla geçiş ve kontamine iğne kullanma gibi riskli davranışlar konusunda eğitilmeleridir. Bu hastaların cinsel partnerleri HBV enfeksiyonu yönünden test edilmeli ve eğer negatif iseler HBV enfeksiyonuna karşı aşılanmalıdır. Ayrıca HBV ve HDV gibi benzer yollarla bulaşan, başta humanimmunodeficiency virüs (HIV) olmak üzere diğer seksuel yollarla bulaşan hastalıkların kontrolüne yönelik çabalarda hastalıktan korunmada önemlidir (98).

1.2.12. Viral Genotipleri Belirlemede Kullanılan Moleküler Yöntemler

Enfeksiyonun varlığını araştırmada kullanılan hibridizasyon testleri ve nükleik asit amplifikasyon testlerinde korunmuş bölgeler hedef olarak seçilmektedir. Genotip belirlemelerinde ise genotiplere özđü ayırt edici nükleik asit dizileri bulunduran genomik bölgeler seçilir. Elde edilen dizinin filogenetik analizi ile genotip belirleme altın standart olarak kabul edilir. Ancak daha basit ve maliyeti düşük genotiplere özđü dizilerin restriksiyon enzim kesim bölgelerine göre RFLP, özđül PZR, hibridizasyon teknikleri, heterodubleks mobilite teknikleri, tek sarmallı konformasyon çeşitliliğine dayalı yöntemler SSCP, CFLP analizleri de kullanılmaktadır (8).

Restriksiyon enzimleri kullanılarak DNA'nın farklı büyüklükteki fragmanlara ayrılması RFLP olarak adlandırılır. Bu yöntem polimorfizm çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Restriksiyon enzimleri, DNA üzerinde yaklaşık 5-10 baz uzunluğunda belirli bir nükleotid dizisini tanıyarak bu noktada kesim yapar ve DNA'yı ikiye ayırır. İlki Hamilton tarafından keşfedilen *Hind III* başta olmak üzere, 200'den fazla farklı bakteri türünden, her biri bakterinin orijinal isminin kısaltması ile anılan çok sayıda restriksiyon enzimi bulunmuştur. Her DNA molekülü farklı kesim noktalarına sahip bölgeleri içerir. Bu DNA bölgeleri aynı restriksiyon enzimi kullanılarak kesildiğinde bireylerin taşıdığı mutasyonlara bağlı olarak değişik miktar ve uzunlukta parçalar elde edilebilmektedir. Yöntem PZR ürününün restriksiyon enzimleri kullanılarak kesimi ve elektroforez ile kesilen fragmanların ayrımı temeline dayanır (8).

RFLP analizinin daha kolay uygulanır olabilmesi açısından seçilen enzim büyük önem taşımaktadır. Seçilen enzimin kesilmek istenilen DNA'yı birden fazla noktada kesmesi sonucu oluşan çok sayıda ve birbirine yakın büyüklükteki fragmanlar analizi zorlaştırmaktadır. RFLP tek nokta mutasyon analizlerinde sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Tek nokta mutasyonları ile meydana gelen veya zarar gören enzim kesim noktaları kullanılarak bu bölgelerde oluşan mutasyonları tespit etmek mümkündür. Mutasyon noktasını çevreleyen primerler ile gerçekleştirilen PZR reaksiyonunun ardından tek nokta mutasyon bölgesinden kesen bir enzim seçilerek analiz edilir.

Genotip testlerinde kullanılan yöntemlerden altın standart nükleik asit dizi analizi olmakla birlikte rutin laboratuvarlarda kullanımı zordur. Bu amaçla ticari kitler ve sistemler geliştirilmiştir. Filogenetik analiz, türlerin evrensel olarak birbirlerine ne kadar yakın olduklarını ortaya koymak için kullanılır. Bir organizmayı oluşturan molekülleri kodlayan nükleik asitlerin incelenmesi ve başka organizmalardaki nükleik asitlerle karşılaştırılması sonucunda organizmaların birbirlerinden uzaklığı değerlendirilebilir (8).

Viral genotiplerin belirlenmesinin, epidemiyolojik verilerin yanı sıra klinik anlamıda olabileceğinden tanısal viroloji laboratuvarlarında yer almaktadır. Viral yük ile birlikte tedavinin dozu ve süresini belirlemede önemlidir.

Genotipler hastalığın prognozu üzerinde önemli ölçüde değiştirdiğinden, ayrıca tedavi ve tedaviye yanıtı etkileyebildiğinden farklı genotiplerin bir popülasyonda belirlenmesi önemlidir. Dünyanın farklı alanlarında yapılan HDV genotiplendirme çalışmaları HDV'nin evrimi ve yayılımının anlaşılması için değerlidir. HBV ve HCV'nin farklı genotiplerinin olduğu, her genotipin farklı bir klinik tablo yaratmasının önemi bilinmektedir. Buna bağlı olarak HDV genotiplerinin de belirlenmesinin aynı nedenlerden dolayı önem arzettiği kabul edilmektedir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya, Fırat Üniversitesi Hastanesi İç Hastalıkları Gastroenteroloji Anabilim Dalı ve Enfeksiyon Hastalıkları polikliniğine 2010–2011 tarihleri arasında başvuran ve kronik hepatit B tanısı ile takip edilen 16 yaşından büyük, 35 kadın ve 78 erkek hasta alındı. Bu çalışma için, Fırat Üniversitesi Etik Kurulu onayı alınmıştır (19.03.2009/Toplantı Sayısı: 03, Karar No: 02). Çalışma grubunu oluşturacak hasta serumları, rutin olarak anti-delta antikoru bakılmış kronik hepatit B olguları arasından seçileceği için, hasta gruplarından Fırat Üniversitesi Etik Kurulunun kararı doğrultusunda hasta onam formu alınmamıştır. Hastaların laboratuvar bulguları hastane otomasyonundan retrospektif olarak incelendi. Çalışmaya alınan hastalarda; HBsAg titresi, HBcAg titresi, anti-HBcAg titresi, HBV-DNA titresi, total anti-delta IgG antikoru bakılmış olma şartı arandı. Toplanan serum örnekleri HDV yönünden incelenmek üzere Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı moleküler laboratuvarına alınarak RNA izolasyonu yapılmaya kadar -80°C’de saklandı. Üretici firmanın direktifleri doğrultusunda, HBV DNA kantitatif PZR yöntemi (HBV monitor, Roche) ile test edildi. HDV RNA’da kantitatif PZR yöntemi (Light Cycler, Roche) ile test edildi. Kronik HBV olduğu tespit edilen anti-delta antikoru pozitif HDV şüphesi olan hastaların serumları alınarak moleküler mikrobiyoloji laboratuvarında RT-PZR ve semi-nested PZR ile çalışıldı. Agaroz jel elektroforez sonunda 441 bp uzunluğunda görülen amplifiye RNA’ların tümüne RFLP yapıldı. Rastgele seçilen 11 PZR ürünü sekansa gönderildi ve sonuçlar filogenetik ağaç programına yerleştirildi.

2.1. Biyokimyasal Parametrelerin Ölçümü

Tüm hastaların biyokimyasal parametreleri; total protein, albumin, total bilirubin, LDH, ALT, AST ve GGT olarak; Olympus AU 600 (Olympus Optical Co. Ltd, Japan) oto analizöründe ticari kitler kullanılarak ölçüldü. Hematolojik parametreler için CELL-DYN 3700, USA cihazı kullanıldı.

2.2. Serolojik Parametrelerin Ölçümü

Tüm hastaların serolojik parametreleri olan; HBsAg, anti-HBs, HBeAg, anti-HBe, anti-HBcAg markerlerine Makro Eliza (Abbott AxSYM System, Germany) yöntemi ile anti-delta markerine mikroeliza (Murex anti-delta; Abbott, Portugal) yöntemi ile bakıldı.

2.2.1. HBV DNA'nın Kantitatif Belirlenmesi

HBV DNA kantitatif PZR yöntemi ile üretici firmanın (HBV monitor, Roche) direktifleri doğrultusunda otomatik olarak test edildi. Cihazın alt ve üst sınır duyarlılıkları 20-170.000.000 IU/ml'dir. Cihaz sonuçları U/ml olarak verildiğinden HDV RNA sonuçlarıyla uyumlu hale getirmek amacıyla HBV DNA sonuçları 5.8 ile çarpılarak kopya/ml'ye çevrilerek sonuçlar değerlendirildi.

2.2.2. HDV RNA'nın Kantitatif Belirlenmesi

HDV RNA kantitatif PZR yöntemi ile üretici firmanın (Light Cycler, Roche) direktifleri doğrultusunda otomatik olarak test edildi. Cihazın alt ve üst sınır duyarlılıkları 400- 40.000.000 kopya/ml'dir.

2.3. Kimyasal Maddeler, Sarf Malzemeler ve Cihazlar

DNA izolasyon kiti (Vivantis marka GF-I nükleik asit ekstraksiyon kiti), primerler (IDT), deoksinükleotid trifosfat (dNTP) seti (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (Vivantis), MgCl₂ (Fermentas), buffer (Fermentas), *Taq* DNA polimeraz (Fermentas), 50 ve 100 bç'lik DNA markeri (Fermentas), Restriksiyon Enzimleri (RE) *Sma I* (Vivantis) ve *Xho I* (Promega), agaroz (Appllichem, Germany), ethidium bromide, bromphenol blue, xylene cyanole, alkol (Scharlau ET 006, Germany), elektroforez aparatı (Consort E833, Belgium), elektroforez tankı, fotoğraf makinesi (Polaroid, UK) ve fotoğraf filmi (Polaroid 667), ısı bloğu (Major Science MD- 02, Belgium), santrifüj cihazı (Hettich Zentrifugen Mikro 22R, Germany), PZR cihazı (AB Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler, Singapour), 10- 100 ve 1000 µl pipetler (Medisis), ultraviyole transilluminatör (Vilber Lourmat, France), elektronik hassas terazi (Sartorius BÇ 410, Germany), hız ayarlı vortex (VELP Scientifica, Italy)

2.3.1. Serum Örneklerinden Kalitatif HDV RNA Ekstraksiyonu

HDV RNA, 100 mikrolitre serum örneğinden Vivantis marka GF-I nükleik asit ekstraksiyon kiti ile üretici firmanın direktifleri doğrultusunda ekstrakte edildi ve 50 mikrolitre olarak sulandırıldı.

İzolasyon protokolü şu şekilde uygulandı:

1. 100 µl hasta serumundan alınıp RNA-Binding Column tüplerine aktarılıp 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilip, üst kısım alındı ve altta kalan sıvı atıldı.
2. 500 µl Wash Buffer ekleyip 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Üst kısım alınıp, altta kalan sıvı atıldı.
3. Tüpe 70 µl DNase I Digestion Mix konulup (direk membran üzerine pipetleyerek) 15 dakika oda ısısında beklendi.
(Digestion mix için örnek başına DNase I'den 7 µl, Digestion Buffer'dan 56 µl, Digestion enhancer' den 7 µl ayrı bir ependorf içerisinde pipetlenerek mix haline getirilerek hazırlandı).
4. Tüpe 500 µl İnhibitör Removal Buffer konup, 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Üst kısım alınıp, altta kalan sıvı atıldı.
5. 500 µl Wash Buffer eklenip 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilip, üst kısım alındı ve altta kalan sıvı atıldı.
6. Tekrar 500 µl Wash Buffer ekleyip 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilip, üst kısım alındı ve altta kalan sıvı atıldı.
7. Kalıntıların kalmasını engellemek için tekrar 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
8. Üstteki membranlı kısmı yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıp 40-60 µl dH₂O (RNase-Free Water) direk membran üzerine eklenip 1 dakika bekletildi ve 13000 rpm'de 1 dakika boyunca santrifüj edildi.
9. Kolon atılarak mikrosantrifüj tüpü, içine akmış olan sıvı ile birlikte alındı. Genomik RNA içeren bu sıvı, kullanılıncaya kadar -80 °C' de saklandı.

2.3.2. Oligonükleotidler (Primerler)

Çalışmamızda Mirshafiee ve ark. (173) ve Theamboonlers ve ark. (181)'nın kullandıkları genotiplendirme için genellikle ideal olduğu kabul edilen nt 907-1308 arası bölgeyi amplifiye eden oligonükleotidler (primerler) kullanıldı. Primerlerin nükleotid dizileri Tablo 3'de gösterilmiştir.

Tablo 3. Çalışmada kullanılan HDV-I, II ve III primerleri

Primer I	5'ATG CCA TGCCGA CCC GAA GAG GAA 3' (nt 884-907)
Primer II	5'GGC CTC TCA GGG GAG GAT TCA C 3' (nt 1.334-1.313)
Primer III	5' CTC AGG GGA GGA TTC ACC GAC A 3' (nt 1.329-1.308)

2.3.2. Stok Primerlerin Hazırlanışı

Firmadan alınan primerler üzerinde yazan nmol miktarının (83.1 nmol) 10 katı kadar sulandırılarak stok primerler hazırlandı. Sonra her çalışmada tek kullanım için (20 pmol'lük) ayrı ayrı ependorflara 20 µl HDV primeri ve 80 µl dH₂O konularak PZR primerleri hazırlandı.

2.3.3. cDNA sentezi (RT-PZR Aşaması)

HDV II primerleri ve M-MuVL reverse transcriptase enzimi (Fermentas Co.,) kullanılarak RNA peletinin komplementer DNA'ya (cDNA) revers transkripsiyonu (RT) yapıldı.

Mikrosantrifüj tüpleri numaralandırılarak, her bir tüpe HDV RNA örneği (ekstraksiyon ürünü) ve 20 pmol primer II (5'GGC CTC TCA GGG GAG GAT TCA C 3') konularak, primerlerin bağlanması için 70⁰C'de 10 dk süresince termal cykler cihazında bekletildi.

Ardından, 20 U M-MuVL RT enzimi, 5 mM dNTP, 5X reaksiyon tamponu, 50U RNaz inhibitörü ve dH₂O içeren mix hazırlanarak cihazdan çıkarılan ependorflara örnek başına 10 µl olacak şekilde eklenerek 22 µl toplam hacim elde edildi ve cDNA sentezi için 37⁰C'de 1 saat bekletildi.

2.3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Semi-nested PZR'nin birinci basamağında cDNA amplifikasyonu için, RT aşamasında elde edilen c- DNA'dan 5 µl, PZR-mix'den ise 45 µl kullanıldı. Her bir tüpe MgCl₂, buffer (MgCl₂ + KCl), dNTP (2.5 mM), ileri (forward) ve geri (reverse) primerler (primer-I ve primer-II), *Taq* DNA polimeraz ve dH₂O'dan oluşan PZR mix karışımı konularak toplam 50 µl üzerinden PZR kuruldu. Tüpler cihaza

yerleştirilerek ilk aşamada çift sarmal DNA moleküllerinin denatüre edilmesi amacıyla 95°C'de 4 dakikalık bir döngüye tabi tutuldu. PZR işleminin ikinci aşaması ise sırasıyla 95°C'de 2 dakika ayrılma (denaturation), 60°C'de 1 dakika bağlanma (annealing), 72°C'de 1 dakika uzatma (elongation) olmak üzere 36 döngü üzerinden gerçekleştirildi. Otuzaltı siklusun sonunda üçüncü aşama olan uzatma periyodu için 72°C'de 10 dakika tutuldu. İkinci PZR basamağında ise, 1. PZR ürünü, 20 pmol'lük primerler (HDV-I ve HDV-III), PZR tamponu (MgCl₂ + KCl), MgCl₂, 2.5 mM dNTP, *Taq* DNA polimeraz, dH₂O'dan oluşan PZR mixi hazırlanıp tüpler cihaza yerleştirilerek I.PZR ile aynı döngüler uygulandı.

Çalışmanın her aşamasında pozitif ve negatif kontroller kullanıldı. Pozitif kontrol olarak laboratuvardaki rutin çalışmalarda, daha önce Delta virüs pozitif olduğu tespit edilen serum örneklerine ait RNA'lar kullanıldı. Negatif kontrol olarak ise, hem RNA izolasyonu, hem de PZR aşamalarında steril DEPC'li (diethylpyrocarbonate) su (nuclease- free water) (Applichem, Germany) kullanıldı.

2.3.5. PZR Optimizasyonu

Polimeraz zincir reaksiyonu denemelerinde optimum sonucun elde edilebilmesi için; siklularda, bağlanma ısılarında ve template DNA miktarlarında bazı değişiklikler yapıldı. 52°C, 56°C ve 60°C bağlanma ısıları denenerek yapılan PZR'lerde en iyi sonucun 60°C'de saptandığı görüldü.

2.3.6. PZR Ürünlerinin Görüntülenmesi

Öncelikle 150 ml. erlen-mayer içerisine 1 gr. agaroz (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Almanya) bırakıldı. Üzerine 50ml 1X TAE (Tris- Asetat –EDTA; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Almanya) tamponu ilave edildi ve karışım mikrodalga fırında kaynatılarak çözüldü. Jelin 50-55°C'ye soğuması beklendi ve jelle 0.5 µg/ml etidyum bromid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Almanya) ilave edildi. Hazırlanan % 2 lik agaroz, jel tarağı yerleştirilmiş jel tablasına döküldü. Agarozun donması için 15 dak. beklendi. Taraklar çıkartıldı ve jel tablası elektroforez tankına yerleştirildi. PZR ürünleri, 5 kısım ürün, 1 kısım 6X yükleme boyası (10mM Tris-HCl, % 0,03 bromophenol blue, % 60 gliserol, 60 mM EDTA, Fermentas Co.,) oranında karıştırılarak toplam dokuz µl hacminde jeldeki tarak gözlerine aktarıldı. Ürün büyüklüğünün belirlenebilmesi için, PZR ürünleri ile

birlikte 1µl 100 bp'lik DNA merdiveni (Fermentas, Co.) yüklendi. Jele 120 V'da elektrik akımı uygulanarak 30 dak. süreyle DNA ürünlerinin göçü sağlandı. Elektroforez sonucunda oluşan bantlar resmedildi.

2.4. Restriksiyon Enzim Kesimi

Polimeraz Zincir Reaksiyonu pozitif ürünleri, Restriksiyon Enzimleri ile Kesimden Pürifikasyon Kiti (Wizard Sv Gel And Pcr Clean-Up System, Promega Corp. Madison Wi, Usa) kullanılarak pürifiye edildi. Bu amaçla; 40 µl PZR ürünü, 5 hacim Tampon Solüsyonu ile karıştırıldı. Bu karışım özel döndürme kolonları (Spin Column) içine konulup. 2 ml'lik toplama tüplerine (Collection Tube) yerleştirildi. Tüpler 14000 devirde 5 sn. santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpleri boşaltıldı ve kolonlar tekrar içlerine yerleştirildi. İçlerine 300 µl Yıkama Tampon Solüsyonu eklenerek tekrar 14000 devirde beş sn. santrifüj edildi ve toplama tüpleri santrifüj işleminden sonra boşaltıldı. Kolonlar çıkarılarak 1,5 ml. hacimdeki eppendorf tüplerinin içine yerleştirildikten sonra 25 µl. Elüsyon Tampon Solüsyonu kolonun ortasına gelecek şekilde eklendi. Tüpler beş dak. oda ısısında bekletildikten sonra 14000 devirde 30 sn. santrifüj edilen pürüfiye PZR ürünü kesim için hazır hale getirildi.

Çoğaltılan semi-nested PZR ürünü içerisinde genotiplerin ayırımına imkan sağlayacak uygun restriksiyonu enzimleri ve bu enzimlerin tanıma bölgeleri Tablo 4'de gösterilmiştir.

Tablo 4. *SmaI* ve *XhoI* enzimlerinin restriksiyon tanıma bölgesi ile genotip kesim büyüklükleri

	Restriksiyon Kesim Enzimi Ürünleri	
	<i>Sma I</i>	<i>Xho I</i>
	5'.....CCC ↓ GGG.....3'	5'.....C ↓ TCGA G.....3'
	3'.....GGG ↑ CCC.....5'	3'.....G AGCT ↑ C.....5'
Genotip I	219+222	382+59
Genotip II	441	81+301+59
Genotip III	306+135	83+58

Sma I (Vivantis Co.) ve *Xho I* (Promega Co.) restriksiyon enzimleri ile kesim deneyi enzimin temin edildiği firmanın tarif ettiği protokole göre gerçekleştirildi. Kısaca; kesim aşaması için öncelikle 10X NE buffer (1 mM NaCl,

500 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 10 mM dithiothreitol, pH 7.9)'dan 2,5 µl, 100X BSA'dan 2,5 µl, 15 µl pürifiye PZR ürünü, 20 µl enzim (10,000 U/ml) ve 10 µl dH₂O içeren toplam 50 µl.'lik karışım hazırlandı. Hazırlanan karışım 16 saat 50°C'de inkübasyona bırakıldı. Bu işlem sonrasında karışım 80 °C'de 20 dak. inkübasyona bırakılarak enzim aktivitesinin sonlanması sağlandı.

Kesim sonuçları kesim ürünlerin beş kısım ürün, bir kısım 6x yükleme boyası oranında karıştırılarak toplam 9 µl hacminde jel tarakları yardımı ile açılan gözlere aktarıldı. Ürün büyüklüğünün belirlenebilmesi için, kesim ürünleri ile birlikte 5 µl 100 bp lik DNA markeri (Fermentas Co.,) yüklendi. Jele 120 V elektrik akımı uygulanarak 30 dak. süreyle DNA ürünlerinin göçü sağlandı. Oluşan bantlar jel dokümantasyon sistemi yardımı ile görüntülendi.

Sekanslama: Mevcut tezde, agaroz jel sonuçlarına göre PZR pozitif olarak tespit edilen ve restriksiyon enzim kesimleri yapılan 11 klinik örneğe ait nested-PZR ürünlerinin her birinin F ve R primerleri kullanılarak çift yön sekanslanması, otomatik sekans cihazı (IONTEC, Ist.) kullanılarak gerçekleştirildi. Bu sekans sonuçlarının sekans dizi bileştirme programlarında bileştirilmeleri neticesinde elde edilen dizilimler önce BLAST programı ile (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) gen bankasında bulunan HDV genomları ile dizilim kıyaslanması (alignment) programına koşuldu. Daha sonraki adımda ise bu dizilimlerin gen bankasında mevcut HDV dizilimleri ile filogenetik ilişkisinin (filogenetik ağaç) tespiti Bitişik-bağlantı (Neighbor-joining) Metodu temelli hazır program (PHYLIP computer program) kullanılarak gerçekleştirildi. Filogenetik programda maksimum dizilim farklılığı 0.75'e göre hesaplandı.

2.5. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel değerlendirmeler, SPSS 12.0 bilgisayar paket programı kullanılarak yapıldı. Kategorik verilerin olası farklılığı Chi Square testi, ikili grupların karşılaştırılması Student-t testi veya Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Parametreler arasındaki korelasyonun saptanmasında Pearson's korelasyon analizinden yararlanıldı. Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak ifade edildi ve $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3. BULGULAR

Hastaların demografik bulguları

Çalışma grubu 113 kronik hepatit B hastasından oluşmuştur. Bu hastaların % 69'u (n=78) erkek olup %31'i (n=35) kadındı. Hastalarımızın yaşları 22-82 yıl arası olup yaş ortalaması 48.8 ± 11.8 yıl'dır.

Hastaların virolojik bulguları

Tüm hastalarımızın HBsAg'leri pozitif olup HBsAg titresi 1- 3803 IU/ml aralığında değişmekte olup median HBsAg titresi 315 IU/ml olarak bulundu. Hastaların % 11.1'inde HBeAg pozitif , % 88.9'unda ise negatif olarak izlendi.

İncelenen 113 kronik hepatit B hastasının tümü anti-HDV'si pozitif olan hastalardan seçilmişti. Anti- HDV testi pozitif bulunan 113 hastanın tamamına HBV DNA ve HDV RNA kantitatif olarak çalışıldı.

Hastalarımızın kantitatif HBV DNA düzeyleri 0 ile 3.1×10^7 kopya/ml aralığında olup, median HBV DNA düzeyi 226.99 kopya/ml olarak bulundu. HBV DNA düzeyleri kendi içinde değerlendirildiği zaman 17 hastanın (% 15) HBV DNA'sı 0 (negatif) iken, 29 hastada (% 25.7) 20 U/ml (116 kopya/ml) değerinin altındaydı. Geriye kalan hastalarımızın HBV DNA'sı 20 U/ml (116 kopya/ml)' nin üzerindeydi.

Çalışma grubundaki 113 hastada HDV RNA değeri 2.3×10^2 ile 7.8×10^6 kopya/ml aralığında değişmekte olup median HDV RNA düzeyi 9.6×10^3 kopya/ml olarak bulundu. 23 hastanın HDV RNA düzeyi 400 kopya/ml'den düşük (% 20.4), geriye kalan 90 hastanın HDV RNA düzeyi ise 400 kopya/ml'den yüksek olarak belirlendi.

Hastaların Klinik Bulguları

Hastaların biyokimyasal parametreleri (ALT, AST, TBIL, ALB, INR, GGT, PLT) incelendiğinde tablodaki sonuçlar elde edildi (Tablo 5).

Kadın ve erkek hastaların, virolojik parametreleri (HDV RNA, HBV DNA ve HBsAg titre) değerlendirdiğimizde Tablo 6'da gösterildi.

Kadın ve erkek hastalar karşılaştırıldığında HDV RNA, HBV DNA ve HBsAg titresi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmedi. p değerleri sırasıyla: 0.88, 0.71, 0.38 olarak bulundu.

Tablo 5. Hastaların biyokimyasal parametrelerinin değerlendirilmesi

	MIN	MAX	MEAN
ALT (IU/L)	11	672	96,601±104
AST (IU/L)	10	1205	87,9259±124
TBİL(mg/dL)	0.2	8,80	1,383±1,46
ALB (g/dL)	2	4,9	3,7687±0,65
INR	0.9	2,24	1,249±0,25
GGT (IU/L)	8	643	84,505±96,9
PLT(K/UL)	25	715	144,149±88,47

Tablo 6. Kadın ve erkek hastaların, virolojik parametrelerinin karşılaştırılması

	HBsAg titresi	HBV-DNA	HDV-RNA
KADIN	Median 286 IU/ml	133,4 kopya /ml	12200 kopya/ml
	*Range 1-3190IU /ml	0-30,7x10 ⁷ kopya/ml	300-2,3 10x10 ⁶ kopya/ml
ERKEK	Median 322 IU/ml	261 kopya/ml	8905 kopya/ml
	*Range 1-3803 IU/ml	0-6,3 X10 ⁶ kopya/ml	231-7,8x10 ⁶ kopya/ml

*Alt sınır üst duyarlılıkları

Daha sonraki adım olarak, HDV RNA düzeyi 400 kopya/ml'nin altında olan hastalar (Grup I) ile 400 kopya/ml üzerinde olan hastaları (Grup II) karşılaştırıldı. Grup I de 23 hasta (% 20.35), Grup II' de ise 90 hasta (% 79.65) bulunuyordu (Tablo 7).

Tablo 7. HDV RNA düzeyi 400 kopya/ml'nin altında olan hastalar ile 400 kopya/ml'nin üstünde olan hastaların karşılaştırılması

	HDV-RNA<400 KOPYA (mean)	HDV-RNA>400 KOPYA (mean)	P
ALT(IU/L)	102,95±164,60	95,06±85,86	0,05
YAŞ(yıl)	51,22±12,43	48,18±11,63	0,35
AST(IU/L)	62,04±67,74	94,17±134,46	0,016
TBİL(mg/dL)	1,40±1,95	1,37±1,33	0,045
ALB(g/dL)	3,80±0,89	3,76±0,59	0,4
INR	1,23±0,31	1,25±0,23	0,17
PLT(K/UL)	157,65±82,80	141,04±89,90	0,27
GGT(IU/L)	67±112,79	88,63±93,20	0,006

* P<0.05

Bu sonuçlara göre AST, ALT, GGT oranlarında istatistiksel olarak anlamlı fark izlendi. Grup II'deki hastaların ortalama ALT düzeylerinin Grup I'deki

hastalardan istatistiksel olarak anlamlılık oluşturacak şekilde daha yüksek olduğu bulundu (p=0.05). Grup I'deki hastaların AST değerleri Grup II'deki hastaların ortalama AST düzeylerinden istatistiksel olarak daha yüksek olduğu belirlendi (p=0.016). Grup II'deki hastaların GGT düzeylerinin Grup I'deki hastalardan istatistiksel olarak anlamlılık oluşturacak şekilde daha yüksek olduğu tespit edildi (p=0.006).

Aynı şekilde Grup I ve Grup II' deki hastalar HBV DNA ve HBsAg titreleri aşağıdaki tablo 8'de gösterildiği şekilde değerlendirildi.

Tablo 8. HDV RNA düzeyi 400 kopya/ml' nin altında olan hastalar ile 400 kopya/ml'nin üzerinde olan hastaların karşılaştırılması

		HBsAg(IU/ml)	HBVDNA(kopya/ml)
HDV-RNA<400 Kopya/ml	median	312	1125
	*range	1-3803	0- 3.7x10 ⁵
HDV-RNA>400 Kopya/ml	median	318	133
	*range	1-3109	0- 5.8x10 ⁵
**P		0.73	0.015

*Alt sınır üst duyarlılıkları **P<0.05

Grup II'deki hastaların HBV DNA düzeylerinin Grup I'deki hastalardan istatistiksel olarak anlamlılık oluşturacak şekilde daha düşük olduğu bulundu (p=0.015). Grup II'deki hastaların HBsAg titrelerinin Grup I'deki hastaların HBsAg titrelerinden minimal düzeyde yüksek olduğu belirlendi (p=0.73).

HBeAg pozitif (% 11.1) ve negatif hastalar (% 88.9) Tablo 9'de HDV RNA, HBV DNA ve HBsAg titre oranları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi. HDV RNA, HBV DNA ve HBsAg titrelerinin p değerleri sırasıyla 0.71, 0.94, 0.88'dir.

Tablo 9. HBeAg pozitif ve negatif hastaların HDV RNA, HBV DNA ve HBsAg titre oranları açısından karşılaştırılması

		HBsAg	HBV-DNA	HDV-RNA
HBe (+)	Median	293 IU/ml	208,8 kopya/ml	6090 kopya/ml
	*Range	7-2151IU/ml	15-13,3x10 ⁵ kopya/ml	300-7,8x10 ⁶ kopya/ml
HBe (-)	Median	318 IU/ml	261 kopya/ml	5105 kopya/ml
	*Range	2-3803 IU/ml	0-30,7x 10 ⁷	300-4,5x10 ⁶ kopya/ml

*Alt sınır üst duyarlılıkları

HBeAg pozitif (% 11.1) ve negatif hastalar (% 88.9) Tablo 10'da ise demografik ve biyokimyasal olarak karşılaştırıldı (Yaş, ALT, AST, ALB, GGT, PLT). Sonuçlara göre, istatistiksel olarak tek anlamlı olan, platelet değerleriydi. p değerleri sırasıyla 0.86, 0.43, 0.7, 0.481, 0.11, 0.02 idi. PLT düzeyi HBeAg pozitif hastalarda anlamlı ölçüde düşük olduğu belirlendi.

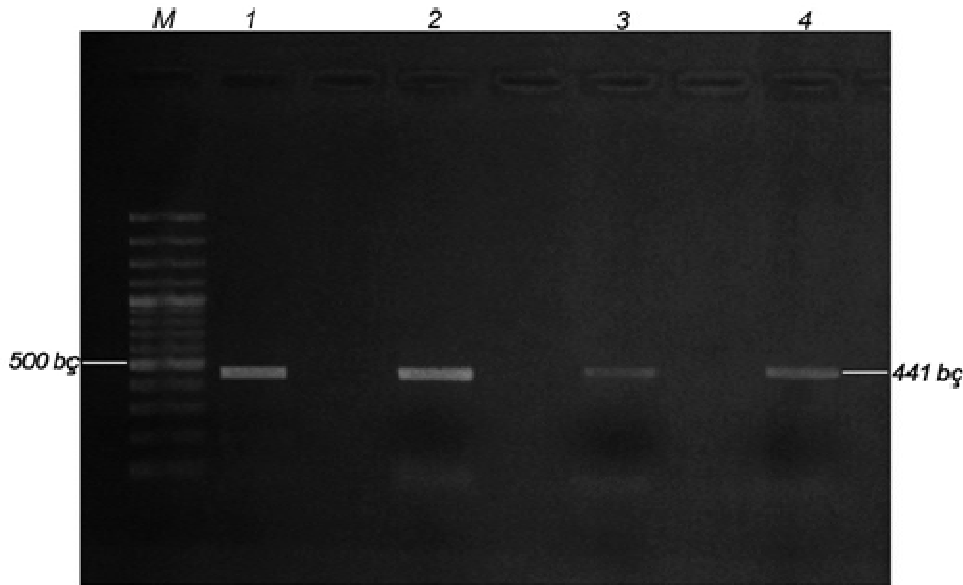
Tablo 10. HBeAg pozitif ve negatif hastaların demografik ve biyokimyasal olarak karşılaştırılması

	HBeAg (-) (mean)	HBeAg (+) (mean)	P
YAŞ(yıl)	49,65±12,11	44,89±8,20	0,86
ALT(IU/L)	93,57±102,14	85,77±45,17	0,436
AST(IU/L)	94,5±150,87	70,33±36,62	0,705
ALB(g/dL)	3,72±0,71	3,68±0,29	0,481
GGT(IU/L)	71,53±70,17	252,8±283,47	0,11
PLT(K/UL)	149,52±99,21	82,66±36,81	0,02

P<0.05

PZR Sonuçları

Semi-nested PZR ürünlerinin % 2'lik agaroz jelde elektroforezi sonucunda çalışılan toplam 113 klinik örneğin tamamında yaklaşık 441 baz çifti uzunluğunda PZR ürünü tespit edilmiştir (Şekil 8).



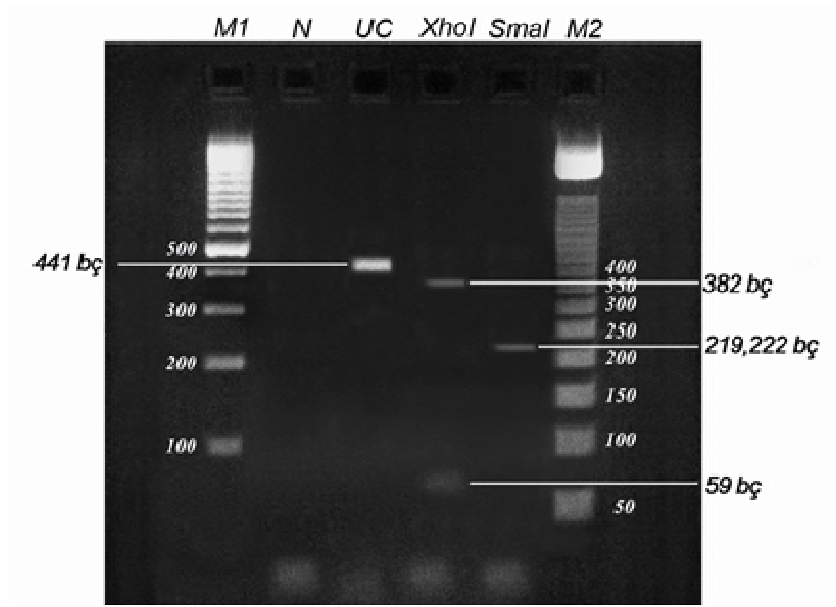
Şekil 8. PZR ürünlerinin etidyum bromidle boyanmış jel görüntüsü.

M: 100 bç'lik DNA markeri, 1-2-3-4 Klinik örneklerden elde edilen PZR ürünleri (441 bç)

Restriksiyon Enzim Kesim Sonuçları

Sma I (Vivantis Co.) restriksiyon enzimi ile semi-nested PZR pozitif pürifiye ürünlerin kesimi neticesinde yaklaşık 219 ve 222 bç büyüklükte iki DNA bantının oluştuğu belirlenmiştir. Bu iki büyüklük bir birine çok yakın olduğu için resimlemede tek bant görüntüsü elde edilmiştir (Şekil 9).

Semi-nested PZR pozitif pürifiye ürünlerin *Xho I* (Promega Co.) enzimi ile kesimi neticesinde yaklaşık 382 ve 59 bç büyüklükte iki DNA bantının oluştuğu belirlenmiştir (Şekil 9).



Şekil 9. PZR ürünlerinin *Xho I* ve *Sma I* enzimleri ile kesilip etidyum bromidle boyanmış jel görüntüsü

M1: 100 bç'lik DNA markeri, N: PZR negatif kontrol, UC: Kesilmemiş PZR ürünü, *Xho I*: *Xho I* ile kesilmiş PZR ürünü (Genotip I), *Sma I*: *Sma I* ile kesilmiş PZR ürünü (Genotip I), M2: 50 bç'lik DNA markeri.

Restriksiyon enzim sonuçlarına göre tüm semi-nested PZR ürünlerinin HDV Genotip I olduğu tespit edilmiştir.

Sekanslama Sonuçları

Restriksiyon enzim kesim sonucuna göre genotip I olarak belirlenen ve tesadüfi olarak seçilen 11 semi-nested PZR ürününe ait dizi analizleri ile bu diziler üzerinde bulunan primer ve enzim tanıma bölgeleri Şekil 10'da sunulmuştur. Elde edilen dizilerin enzim tanıma bölgeleri incelendiği zaman 11 klinik örneğin 10

tanesinde *Sma I* tanıma bölgesinin bir tane olduğu ve bunun da kesimi neticesinde beklenildiği gibi yaklaşık eşit büyüklükteki iki farklı fragment olduğu tespit edilmiştir. Ancak, beş nolu klinik örneğe ait dizilimde iki adet enzim tanıma bölgesinin varlığı belirlenmiş olmasına rağmen bunun tanıma bölgelerinin bir birine yakın olması nedeniyle kesim motifinde bir değişiklik yapmadığı görülmüştür. Diziler üzerinde *Xho I* tanıma bölgelerinin araştırılması neticesinde, tüm dizilimlerde bu enzime ait tek tanıma bölgesinin varlığı tespit edilmiş ve bu tanıma bölgesinde kesim sonucunda, beklenildiği gibi, 380 ve 60 baz çiftlik iki farklı büyüklükte fragmentin olduğu belirlenmiştir.

PZR pozitif olarak belirlenen 11 PZR ürününe ait dizi analizlerinin kendi aralarındaki dizi kıyaslanmaları neticesinde (Alignment) % 95-98 oranında benzedikleri görülmüştür. Bu klinik örneklere ait dizilimlerin gen bankasında mevcut HDV genomları ile BLAST programında dizi kıyaslanması neticesinde ise, gen bankasında mevcut dizilimler ile % 85-95 arasında benzerlikleri tespit edilmiştir. Şekil 11`de gen bankasında kıyaslanması yapılan ve en çok benzerlikleri tespit edilen üç farklı HDV genomu ile BLAST-alignment sonuçları verilmiştir.

Dizilimi belirlenen klinik örneklere ait bu dizilimlerin yine gen bankasında mevcut dizilimler ile filojenetik ağacının belirlenmesi neticesinde, tüm klinik örneklerin HDV genotip I grubunda yer aldıkları tespit edilmiştir (Şekil 12).

SMA 1: 5'.....CCC ↓ GGG.....3'
3'.....GGG ↑ CCC.....5'

XHO 1: 5'.....C ↓ TCGA G.....3'
3'.....G AGCT ↑ C.....5'

Primer F: 5'-ATGCCATGCCGACCCGAAGAGGAA-3'

Primer R (Antisense reverse dizilimi): TGTCGGTGAATCCTCCCCTGAG

1) ATGCCATGCCGACCCGAAGAGGAAAGAAGGACGCGAGACACGAACCCGTGGAGTGATTTCCGCTTTATTC
ACTGGGGTCGACAACCTCTGGGGAGAAAAGGGTGGATCGGCTGGGAAGAGTATATCCYATGGGAATCCCTGGTTTCCC
CTCACATCCRGCCCTCCCGGTCTGGTGAAGGGGACTCCGGGACACCCTGCAAACCGGGGACGAAGCCGCCCCC
GGGCGCTCCCCTCGATCCACCTTCGAGGGGGTTCACACCCCAACCGGCGGGCCGGCTACTCTTTTCTTTCTCTCG
TCTTCCCTGGTCAACCTCYTAAGTTCCTTCTTCTCCCGCTGAGATTCTTCCCTCCGGCGCTCAGTTGCTTTCTTGT
TCTCGAGGGCCTTCTTCGTCGGTGATCCTGCCTCTCCCTGTCGGTGAATCCTCCCCTGAG

2) ATGCCATGCCGACCCGAAGAGGAAAGAAGGACGCGAGGACACGAACCCGTGAGTGGAACCCGCTTTATT
CACTGGGGTCGACAACCTCTGGGGAGAAAAGGGAGGATCGGCTGGGAAGAGTATATCCYATGGGAATCCCGGTCTC
CCCTCGTGCCAGCCCTCCCGGTCCGAGCGAAGGGGACTCCGGGACCCCTTGCATGYTGGGGACGAAGCCGCC
CCGGGCGCTCCCCTCGGTCCACCTTCGAGGGGGTTCACACCTCCAGGCGGGCCGGCTACTCTTTCCCTTCTCT
CGTCTTCTCGGTCAACCTCCGAGTTCTTCTTCTTCTTCTGCTGAGTTCTTCCCTCCCGGCCAGCTGCTTCTTCT
TGTTCTCGAGGGCCTTCTTCGTCGGTGATCCTGCCTCTCCCTGTCGGTGAATCCTCCCCTGAG

3) ATGCCGACCCGAAGAGGAAAGAAAGGACGCGGACGCGAACTCGTGAGTGGAACCCGCTTTATTCACTGGG
GTCGACAACCTCTGGGGAGAAAAGGGAGGATCGGATGGGAAGAGTATATCCYATGGGAATCCCTGGTTTCTCTCACG
TCCAGCCCTCCCGGTCCGAGTGAAGGGGACTCCGGGACTCCTTGCATGCTGGGGACGAAGCCGCCCCCGGGCGC
TCCCCTCCGTTCCCTTCGAGGGGGTTCACACCTCCAGTCGGCGGGCCGGCTGTTCTTTCCCTTCTCTCGTCTTCT
CGGTCAACCTCCTGAGTTCCTTCTTCTTCTTCTTCTGCTGAGGCTTCTTCCCTCCCGGCCAGCTGCTTCTTGT
GGCCTTCTTCGTCGGTGATCCTGCCTCTCCCTGTCGGTGAATCCTCCCCTGAG

4) ATGCCATGCCGACCCGAAGAGGAAAGAAGGACGCGAGACACGAACCCGTGAGTGYATTCCGCTTTATTCA
CTGGGGTCGACAACCTCTGGGGAGAAAAGGGTGGATCGGCTGGGAAGAGTATATCCYATGGGAATCCGCCGGWTCCC

CTGATGTCCAGCCCCTCCCCAGTCTGGTGAAGGGGGACTCCGGAACACCTTGCATGCTGGGGACGACGCC**CCCGGG**
CGTCCCCTCGATCCACCTTCGAGGGGGTTCACACCCCCAACCGGCGGGCCGGCTATTCTTCTTCCCTTCTCTCGTCTT
CTTCGGTCAACCTCTAAGTCCCCTTCTTCYCTTGCTGAGACTTCCCTCCGGCGCTCAGCTGCTTCTCTTGT**CTC**
GAGGGCCCTTCTTCGTTCGGTGATCCTGCCTCTCTTGTTCGGTGAATCCTCCCCCTGAG

5) **ATGCCAGCGACCGAAGAGGAAGAA**GGACGCGGACGCGAACTCGTGAGTGAAACCCGCTTTATCACT
GGGGTCGACAACCTCTGGGGAGAAAAGGGAGGATCGGATGGGAAGAGTATATCCYATGGGAATCCCTGGTTTCTT
CTCACGTCCAGCCCCTCCCCGGTCSGAGTGAAGGGGGACTCCGGGACTCCTTGCATGCTGGGGACGAAGCCGCC**C**
CCGGGCGTCCCCGC**CCCGGG**CGTCCCCTCCGTTGCCTTCGAGGGGGTTCACACCTCCAGTCGGCGGGCCGG
CTGTTCTTCTTCCCTTCTCTCGTCTTCTCGGTCAACCTCCTGAGTTCCTTCTTCTTCCCTGCTGAGGCTTCCCT
CCCCGGCCAGCTGCTTCTTGT**CTCGAG**GGCCTTCTTCGTTCGGTGATCCTGCCTCTCC**TGTTCGGTGAATCCT**
CCCCTGAG

6) **ATGCCATGCCGACCGAAGAGGAA**AGAAGAACGCGAGACGCGAATCCGTGAGTGAAACCCGCTTTA
TCACTGGGGTCGACAGCTCTGGGGAGAAAAGGGAGGATCGGATGGGAAAAGTATATCCYATGGGAATCCCCTG
GTCCCGTCGTGTCCAGCCCCTCCCCGGTCCGATGGAAGGGGGACTCCGGGACTCCTTGCATGCTGGGGACGAAGC
CGCC**CCCGGG**CGTCCCCTCGATCCRCCTTCGAGGAGTTACACCTCCAGGCGGGCCGGCTACTCTTCTTTT
CCTTMTCTCGTCTTCTCGGTCAACCTCCGAGTTCCTTCTTCCCTGCTGAGAYTCTCCCTCCTCCGGCCAG
CTGCTTCTTGT**CTCGAG**GGCCTTCTTCGTTCGGTGATCCTGCCTCTCT**TGTTCGGTGAATCCTCCCCCTGAG**

7) **ATGCCGACCGAAGAGGAAAGAA**GGACGCGAGACACGAACCCGTGAGTGAAAACCCGCTTTATCACT
GGGGTCGACAACCTCTGGGGAGAAAAGGGAGGATCGGATGGGAAGAGTATATCCYATGGGAATCCCCGGTCGCC
CTCRYGTCCAGCCCCTCCCCGGTCCGAGCGAAGGGGGACTCCGGGACACCTTGCATGYTGGGGACGAAGCCGCC**C**
CCGGGCGTCCCCTCGRTCCACCTTCGAGGGGGTTCACACCTCCAGTCGGCGGGCCGGCTGTTCTTCTTCCCTTCT
CTCGTCTTCTCGGTCAACCTCAGGAGTTCCTTCTTCCCTGCTGAGCGTCTCCCTCCCCGGCCAGCTGCTT
CTTCTTGT**CTCGAG**GGCCTTCTTCGTTCGGTGATCCTGCCTCTCT**TGTTCGGTGAATCCTCCCCCTGAG**

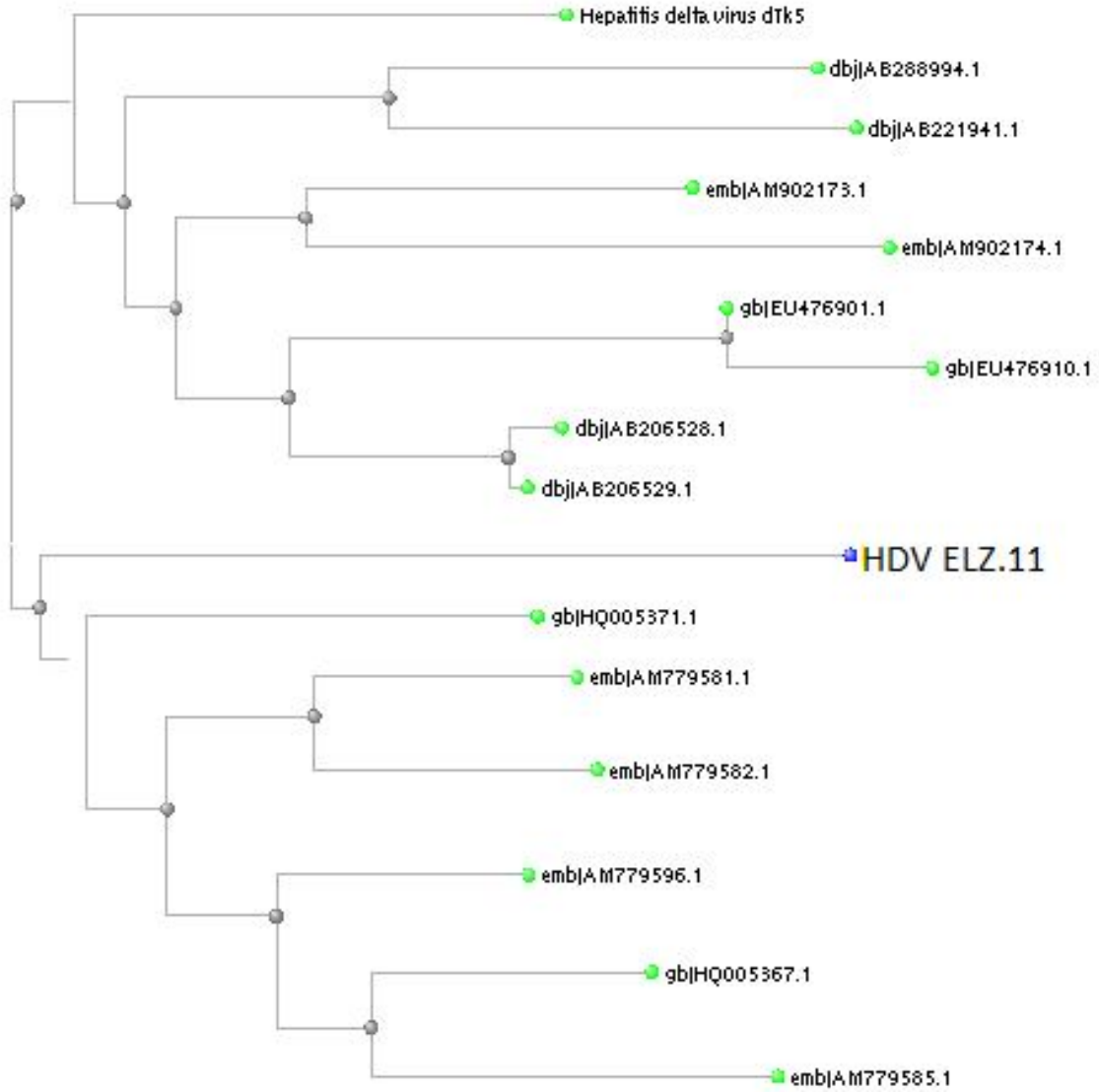
8) **ATGCCATGCCGACCGAAGAGGAA**AGAAGGACGCGGACGCGAATCGTGAGTGAAACCCGTTTTATT
CACTGGGGTCGACAACCTCTGGGGAGAAAAGGGAGGATCGGATGGGAAGAGTATATCCYATGGGAATCCCTGGCC
TCCTCTCACGTCCAGCCCCTCCCRGTCCGAGYGAAGGGGGACTCCGGGAYCCTTGCATGCTGGGGACGAAGCC
GCC**CCCGGG**CGTCCCCTCCGTTGCCTTCGAGGGGGTTCACACCTCCAGTCGGCGGGCCGGCTACTCTTCTTCC
CCTTCTCTCGTCTTCTCGGTCAACCTCTGATTTCTTCTTCTTCCCTGCTGAGGCTCTCCCTCCCCGGCCAGY
TGCTTCTTCTTGT**CTCGAG**GGCCTTCTTCGTTCGGTGATCCTGCCTCTCC**TGTTCGGTGAACCTCCCCCTGAG**

9) **ATGCCATGCCGACCCGAAGAGGAA**AGAAGGACGCGGACGCGAACCCGTGAGTGAAACCCGCTTTAT
TCACTGGGGTCGACAACTCTGGGGAGAAAAGGGAGGATCGGACGGGAAGAGTATATCCYATGGGAATCCCCGGT
TTCCACCACGTCCAGCCCTCCCCGGTCCGAGTGAAGGGGGACTCCGGGACTCCTTGCATGCTGGGGACGAAGC
CGCC**CCCCGG**CGCTCCCCTCCTATCGCCTTCGAGGGGGTTCACACCTCCAGTCGGCGGGCCGGCTACTCTTCTTCC
CTTCTCTCGTCTTCTCGGTCAACTTCTGAGTTCCTCTTCTTCTCCTTGCTCAGGCGCTTCCCTCCCCGGCYAGTT
GCTTTTCTTGTT**CTCGAG**GGCCTTCTTCGTGCGGTGATCCTGCCTCTCT**TGTCGGTGAATCCTCCCCTGAG**

10) **ATGCCATGCCGACCCGAAGAGGAA**AGAAGGACGCGAGACACGAACCCGTGAGTGAAACCCGCTTT
ATCACTGGGGTCGACARCTCTGAGGAGAAAAGGGAGGATCGGATGGGAAGAGTATATCCYATGGGAATCCCTG
GYTCCCCTYRCGTCCAGCCCCYCCCCGGTCCGGGTGAAGGGGGACTCCGGGACCCCTTGCATGCTRGGGACGAA
GCCGCC**CCCCGG**CGCTCCCCTCGATCCRCCTTCGAGGGGGTTCACAYCTCCAGKCGGCGGGCCGGCTACTCTTCTT
TCCCTTCTCTCGTCTTCTYGGTCAACCTCYGGAGTCCYCTTCTTCTCCTGCTGAGGCTTCCCTCCTCCGGCCA
GCTGCTTCTTCTTGTT**CTCGAG**GGCCTTCTTCGTGCGGTGATCCTGCCTCTCT**TGTCGGTGAATCCTCCCCTGAG**

11) **ATGCCATGCCGACCCGAAGAGGAA**AGAAGGACGCGAGACACGAACCCGTGAGTGAAACCCGCTTT
ATCACTGGGGTCGACARCTCTGAGGAGAAAAGGGAGGATCGGATGGGAAGAGTATATCCYATGGGAATCCCTG
GYTCCCCTYRCGTCCAGCCCCYCCCCGGTCCGGGTGAAGGGGGACTCCGGGACCCCTTGCATGCTRGGGACGAA
GCCGCC**CCCCGG**CGCTCCCCTCGATCCRCCTTCGAGGGGGTTCACAYCTCCAGKCGGCGGGCCGGCTACTCTTCTT
TCCCTTCTCTCGTCTTCTYGGTCAACCTCYGGAGTCCYCTTCTTCTCCTGCTGAGGCTTCCCTCCTCCGGCCA
GCTGCTTCTTCTTGTT**CTCGAG**GGCCTTCTTCGTGCGGTGATCCTGCCTCTCT**TGTCGGTGAATCCTCCCCTGAG**

Şekil 10. PZR pozitif 11 farklı klinik örneğe ait DNA dizileri ile bu dizilimler üzerinde bulunan primer ve enzim tanıma bölgeleri



Şekil 12. Onbir nolu örneğe ait gen diziliminin filogenetik ağaç sonucu (Gen bankasındaki virüslerin dizilimleri Sequens ID olarak verilmiştir. Tüm bu virüsler HDV'nin genotip 1 alt grubunda yer almaktadır).

4. TARTIŞMA

Son yıllarda HDV enfeksiyonlarında azalma saptanmasına rağmen dünya çapında 350 milyondan fazla insan kronik HBV ile enfektedir. Bu enfeksiyon Türkiye’de de, özellikle Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgesinde yüksek bir prevalansa sahiptir. Dünya çapındaki HBsAg taşıyıcılarının % 5’inin HDV ile koenfekte olduğu tahmin edilmektedir. Bu sonuca göre 15-20 milyon HDV taşıyıcısı bulunmaktadır ve tüm dünyada önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir (5, 130).

Bu çalışma, insan sağlığını bu kadar etkileyen bir enfeksiyon etkeni ile mücadelede yardımcı olabilmek için bölgemizdeki HDV enfeksiyonunun prevalansını ve karakteristik özelliklerini tanımlamak amacıyla planlanmıştır.

HDV ile HBV epidemiolojisi birçok yönden benzerlik gösterse de her iki enfeksiyon arasında bazı önemli farklar da vardır. HBV’nin endemik olduğu belirli bölgelerde HDV sıklığı HBV kadar yüksek olmayabilmektedir. Yapılan birçok çalışmaya göre, HDV’nin global prevalansı çok değişkendir ve aynı bölgede bile değişik zaman periyotlarında değişik prevalanslara rastlamak mümkün görünmektedir. Bu da HBV ve HDV enfeksiyonu birlikteliğini ve uyumunun moleküler ve virolojik açıdan sorgulanmasını zorunlu kılmaktadır (5, 123).

Bölgemizde HBV sıklığı oldukça yüksektir ve buna bağlı olarak HDV enfeksiyonunun prevalansını ve epidemiyolojik özelliklerini araştırmak oldukça önemlidir.

Hepatit D enfeksiyonu tüm dünyada görülür, ancak dağılım paterni aynı değildir. Genomik değişkenliğe dayanarak, nükleotid dizisinde %40 oranında değişkenlik gösteren, farklı türler, belirli bölgelerde temsil edilen ve farklı hastalık sonucu ile ilişkili olan başlıca 8 HDV genotipi belirlenmiştir. HDV enfeksiyonu oranları HBV’nin endemik olduğu bölgelerde daha yüksektir ancak istisnalar bulunur. Vietnam ve Endonezya’da HDV koenfeksiyonu nadir görülür (122, 173).

Hepatit D virüsü tüm yaş gruplarını ilgilendirir ve enfeksiyonun başlıca iki spesifik paterni oluşabilir. Örneğin, HDV ile HBV ko-enfeksiyonu ve kronik bir HBV taşıyıcısının HBV ya da HDV süperenfeksiyonu (111, 112).

Endeminin düşük olduğu bölgelerde HDV koenfeksiyon şeklinde ortaya çıkar, parenteral yolla bulaşır. Akut hepatit, hafif akut hepatitden fulminan hepatite değişen klinik tiplere sahiptir. Bu değişkenliğin sebebi kişinin immün cevabının veya HBV'nin T- helper fonksiyonunun değişimidir. Çoğu vakada akut delta hepatiti tipik kendini sınırlayan hepatit şeklindedir. Klinik ve histolojik olarak Hepatit B'den veya diğer akut viral hepatit tiplerinden ayırt edilemez. Avrupa ve Amerika'da yapılan iki ayrı çalışmada fulminan B hepatiti ile non fulminan B hepatiti arasında delta koenfeksiyonu oranı araştırılmış ve Avrupa'da yapılan çalışmada sırasıyla %34 ve %4.2, Amerikada'ki çalışmada ise sırasıyla %39 ve %19 bulunmuştur. İlaç bağımlıları arasında yapılan diğer bir çalışmada akut delta hepatitli hastalarla HBV monoenfeksiyonlu hastalar karşılaştırılmış ve 86 koenfekte hastanın 15 tanesinde (%17,4), 50 monoenfekte hastanın 2 tanesinde fulminan hepatit gelişmiştir (174). Kronik HDV enfeksiyonu, HBV mono enfeksiyonundan daha şiddetli KC hastalığına yol açar. Hızlı ilerleyen fibrozis, erken hepatik dekompanzasyon ve HCC riskinde artışa neden olmaktadır (130,174). Koenfekte hastaların HBV genotipleri KC'deki enflamasyonun yanında HDV' nin viral yükünü de etkiler (187).

Delta virüs enfeksiyonu, endemilerinin yüksek olduğu bölgelerde HDV süperenfeksiyonu şeklinde görülür. Bu bölgelerde, HDV çocukluk ve adolesan çağlarda alınır ve bulaşta yakın temas ön plandadır. Yüksek endemik bölgelerdeki süperenfeksiyon durumunda hastalık daha ağır seyreder, karaciğer hasarı, siroz ve ölüm daha fazla görülür (134). Bozdayı ve ark (174). 'nın yaptığı bir çalışmada 75 kronik delta hepatitli hastada 2-6 yıllık takip süresi sonrasında ilk biyopsi sonuçlarına göre 29 hastada kronik hepatit, siroz, KC yetmezliği gelişmiştir. Akut hepatit epizodu sonrası histolojik sirozun prevalansı yıllarla lineer bir artışa sebep olmuştur. 10 yıl sonra %23 (10/43), 20 yıl sonra %41 (9/22), 30 yıl sonra %77 (9/13) histolojik siroz vakası yakalanmıştır (174). Hastalığın seyrinin ağır olmasından ve HDV prevalansının yüksek saptanmasından dolayı bölgemizde delta virüs enfeksiyonunun süperenfeksiyon şeklinde seyrettiği düşünülmektedir.

Kronik HDV enfeksiyonunun da HBsAg düzeyinin HDV replikasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. HDV viremisi yüksek olarak değişkendir fakat biyokimyasal aktivite ve histolojik evrelendirme ile ilişkili değildir. Bu bilgi HDV' nin non-sitopatik bir virüs olduğunu destekler. GGT sirozla ilişkili tek bağımsız

marker olduğuna göre KC biyopsisi (kronik delta hepatitli hastalarda) fibrozun ölçümünde majör araç olarak kalmaya devam edecektir (159). GGT inflamasyon ve fibrozisin daha ağır seyredeceğinin bir göstergesidir. Bu çalışmada da, HDV RNA düzeyi 400 kopya/ml'nin altında olan hastalar ile HDV RNA düzeyi 400 kopya/ml'nin üzerinde olan hastalar biyokimyasal parametreler açısından karşılaştırıldığında HDV RNA düzeyi yüksek olan hastaların GGT düzeylerinin, HDV RNA düzeyi düşük olan hastaların GGT düzeylerinden istatistiksel anlam oluşturacak düzeyde yüksek olduğu bulunmuştur (p=0.006). Sonuç olarak HDV RNA düzeyi arttıkça GGT düzeyi de anlamlı ölçüde artmaktadır.

Delta virüs RNA'sının klonlanması, serum ve karaciğerde HDV RNA'nın ölçümü için gerekli olan problemlerin oluşturulmasını kolaylaştırmıştır. HDV RNA'nın saptanma sensitivitesi, RT-PZR tekniği ile birlikte anlamlı ölçüde artmıştır. Daha önce viral yükün tespitine yönelik ticari bir test standardize edilmediği için, farklı merkezlerde yerli analizler geliştirilmiştir. Yakın zamanda, gerçek zamanlı PZR ile serumda HDV'nin kantifikasyonunun kronik olarak enfekte olmuş hastaların yönetiminde uygulanması önerilmiştir (111, 112). Bu çalışmada da HDV RNA düzeyleri kantitatif olarak ölçülmüştür.

HBsAg-pozitif hastalarda anti-delta seroprevalansına yönelik çalışmalar ile incelenen bu virüsün HDV'nin yaşam döngüsü için HBV'ye ihtiyaç duyduğu gerçeğini ortaya çıkarmıştır. HDV'nin dünyadaki dağılım paterni farklıdır. Örneğin, HBV taşıyıcılarının %90'ı Pasifik adalarında her iki virüsle de enfekte olurken, bu oranlar İtalya'da %8'e Japonya'da ise %5'e düşmektedir. Dünya genelinde HDV hastalığına ilişkin yürütülen klinik çalışmalar, patogeneizde geniş bir varyasyon söz konusu olduğuna ve bu farklılıkların sebeplerinin henüz tam olarak bilinmediğine işaret etmektedir (176).

Türkdoğan ve ark. (177)'nin yaptığı epidemiyolojik bir çalışmada, Türkiye'de, HDV enfeksiyon prevalansının kronik KC hastalarında (%32.7), asemptomatik HBsAg taşıyıcılarına (%5.2) oranla dikkat çekici şekilde yüksek olduğu gösterilmiştir. En yüksek prevalans (%45.6) ise hepatit virüsünü alma riski yüksek olan kişilerde (sağlık personeli, hemodiyaliz hastaları, politransfüzyon alan hastalar) kronik KC hastalığı ile beraber görülmüştür. Şiddetli veya fulminant hepatit sıklığı,

HBV ile enfekte hastalar (%7.8) ve HBV/HDV ko-enfeksiyonu olan (%10) hastalarda benzerdir.

Ülkemizde anti-HDV sero-pozitifliği %2.9 -%33 arasındadır; kronik HBsAg taşıyıcılarında bu oran %0-11.2 arasındayken, kronik hepatitli hastalarda %6.8-53.4 arasındadır (6). HDV enfeksiyonu Batı ülkeleri ve Türkiye'nin batı bölgelerinde azalmasına rağmen, Doğu ve Güney Doğu Anadolu Bölgelerinde ise kronik KC hastalıklarının ikinci sıradaki büyük nedeni olarak önemini korumaktadır. Bunun başlıca sebebi ise bu bölgelerde yaşayan kişilerin kötü hijyen koşullarına maruz kalması, sosyoekonomik düzeyin ve eğitim seviyesinin düşük olmasındandır (177).

Dülger ve ark. (178)'nin 2010 yılında yapmış oldukları bir çalışmada Van yöresinde Kronik Hepatit B'li hastalarda HDV prevalansı %16 gibi yüksek bir oranda bulunmuştur. Ayrıca aynı çalışmada kırsal alanlarda yaşayan genç erkeklerde enfeksiyon oranının daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir.

Bu çalışmada elde ettiğimiz sonuçlara göre de, Elazığ bölgesinde kronik HBV'li hastalar arasındaki HDV endemisinin oldukça yüksek olduğu ve bu hastaların büyük çoğunluğunun genç erkeklerden oluştuğu bulunmuştur. Hastaların % 69'u erkek (78/113) ve yaş ortalaması 48.8 ± 11.8 yıl'dır.

Delta virüs enfeksiyonunun dünyadaki epidemiolojik özellikleri genel çizgileri ile HBV'ye benzemektedir. Bulaşım esas olarak parenteraldir. Yani bulaşta ana yol olarak kan ve kan ürünleri yer almaktadır. Bununla birlikte vertikal ve horizontal geçiş de söz konusudur. Aile içi bulaşım HBV'ye benzer şekilde görülebilmektedir. Özellikle i.v. ilaç kullanıcılarında enfeksiyonun prevalansı çok yüksek bulunmuştur. Hong-Kong'da yapılan bir çalışmada HDV taşıyıcılarının neredeyse tamamı, HBsAg pozitif i.v. ilaç kullanıcısı olduğu, buna karşın ilaç kullanıcısı olmayanların ise çok düşük oranda olduğu belirtilmiştir (122).

Başlıca HBV'ye karşı aşı kampanyaları, hamile kadınlara ve kan ürünlerine sistematik tarama yapılması, sağlık çalışanları arasında kanla taşınan enfeksiyonlara karşı güvenlik prosedürlerinin uygulanması, tek kullanımlık enjektörler, gelişmiş sosyoekonomik şartlar, cinsel yolla bulaşan hastalıklara karşı farkındalığın artması ve kazanılmış immün yetmezlik sendromu olan hastaların takibi gibi nedenlerle İtalya, İspanya, Taiwan ve Türkiye gibi dünyanın bazı bölgelerinde HDV enfeksiyonunun prevalansı önemli ölçüde düşüş göstermektedir (112).

Ülkemizde de alınan çeşitli önlemler sayesinde bulaşıcı karaciğer hastalıklarında düşüş olması beklenebilir ancak bazı bölgelerde, bu çalışmada da görüldüğü gibi halen yüksek HDV sıklığı bulunabilir. Bunun nedeni bölgemizdeki kötü hijyen kuralları ve aile içi geçişin yüksek olmasından kaynaklanabilir.

İtalya'da yapılan çalışmalarda HBsAg taşıyıcılarının 1983'de % 24.6, 1992'de % 14, 1997'de % 8.3 olduğu ve HDV prevalansının azaldığı gösterilmiştir. Kao ve ark. (180)'nin Tayvan'da yapmış olduğu bir çalışmada intravenöz ilaç kullanıcıları arasında HCV ve HDV enfeksiyonunun prevalansının azaldığını göstermişlerdir.

Bununla birlikte, HDV prevalansının düşmekte olduğu iddialarına yönelik bazı karşıt görüşler öne sürülmektedir. Gelişmekte olan ülkeler, gelişmiş ülkeler ile aynı HBV kontrol önlemlerine sahip değildir ve sosyoekonomik koşullarda aynı gelişmeleri göstermemektedirler. Bu bölgelerde gözlenen prevalansa yönelik veriler azdır ancak kesitsel çalışmalar HBsAg taşıyıcılarında HDV ko-enfeksiyon oranlarının halen % 10'un üzerinde olduğu gösterilmiştir. Almanya'da, HBV'li bireylerde anti-HDV antikör prevalansı 1992 yılında % 18.6'dan, 1997'de % 6.8'e düşmüş, 1999'dan itibaren ise bu oranlar tekrar % 8-%14 arasında yükseliş göstermiştir. HDV Fransa'da yaygın olmaya devam etmektedir (122). Endüstrileşmiş ülkelerdeki bu nüksün ana sebebi Doğu Avrupa, Afrika, Orta Doğu, Türkiye ve eski Sovyetler Birliği'nden gelen göçün artmasıdır. Endemik bölgelerden göç tek sebep değildir. İntravenöz ilaç kullanımı, cinsel uygulamalar ve beden modifikasyonu gibi nedenlerinde etkisi söz konusu olabilir (112). HDV süperenfeksiyonunun küme salgınları rapor edilmeye devam edilmektedir ve salgınlar hala meydana gelirken ve endemik ülkelerden göç popülasyonu artarken, HDV enfeksiyonu tehdit olmaya devam edecektir (122).

Son yirmi yıl içerisinde Türkiye'nin batı ve orta kesimlerinde HDV seroprevalansının % 7'den % 0.9'a düştüğü tahmin edilmektedir. Bununla beraber Türkiye'nin güneydoğu ve doğusunda oranlar hala yüksek seyretmeye devam etmektedir. Diyarbakır'da karaciğer sirozundaki HDV enfeksiyonu prevalans oranı Yalçın ve ark. (107)'nin yaptığı bir çalışmada % 47 olarak bildirilmiştir.

Bu çalışmada, kronik HBV enfeksiyonu olan hastalar arasında HDV seropozitivitesinin yüksek olduğunu ortaya koymuş bulunmaktayız. HDV

enfeksiyonu ülkemizde özellikle Doğu ve Güneydoğu Anadolu'da ciddi bir sağlık sorunudur.

Aspartat aminotransferaz ve alanin aminotransferaz glukoneogenezde rol oynayan, sırasıyla oxalo-asetik asit ve piruvik asit oluşturmak amacıyla aspartik asit ve alaninden amino gruplarını ketoglutarik aside transferini katalizleyen enzimlerdir. ALT sitozolik bir enzimdir ve göreceli olarak karaciğere spesifik iken AST hem sitozolik hem de mitokondrial izoenzimler olup karaciğerin yanısıra çizgili kaslarda, beyin, pankreas ve kan hücrelerinde bulunmaktadır. Permeabilite artışı veya hücre sel nekroz gelişen durumlarda bu enzimleri içeren hücrelerden enzim sızması sonucunda serum enzim düzeyleri normal sınırların üzerine çıkar (29, 107).

Bu çalışmada, HDV RNA düzeyi 400 kopya/ml' nin altında olan hastalar (Grup I) ile HDV RNA düzeyi 400 kopya/ml üzerinde olan hastalar (Grup II) biyokimya sonuçlarına göre karşılaştırıldı. Grup I'de 23 hasta (% 20.35), Grup II'de ise 90 hasta (% 79.65) bulunmaktaydı. Bu sonuçlara göre, Grup II'deki hastaların ortalama ALT düzeylerinin Grup I'deki hastalardan istatistiksel olarak anlamlılık oluşturacak şekilde daha yüksek olduğu bulunmuştur ($p=0.05$). HDV RNA düzeyi yüksek olan hastaların ortalama ALT düzeylerindeki bu yüksekliğin sebebi, karaciğer rezervinin HDV RNA düzeyi yüksek olan hastalarda daha az oranda bulunmasından kaynaklanabilir. Tersine Grup I'deki hastaların AST değerleri Grup II'deki hastaların ortalama AST düzeylerinden istatistiksel olarak anlamlılık oluşturacak şekilde daha yüksek olduğu bulunmuştur ($p=0.016$). Bu sonuca göre, bir hastada AST yükselip ALT düşüyorsa bu ilerleyici hastalığın bulgusudur ve hastanın siroza doğru ilerlediğini göstermektedir. Çünkü siroza giden hastalarda fibrozis geliştiği için hepatosit hücreleri azalmakta ve önce ALT düzeyi düşmektedir.

Aynı şekilde, Grup I ve Grup II hastalarda; total bilirubin, GGT, PLT, total protein, albümin ve INR düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlılık oluşturacak bir fark tespit edilmemiştir.

Kronik HDV hastalarında, Delta virüsü HBV'nin yüzey antijenini kullanarak replike olduğu kabul edilir. Bundan dolayıda, HBsAg titrelerinin yükselmesini, HBV DNA düzeylerinin ise düşmesi beklenir. Bu çalışmada, Grup II'deki hastalarda HBV DNA'nın median değeri 1125 kopya/ml iken, Grup II'deki hastalarda HBV DNA'nın median değeri 133 kopya/ml bulunmuştur ($p=0.015$). Grup II'deki

hastaların HBV DNA düzeyleri Grup I'deki hastaların HBV DNA düzeylerinden istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur. Buna göre, Delta enfeksiyonunun, HBV'nin çoğalmasını baskıladığı sonucuna ulaşılabilir.

Zachou ve ark. (159)'nın yapmış olduğu bir çalışmada da bu çalışmada olduğu gibi serum HBV DNA ve HDV RNA düzeyleri kantitatif olarak ölçülmüştür. Aynı çalışmanın sonucunda Delta virüs replikasyonu arttıkça Hepatit B replikasyonunun azaldığı saptanmıştır. Yani HDV RNA düzeyi arttıkça HBV DNA düzeylerinin azaldığı bildirilmiştir. Zachou ve ark. (159) ayrıca HDV replikasyonunun serum HBsAg düzeyleri ile korele olarak arttığını saptamışlardır. Bu çalışmada da, HDV RNA düzeyi yüksek olan hastaların HBsAg titreleri HDV RNA düzeyi düşük olan hastalardan minimal düzeyde yüksek bulunmuştur. Bu sonucun çıkmasının nedeni hasta sayımızın yeterli olmaması ve HBsAg titrelerinin uzun bir zaman diliminde değişikliğe uğraması olabilir.

Zachou ve ark. (159)'nın HDV RNA ile HBsAg arasındaki ilişkiye dair sonuçları başka çalışmalarda gösterilen terapotik denemelerdeki indirek bulgularla aynı çizgide bulunmuştur. İnterferon tedavisine cevap veren hastalarda HDV RNA düşüşü HBsAg ile ilişkilidir. Nükleozid analogları tedavisine cevap vermemiş hastalarda HBsAg ve HDV RNA düzeyleri stabil kalmıştır. Benzer şekilde mevcut çalışmada da HBsAg ölçümünün HDV RNA replikasyonunda önemli olduğunu göstermektedir.

Bu çalışmada, HBeAg pozitif ve negatif olan hastalar arasında ALT, AST, Total bilirubin, albümin, INR, GGT, PLT düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiki olarak sadece PLT düzeyi HBeAg pozitif hastalarda anlamlı ölçüde düşük çıkmıştır. p değerleri sırasıyla 0.4, 0.7, 0.34, 0.49, 0.5, 0.12, 0.02'dir. HBeAg pozitif hastalarda trombosit seviyelerinin düşmesinin nedeni büyümüş dalaktaki göllenmeye bağlı olabilir.

Genotipler hastalığın gidişatı üzerinde etkili olduğundan ve coğrafi olarak farklılıklar gösterdiğinden, klinik üzerinde tedavi ve tedaviye yanıtı etkisi olabilecek farklı genotiplerin bir popülasyonda belirlenmesi büyük bir önem arz etmektedir (6). Dünyanın farklı alanlarındaki HDV genotip çalışmaları HDV'nin evrimi ve yayılımını anlamamız için değerlidir (181). HBV ve HCV'nin farklı genotiplerinin olduğu, her genotipin farklı bir klinik tablo yarattığı ve bununda ne kadar önemli

olduğu bilindiği gibi, HDV genotiplerinin de aynı nedenlerden dolayı önemli olduğu kabul edilmektedir. Ülkemizde bu konuyla ilgili çalışmalar oldukça sınırlıdır. Altuğlu ve ark. (6) ve Bozdayı ve ark. (5)'nin, kronik hepatitli hasta gruplarında yapmış oldukları iki farklı çalışmanın sonucunda HDV genotipi ülkemiz için Genotip I olarak tespit edilmiştir.

Bu çalışmanın öncelikli amacı ise bölgemizde daha önce hiç belirlenmemiş olan HDV'nin yaygın olan genotip ya da genotiplerini tespit etmeye çalışmaktır. Farklı genotipler enfeksiyonun epidemiyolojisini anlamada ve patogeneizde önemlidir.

Hepatit delta virüs izolatları arasındaki genetik varyasyonların karakterizasyonları genellikle, genotipler arasında %30-40 oranında, aynı genotipin izolatların arasında ise %10-15 oranında değişiklik gösteren filogenetik dizi analizi üzerine odaklanır. Dizi farklılıklarının anlamlılığı halen belirsiz olmakla birlikte, farklı genotiplerle ilişkili patojenik varyasyonlardan sorumlu olabilir (182). Çalışmamızda Genotip I olarak belirlenen örneklerin nükleotit dizilimlerinin % 95-98 oranında benzerliği görülmüştür. Bu oran RNA virüsler için ayrı genotipler arasında olsa dahi önemli bir benzerliktir.

Delta virüsü'nün çeşitliliği coğrafi orjini ile alakalıdır. Avrupa, Kuzey Amerika, Afrika ve bazı Asya ülkeleri başta olmak üzere tüm dünyada genotip I daha yaygındır. Genotip II (daha önce Genotip IIa olarak adlandırılıyordu), Japonya, Taiwan, Rusya'da, Genotip III, en yaygın olarak Güney Amerika'nın Amazon Havzasında, Genotip IV (daha önce Genotip IIb olarak adlandırılıyordu), Tayvan ve Japonya da, Genotip V- VIII ise Kuzey Avrupa'ya göç etmiş olanlarda dahil olmak üzere Afrika kökenli bireylerde bulunmuştur (122). Türkiye'de ise Genotip I saptanmıştır (5, 6).

Bu çalışmaya göre tüm hastaların Genotip I HDV virüsü ile enfekte olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Tüm dünyada genotiplendirme ile alakalı pek çok çalışma yapılmış ve özellikle Genotip I'in diğer genotiplerden daha etkin ve HBV ile etkileşime bağlı olarak daha geniş bir dağılıma sahip olduğu bulunmuştur.

Esmaceli ve ark. (183)'nin 2009 yılında yapmış olduğu bir çalışmada Tahran bölgesinde çalışmaya alınan hastalarda genotip I'i bu bölgenin yaygın genotipi

olarak belirlemişlerdir. Bu sonuç daha önceleri aynı bölgede Behzadian ve ark. (109) ve Mohebbi ve ark. (184)'nın da yapmış oldukları genotip araştırmalarının sonuçlarıyla örtüşmektedir. Genotip I sadece İran bölgesine has değil Kuveyt ve Ürdün gibi tüm Orta Doğu ülkelerinin ortak etkenidir (4).

Pakistan'da 2007 yılında yapılan bir çalışmada hastalardaki yaygın olan genotipin HDV genotip I olduğu, hastalığın her yaşta bulaşabildiği ancak en sık olarak genç erkekleri seçtiği ve bu bölgedeki hastaların büyük çoğunluğunun zamanla siroza gittiği belirtilmiştir (155). Bu çalışmada da benzer sonuçlara ulaşılmıştır.

Tayvan'da yapılan bir çalışmada genotip I hastalarında genotip II hastalarından daha fazla düşük remisyon oranları ve daha çok olumsuz sonuç görölmüştür. Genotip IV'lü hastalar sıklıkla hafif KC hastalığına sahiptir. Ancak, Okinawa'nın Miyako adasında Genotip IV'ün bir varyantı, Tayvan'daki Genotip IV'den daha büyük oranda kötüleşen hastalık ve siroza gidişle birlikte bulunmuştur. Genotip III şiddetli salgınlara Güney Amerika'nın Amazon Havzasında ölümlerle sonuçlanan akut KC yetmezliğine neden olur. Genotip I'e bağlı ciddi hepatit salgınları da meydana gelmiştir, ancak genotip I çok sayıda hastalıkla ilişkilidir. Bu da, genotip ile doğal öykü arasındaki ilişkinin anlaşılmasını zorlaştırmaktadır.

Bu çalışmaya alınan hastaların birçoğunda siroz gelişmiştir. Daha önce bildirilen çalışmalardaki gibi Genotip I'in hastalar üzerinde daha çok olumsuz sonuçlara neden olduğu bilgisine ulaşılmıştır. Ancak bu çalışmada hastalarda sadece genotip I'in varlığı nedeniyle, genotip I'in diğer genotipler ile patogeneze etkisinin kıyaslanması gerçekleştirilememiştir.

Hepatit B virüsünün genotipinin aynı zamanda HDV'nin doğal öyküsünü belirleyebilmesine rağmen, çoğu koenfekte bireyde HBV DNA serum düzeyleri genotip analizi için çok düşük olduğu için herhangi bir etkinin incelenmesi zordur. Ancak, Su ve ark. (152)'nin genellikle HDV genotip I ve II ile enfekte olan Tayvan popölasyonunun da HDV süperenfeksiyonlu hastalarda yapmış olduğu bir çalışmada, HBV genotip B'ye oranla, HBV genotip C ile anlamlı ölçüde daha düşük remisyon oranları ve daha olumsuz sonuçlar saptandığını bildirilmiştir. Brezilya'da yapılan bir alışma, HBV genotipinin koenfeksiyonlu hastalarda karaciğer enflamasyonunun şiddetini ve HDV viral yükü belirlediğini ileri sürmüştür ancak bunun sonuca ilişkin

bulgular henüz net değildir. Mısır'da yapılan bir çalışmada, HBV genotip D ve HDV genotip I birlikteliğinin sık bulunduğu ve HBV taşıyıcılarında HDV koenfeksiyonunun şiddetli karaciğer (KC) hastalığıyla ilişkili olduğu belirlenmiştir (185).

Delta virüs ile enfekte kişilerde birden fazla genotip enfeksiyonu görülebilir. Özellikle virüsle sık karşılaşma riski olan kişilerde, bu kökenler arasında rekombinasyonlar gerçekleşebilir (186).

HDV genotip I'in coğrafik dağılımı ve genetik değişkenliğini daha iyi tanımlamak ve farklı HDV enfeksiyon paternlerine sahip popülasyonlar da genom değişkenliğinin boyutunu değerlendirmek için, farklı bölgelerden 72 hastanın serumlarında HDV RNA analizi yapılmıştır. Hastalar genellikle ABD'de ve, Archangelos ile Rodos da dahil olmak üzere Yunanistan'da ve civarında yaşayan kişilerden oluşmuştur. Elde edilen tüm diziler HDV genotip I'e ait bulunmuş. Bu da, bu genotipin geniş coğrafik dağılımını ve Avrupa ve ABD'deki predominansını doğrular niteliktedir. Yapılan önceki çalışmaların aksine, daha önce yayınlanmış tüm mevcut HDV dizileri ile birlikte, bu geniş ve çeşitlilik gösteren dizi grubunun filogenetik analizi ile genotip I içerisinde iyi tanımlanmış alt tiplere rastlanmamıştır. ABD, Archangelos, Türkiye ve Arnavutluk'ta rastlanan izolatlarda düşük dizi çeşitliliği gözlenirken, bu HDV'nin daha yakın zamanda ortaya çıktığına ve/veya dizi çeşitliliğinin çok daha fazla olduğu Yunanistan, İtalya ve Kuzey Afrika ile kıyaslandığında, bu bölgelere daha az sayıdaki kaynaktan geldiğine işaret etmektedir. Archangelos'ta ortaya çıkan izolatlar arasındaki düşük dizi çeşitliliği, özellikle bu toplumda görülen HDV hastalığının son derece hafif paterni göz önüne alındığında ilginçtir. Genotipler arasında nükleik asit ve amino asit dizilerinin karşılaştırılması, fonksiyonel farklılıklarla ilişkili olabilen hem genotip spesifik dizilere hem de oldukça korunmuş bölgelere işaret etmiştir. Genotip spesifik dizilerinin en belirgin olanı, her bir genotip içinde oldukça korunmuş olan ancak genotipler arasında önemli ölçüde farklılık gösteren L-HDAg'nin C-terminal ucunun 19-20 amino asidine karşılık gelen bölgedir (187). Mevcut çalışmada tüm genomun sekanslanması yapılamadığı için bu kıyaslanmaların yapılması mümkün olmamıştır. Bu nedenle, daha sonraki çalışmalarda tüm genom çalışması hedeflenmektedir.

Genom büyüklüğü, genotip II için 1682-1685 nükleotid (nt), genotip IV (IIB) için ise 1676 nt'dir. Genotip II ve diğer genotipler arasındaki HDV nükleik asit dizilerindeki farklılık % 13.8 ile % 35.3 arasında değişmektedir. Genotip II ile diğer genotipler arasında HDAg kodlayıcı bölgedeki farklılıklar, % 17.8 ile % 29.8 arasında değişmektedir. Genotip I ve II arasında küçük ya da büyük hepatit delta antijenlerinin (HDAg'ler) etkileşimi ile ilgili genotipik ya da boyut açısından sınırlama yoktur ve farklı genotiplerin HDAg'lerinin virüs benzeri partiküllerle birlikte paketlenmesi sırasında genotipik uyumsuzluk yoktur. Genotip II'nin küçük HDAg'si ile genotip I HDV RNA replikasyonunun transkriptivasyonuna ilişkin belirgin bir evrensel genotipik sınırlama yoktur. Bunun tersine, genotip I küçük HDAg'ler için genotip II HDV RNA replikasyonunu transkriptive etmek açısından daha çok genotipik sınırlama olduğu düşünülmektedir. Genotip I HDV'nin düzeltme etkinlikleri de genotip II'ye oranla daha yüksektir. Genotip I ile karşılaştırıldığında, Genotip II HDV enfeksiyonu akut evrede fulminan hepatit ile daha az sıklıkta ilişkilidir ve kronik evrede siroz ya da hepatosellüler karsinom (HCC) gibi daha az olumsuz sonuç verir. Genotip IV (IIB) HDV enfeksiyonu olan hastaların klinik göstergeleri ile sonuçları, genotip II HDV enfeksiyonu olan hastalarinkine daha çok benzer. HBV ya da HDV'nin persistan replikasyonunun, serumlarından her iki virüsün de temizlendiği hastalarinkine kıyasla daha olumsuz sonuçlarla (siroz, HCC ya da mortalite) ilişkili olduğu bulunmuştur. HBV Genotip C, HDV genotip I ve yaşa ek olarak kronik hepatit D'li hastalarda siroz, HCC ya da mortalite ile ilişkili önemli bir faktördür. Bununla birlikte, kronik HDV enfeksiyonu olan hastaların çoğunda hepatit B virüs DNA düzeyleri düşüktür ya da tespit edilemez düzeydedir. Uzun süreli takip sırasında, genotip I HDV sağkalımla ilişkili en önemli belirleyicidir (188).

Bir bireyde HDV'nin kendiliğinden temizlenip temizlenmediği ya da kronik enfekte hale gelip gelmediğini belirleyen mekanizmalar ile ciddi hepatite ve fibrozun hızlı ilerlemesine sebep olan süreçler halen açıklığa kavuşturulamamıştır. HDAg, insan hepatositleri ya da transgenik farelerde doğrudan sitotoksik değildir. HDV'nin viral yükü, klinik bir çalışmada yer alan hastalarda karaciğer hasarının şiddeti ile ilişkili bulunmamıştır. Bununla birlikte, gözlemsel kohort çalışmalarından edinilen kanıtlar, HDV enfeksiyonunun akut evresinde, HDV viremisinin artan alanin

aminotransferaz düzeyleri ve baskılanmış HBV ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Kronik fazda, düşen HDV RNA, HBV'nin reaktivasyonu ve orta düzeyde transaminitis, HDV ya da HBV replikasyonuna bağlı hepatosellüler karsinom ve siroz gelişimi ya da her iki virüsün temizlenmesine bağlı remisyon ile karakterize olan geç evre ile sonuçlanır. Dolayısıyla, HDV ve HBV'nin viral yükü viral enfeksiyonun evresine göre dalgalanma gösterir. Bu dalgalanmanın hastalığın ilerlemesinin patogenezi ile doğrudan bir ilişkiye işaret edip etmediği halen belirsizdir ve diğer faktörler de göz önüne alınmalıdır (133).

RNA düzeltme etkinliği genotip I'e oranla genotip II ile daha düşüktür, ancak bu farkın azalan hastalık aktivitesinin sebebi olması muhtemel değildir. Büyük HDAg'de C-terminal kısmının dizisi, genotipler arasında büyük ölçüde farklılık gösterir hatta diğer HDV genotipleri ile genotip I'in HDV paketleme sinyal bölgeleri arasında %74 oranında farklılık görülür. Genotip I'de büyük antijenin C-terminal dizisi, partiküllerin daha az etkin şekilde birleşmesine sebep olacak şekilde kltrin ile zayıf etkileşime giren genotip II'ye oranla daha iyi paketleme işlevi ile sonuçlanır. Karboksil-uçtaki 19 amino asit, viral paketleme etkinlikleri için en önemli belirleyici olabilir. Bununla birlikte, tüm HDV genotipleri bir ölçüde kltrine bağlanabilir, bu da, HDV partiküllerinin birleşmesinde kltrin bağlayıcı rolünü destekler. Bu mekanizmalardan hangisinin genotipin HDV doğal öyküsü üzerindeki etkisini desteklediği belirsizdir (122).

Hepatit B yüzey antijeni'nin çeşitli bölgeleri, HDV'nin birleşmesi ve sekresyonu açısından gereklidir. Tayvan'da yapılan bir çalışmada, doğal olarak oluşan HBV varyantlarının HBsAg düzeyleri ve dizilerinin HDV'nin birleşmesi ve sekresyonu üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Çeşitli HBsAg düzeylerini eksprese eden 6 HBsAg ekspresyon plazmidi ve 6 hepatit B virüsü (HBV) üreten plazmid (3 genotip B ve 3 genotip C), HDV ile enfekte olan hastaların serumlarından oluşturulmuştur. Bu plazmidler Huh-7 hepatoma hücre hattına, HDV'nin genotip I, II ya da IV'ün 6 ekspresyon plazmidi ile birlikte transfekte edilmiştir. Serum HBsAg ve HBV DNA düzeyleri, HDV RNA düzeyleri ve kronik hepatit D (KHD) hastalarının sonuçları ile korelemiştir. HDV'nin genotip I,II ya da IV sekresyonu, HBsAg düzeyleri ile genel olarak korele iken, HBV genotipleri ya da HBV DNA düzeyleri ile değilmiştir. HBsAg-kodlayıcı dizilere yönelik karşılıklı ve rezidü mutageniz

deneyleri, sitosolik bölge I'deki rezidü Pro-62'nin genotip 2 ve 4 HDV'nin birleşme ve sekresyonunu etkilediğini ancak genotip I'in birleşme ve sekresyonunu etkilemediğini ortaya koymuştur. Pre-S2 N-terminal delesyon HBV mutant, üç HDV genotipinin sekresyonunu olumsuz etkiler. Hastalarda, serum HDV RNA düzeyleri HBsAg düzeyleri ile korele iken, HBV DNA seviyeleri ile değildir. HDV ya da HBV viremisinin kötü sonuçlarla korele olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak, HDV'nin birleşmesi ve sekresyonu, HBsAg'nin miktar ve dizilerinden etkilenmiştir. KHD'nin etkin tedavisi için, HBsAg üretiminin azaltılması ile birlikte HBV ve HDV replikasyonunun baskılanması önemli olabilir (122).

Brezilya'nın Para eyaletine bağlı Bele'm de, 1994-2002 yılları arasında büyük bir devlet hastanesine (Santa Casa de Misericórdia) başvuran kronik olarak HBV ve HDV ile enfekte olmuş hastalardan alınan 17 serum örneği incelenmiş. HBV genotip F'nin, HDV 3 bulunan koenfekte hastalarda saptandığı Amazon'un diğer bölgeleri üzerine yapılan önceki çalışmaların aksine, tüm vakalarda HDV III ve HBV genotipi A (alt tip *adw2*) tespit edilmiştir. HDV 3/HBV A ko enfeksiyonu, HBV ile HDV genotipleri arasında spesifik bir etkileşim olmadığı ve koenfeksiyonun sadece belli bir coğrafi alanda bulunan en yaygın genotipleri yansıtabileceğine işaret etmektedir. HBsAg ile etkileşime giren ve HDV birleşmesi için gerekli olan L-HDAg'nin karboksi-terminal bölgesinin analizi, Doğu Amazon'daki farklı izolatlar arasında bazı farklılıklar olduğunu ortaya koymuştur (100).

RFLP restriksiyon enzimleri (RE) ile HDV genomunun HDAg bölgesi kesilerek genotiplendirme yapılan bir yöntemdir. RFLP basit ve güvenilir bir metoddur. RFLP analizi HDV'nin başlangıç genotiplendirmesi için çok faydalıdır. Bozdayı ve ark. (5)'nin Türk hastalar üzerinde yaptığı bir çalışmada HDV-RNA tiplendirmesi için HDV genomunun HDAg bölgesinin amplifikasyonu, RFLP analizi ile incelenerek HDV genotiplendirmesi yapılmıştır. RFLP analizi ile bütün HDV RNA pozitif hastalarda HDV genotip I belirlenmiştir (183).

Bu çalışmada da, RFLP analizi ile HDAg bölgesinin amplifikasyonu yapılarak tüm hastalarımızın HDV genotip I ile enfekte olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar, Türkiye, İran, Mısır, Lübnan ve Pakistan gibi diğer Orta doğu ülkelerinde yapılan çalışmalarla uyumlu olarak bulunmuştur (6, 155, 179, 185).

Bu çalışmada, *Sma I* enzimi ile HDVAg bölgesinin kesimi sonucunda 219 ve 222 baz çifti uzunluğuna denk gelen bantlar izole edildi. *Xho I* enzimi ile de 382 ve 59 baz çifti uzunluğunda bantlar elde edildi. Bu iki enzimin kesim sonuçları daha önce yapılan çalışmalarla mukayese edildiğinde, HDV Genotip I'e karşılık geliyordu (181, 183). Genotip II için istenilen *Sma I*, kesilmemiş ve *Xho I*, 81+301+59 baz çiftleri ayrıca Genotip III için istenilen *Sma I*, 306+135 baz çiftlerini ve *Xho I*, 83+358 baz çiftleri görülmemiştir. Bu da hastaların sadece HDV Genotip I enfeksiyonuna sahip olduğunu göstermektedir.

Bozdayı ve ark. (5)'nin yaptığı çalışmada, 13 hasta için de direkt sekanslama yapılmış ve bu veriler filogenetik analiz için kullanılmıştır. Bu çalışmada da RFLP sonrası PZR ürünlerine direkt sekanslama yapılmıştır. Sonuçlara göre tüm hastaların Genotip I HDV olduğu belirlenmiştir ve bu sonuç RFLP sonuçları ve Türkiye'de yapılan çalışmalarla uyumlu bulunmuştur.

Sonuç olarak Elazığ yöresinde tüm Türkiye'de olduğu gibi Genotip I HDV'nin yaygın olduğu bulunmuştur.

Bu çalışmada, HDV genotiplendirmesi, HDV-RNA pozitif bulunan hastaların PZR'larından elde edilen ampikonların direkt sekanslanması ile başarıyla uygulanmıştır. Kullanılan klinik örneklerin hepsinde genotip 1 tespit edilmiştir. Sonuçlar Bozdayı ve ark. (5)'nin sonuçları ve yayınlanan diğer çalışmalarla örtüşmektedir.

Defektif bir virüs olan HDV replikasyonunu tamamlamak için HBV'nin yüzey proteinlerine ihtiyaç duyar. HBV'nin bu proteinleri sağlayan genotipleri de HDV enfeksiyonunun oluşumunu etkileyebilir. Tüm popülasyonunu temsil eden HBV DNA genotip D'ye paralel olarak HDV genotip I'de Bozdayı ve ark. (5) tarafından Türk popülasyonunun tek genotipi olarak bildirilmiştir.

Bölgemizde HBV enfeksiyon prevalansının yüksek olması nedeniyle, HBsAg pozitif saptanan hastalarda aynı zamanda HDV enfeksiyonu yönünden de araştırılması endemik olan bölgemiz için önemli katkılar sağlayacaktır. Böylece HDV ile enfekte vakaların daha erken tanınması sağlanabilir. Bu vakalarda serolojik yöntemler kullanılabilir ancak güvenli bir tanı için yeterli olmayabilir. Bu nedenle, moleküler tekniklerin serolojik yöntemlerle birlikte kullanılması viral epidemilerin daha iyi anlaşılması ve virüs patogenezinin daha doğru tespiti için önem

arzetmektedir. Mevcut tezde serolojik ve moleküler yaklaşımlar kullanılarak bölgemizde görülen kronik hepatit B olgularında HDV'nin tespiti ile birlikte, genotipinde belirlenmesi başarı ile gerçekleştirilmiştir.

5. KAYNAKLAR

1. Ergon C, Abacıoğlu H. Hepatit virüsleri. Murrey PR, Rosenthal KS, Pfäller MA. Tıbbi Mikrobiyoloji (Çev. Başustaoğlu AC) 6. Baskı, Ankara: Atlas Kitapçılık, 2010: 645-659.
2. Tabak F. Akut Hepatitler. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Sempozyum Dizisi 2002; 28: 43-55.
3. Özacar T, Bilgiç A, Hepatit B ve D virüsleri, Usta Çelebi Ş (ed). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Ankara: Öncü Basımevi, 1999: 871-880.
4. Lu SN, Chen TM, Lee CM, Wang JH, Tung HD, Wu JC. Molecular epidemiological and clinical aspects of hepatitis D virus in a unique triple hepatitis viruses (B, C, D) endemic community in Taiwan. J Med Virol 2003; 70: 74-80.
5. Bozdayı AM, Aslan N, Bozdayı G, Türkyılmaz AR, Sengezer T, Wend U, et al. Molecular epidemiology of hepatitis B, C and D viruses in Turkish patients. Arch Virol 2004; 149: 2115-2129.
6. Altuğlu İ, Özacar T, Sertozy RY, Erensoy S, Hepatitis delta virus (HDV) genotypes in patients with chronic hepatitis: molecular epidemiology of HDV in Turkey. Int J Infect Dis 2007; 11: 58-62.
7. Wu JC, Choo KB, Chen CM, Chen TZ, Huo TI, Lee SD. Genotyping of hepatitis D virus by restriction- fragment length polymorphism and relation to outcome of hepatitis D. Lancet 1995; 346: 939-41.
8. Erensoy S. Virüs hastalıklarının tanısında moleküler biyolojik yöntemler ve filogenetik analiz. Ustaçelebi Ş, Abacıoğlu H, Badur S. Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji. Ankara: Güneş Kitabevi, 2004: 71-87.
9. Tekeli E. Hepatit B virüs enfeksiyonundan korunma. Tabak F, Balık İ, Tekeli E (ed). İstanbul: Viral Hepatit Savaşım Derneği, Oban Matbaası, 2007; 178-182.
10. Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S. A "NEW" Antigen in Leukemia Sera. Jama 1965; 191: 541-546.

11. Blumberg BS, Gerstley BJ, Hungerford DA, London WT, Sutnick AI. A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukemia, and hepatitis. *Ann Intern Med* 1967; 66: 924-931.
12. Blumberg BS, Sutnick AI, London WT. Hepatitis and leukemia: their relation to Australia antigen. *Bull N Y Acad Med* 1968; 44: 1566-1586.
13. Robinson WS, Greenman RL. DNA polymerase in the core of the human hepatitis B virus candidate. *J Virol* 1974; 13: 1231-1236.
14. Kaplan PM, Greenman RL, Gerin JL, Purcell RH, Robinson WS. DNA polymerase associated with human hepatitis B antigen. *J Virol* 1973; 12: 995-1005.
15. Lüsebrink J, Schildgen V, Schildgen O. HBV–Virology. *Hepatology A Clinical Textbook*, 2009: 55-74.
16. Ustaçelebi Ş, Ergünay K. Hepatit B virüsünün (HBV) moleküler biyolojisi. Tabak F, Balık İ, Tekeli E (ed). İstanbul: Viral Hepatit 2007, Viral Hepatitle Savaşım Derneği, Oban Matbaası, 2007: 96-107.
17. Norder H, Courouce AM, Magnius LO. Molecular basis of hepatitis B virus serotype variations within the four major subtypes. *J Gen Virol* 1992; 73: 3141-3145.
18. Kramvis A, Kew M, Francois G. Hepatitis B virus genotypes. *Vaccine* 2005; 23: 2409-2423.
19. Özacar T. Hepatit B Virüsü, Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (eds). Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, 3. Baskı, İstanbul: Nobel Matbaacılık, 2008: 1905-1910.
20. Cooper A, Paran N, Shaul Y. The earliest steps in hepatitis B virus infection. *Biochem Biophys Acta* 2003; 1614: 89-96.
21. Albin C, Robinson WS. Protein kinase activity in hepatitis B virus. *J Virol* 1980; 34: 297-302.
22. Bruss V. Envelopment of the hepatitis B virus nucleocapsid. *Virus Res* 2004; 106: 199-209.

23. Lutwick LI, Robinson WS. DNA synthesized in the hepatitis B Dane particle DNA polymerase reaction. *J Virol* 1977; 21: 96-104.
24. Summers J, O'Connell A, Millman I. Genome of hepatitis B virus: restriction enzyme cleavage and structure of DNA extracted from Dane particles. *Proc Natl Acad Sci* 1975; 72: 4597-4601.
25. Will H, Reiser W, Weimer T, Pfaff E, Buscher M, Sprengel R, et al. Replication strategy of human hepatitis B virus. *J Virol* 1987; 6: 904-911.
26. Lien JM, Aldrich CE, Mason WS. Evidence that a capped oligoribonucleotide is the primer for duck hepatitis B virus plus-strand DNA synthesis. *J Virol* 1986; 57: 229-236.
27. Lien JM, Petcu DJ, Aldrich CE, Mason WS. Initiation and termination of duck hepatitis B virus DNA synthesis during virus maturation. *J Virol* 1987; 61: 3832-3840.
28. Chen MT, Billaud JN, Sallberg M, Guidotti LG, Chisari FV, Jones J, et al. A function of the hepatitis B virus precore protein is to regulate the immune response to the core antigen. *Proc Natl Acad Sci* 2004; 101: 14913-14918.
29. Gözel N, Kronik Delta İnfeksiyonunun Demografik Klinikopatolojik ve Serolojik Bulgularının Kronik Viral B Hepatit İnfeksiyonu ile Karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi: Elazığ, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Bölümü, 2010.
30. Zhang Z, Torii N, Hu Z, Jacob J, Liang TJ. X-deficient woodchuck hepatitis virus mutants behave like attenuated viruses and induce protective immunity in vivo. *J Clin Invest* 2001; 108: 1523-1531.
31. Zoulim F, Saputelli J, Seeger C. Woodchuck hepatitis virus X protein is required for viral infection in vivo. *J Virol* 1994; 68: 2026-2030.
32. Schaefer S. Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 14-21.
33. Murray JM, Purcell RH, Wieland SF. The half-life of hepatitis B virions. *Hepatology* 2006; 44: 1117-1121.

34. Tuttleman JS, Pugh JC, Summers JW. In vitro experimental infection of primary duck hepatocyte cultures with duck hepatitis B virus. *J Virol* 1986; 58: 17-25.
35. Ochiya T, Tsurimoto T, Ueda K, Okubo K, Shiozawa M, Matsubara K. An in vitro system for infection with hepatitis B virus that uses primary human fetal hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci* 1989; 86: 1875-1879.
36. Gripon P, Diot C, Theze N, Fourel I, Loreal O, Brechot C, et al. Hepatitis B virus infection of adult human hepatocytes cultured in the presence of dimethyl sulfoxide. *J Virol* 1988; 62: 4136-4143.
37. Ishikawa T, Ganem D. The pre-S domain of the large viral envelope protein determines host range in avian hepatitis B viruses. *Proc Natl Acad Sci* 1995; 92: 6259-6263.
38. Chouteau P, Le Seyec J, Cannie I, Nassal M, Guguen-Guillouzo C, Gripon P. A short N proximal region in the large envelope protein harbors a determinant that contributes to the species specificity of human hepatitis B virus. *J Virol* 2001; 75: 11565-11572.
39. Lambert V, Fernholz D, Sprengel R, Fourel I, Deleage G, Wildner G, et al. Virus-neutralizing monoclonal antibody to a conserved epitope on the duck hepatitis B virus pre-S protein. *J Virol* 1990; 64: 1290-1297.
40. Gripon P, Cannie I, Urban S. Efficient inhibition of hepatitis B virus infection by acylated peptides derived from the large viral surface protein. *J Virol* 2005; 79: 1613-1622.
41. Urban S, Gripon P. Inhibition of duck hepatitis B virus infection by a myristoylated pre-S peptide of the large viral surface protein. *J Virol* 2002; 76: 1986-1990.
42. Klingmuller U, Schaller H. Hepadnavirus infection requires interaction between the viral pre-S domain and a specific hepatocellular receptor. *J Virol* 1993; 67: 7414-7422.
43. Pugh JC, Di Q, Mason WS, Simmons H. Susceptibility to duck hepatitis B virus infection is associated with the presence of cell surface receptor sites that efficiently bind viral particles. *J Virol* 1995; 69: 4814-4822.

44. Kann M, Bischof A, Gerlich WH. In vitro model for the nuclear transport of the hepadnavirus genome. *J Virol* 1997; 71: 1310-1316.
45. Guo W, Chen M, Yen TS, Ou JH. Hepatocyte-specific expression of the hepatitis B virus core promoter depends on both positive and negative regulation. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 443-448.
46. Raney AK, Zhang P, McLachlan A. Regulation of transcription from the hepatitis B virus large surface antigen promoter by hepatocyte nuclear factor 3. *J Virol* 1995; 69: 3265-3272.
47. Liao W, Ou JH. Phosphorylation and nuclear localization of the hepatitis B virus core protein: significance of serine in the three repeated SPRRR motifs. *J Virol* 1995; 69: 1025-1029.
48. Lan YT, Li J, Liao W, Ou J. Roles of the three major phosphorylation sites of hepatitis B virus core protein in viral replication. *Virology* 1999; 259: 342-348.
49. Gerlich WH, Goldmann U, Muller R, Stibbe W, Wolff W. Specificity and localization of the hepatitis B virus-associated protein kinase. *J Virol* 1982; 42: 761-766.
50. Kau JH, Ting LP. Phosphorylation of the core protein of hepatitis B virus by a 46-kilodalton serine kinase. *J Virol* 1998; 72: 3796-3803.
51. Daub H, Blencke S, Habenberger P, Kurtenbach A, Dennenmoser J, Wissing J, et al. Identification of SRPK1 and SRPK2 as the major cellular protein kinases phosphorylating hepatitis B virus core protein. *J Virol* 2002; 76: 8124-8137.
52. Watts NR, Conway JF, Cheng N, Stahl SJ, Belnap DM, Steven AC, et al. The morphogenic linker peptide of HBV capsid protein forms a mobile array on the interior surface. *EMBO J* 2002; 21: 876-884.
53. Schildgen O, Roggendorf M, Lu M. Identification of a glycosylation site in the woodchuck hepatitis virus preS2 protein and its role in protein trafficking. *J Gen Virol* 2004; 85: 787-793.
54. Lu X, Tran T, Simsek E, Block TM. The alkylated imino sugar, n-(n-Nonyl)-deoxygalactonojirimycin, reduces the amount of hepatitis B virus nucleocapsid in tissue culture. *J Virol* 2003; 77: 11933-11940.

55. Block TM, Lu X, Platt FM, Foster GR, Gerlich WH, Blumberg BS, et al. Secretion of human hepatitis B virus is inhibited by the imino sugar N-butyldeoxynojirimycin. *Proc Natl Acad Sci* 1994; 91: 2235-2239.
56. Schmitt S, Glebe D, Tolle TK, Lochnit G, Linder D, Geyer R, et al. Structure of pre-. *J Gen Virol* 2004; 85: 2045-2053.
57. Schmitt S, Glebe D, Alving K, Tolle TK, Linder M, Geyer H, et al. Analysis of the pre-. *J Biol Chem* 1999; 274: 11945-11957.
58. Glebe D, Urban S. Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 22-38.
59. Le Seyec J, Chouteau P, Cannie I, Guquen-Guillouzo C, Gripon P. Infection process of the hepatitis B virus depends on the presence of a defined sequence in the pre-S 1 domain. *J Virol* 1999; 73: 2052-2057.
60. Newbold JE, Xin H, Tencza M, Sherman G, Dean J, Bowden S, et al. The covalently closed duplex form of the hepadnavirus genome exists in situ as a heterogeneous population of viral minichromosomes. *J Virol* 1995; 69: 3350-3357.
61. Cattaneo R, Will H, Schaller H. Hepatitis B virus transcription in the infected liver. *EMBO J* 1984; 3: 2191-2196.
62. Beck J, Nassal M. Hepatitis B virus replication. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 48-64.
63. Weber M, Bronsema V, Bartos H, Bosserhoff A, Bartenschlager R, Schaller H. Hepadnavirus P protein utilizes a tyrosine residue in the TP domain to prime reverse transcription. *J Virol* 1994; 68: 2994-2999.
64. Bartenschlager R, Schaller H. Hepadnaviral assembly is initiated by polymerase binding to the encapsidation signal in the viral RNA genome. *Embo J* 1992; 11: 3413-3420.
65. Huang MJ, Summers J. Infection initiated by the RNA pregenome of a DNA virus. *J Virol* 1991; 65: 5435-5439.

66. Jeong JK, Yoon GS, Ryu WS. Evidence that 5'-end cap structure is essential for encapsidation of hepatitis B virus pregenomic RNA. *J Virol* 2000; 74: 5502-5508.
67. Lanford RE, Kim YH, Lee H, Notvall L, Beames B. Mapping of the hepatitis B virus reverse transcriptase TP and RT domains by transcomplementation for nucleotide priming and by protein-protein interaction. *J Virol* 1999; 73: 1885-1893.
68. Loeb DD, Hirsch RC, Ganem D. Sequence-independent RNA cleavages generate the primers for plus strand DNA synthesis in hepatitis B viruses: implications for other reverse transcribing elements. *EMBO J* 1991; 10: 3533-3540.
69. Awaidy S, Abu-Elyazeed R, Al Hosani H, et al. Sero-epidemiology of hepatitis B infection in pregnant women in Oman, Qatar and the United Arab Emirates. *J Infect* 2006; 52: 202-206.
70. Özdemir D, Kurt H. Hepatit B virüsü enfeksiyonlarının epidemiyolojisi. Tabak F, Tekeli E, Balık İ (eds). *Viral Hepatit 2007*. İstanbul: Viral Hepatitle Savaşım Derneği, Oban Matbaası, 2007: 108-117.
71. Özdemir D, Balık İ. Ülkemizde Hepatit B Virüsü (HBV) Genotip Dağılımı. *Viral Hepatit Derg* 2002; 1: 451-454.
72. Paraná R, Almeida D. HBV epidemiology in Latin America. *J Clin Virol* 2005; 34: 130-133.
73. Minuk GY, Sun DF, Uhanova J, Zhang M, Caouette S, Nicolle LE, et al. Occult hepatitis B virus infection in a North American community-based population. *J Hepatol* 2005; 42: 480-485.
74. Schildgen O, Fiedler M, Dahmen U, Li J, Lohrengel B, Lu M, et al. Fluctuation of the cytokine expression in the liver during the chronic woodchuck hepatitis virus (WHV) infection is not related to viral load. *Immunol Lett* 2006; 102: 31-37.
75. Papatheodoridis GV, Petraki K, Cholongitas E, Kanta E, Ketikoglou I, Manesis EK. Impact of interferon-alpha therapy on liver fibrosis progression in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 2005; 12: 199-206.

76. Rizzetto M, Tassopoulos NC, Goldin RD, Esteban R, Santantonio T, Heathcote EJ, et al. Extended lamivudine treatment in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2005; 42: 173-179.
77. Maynard M, Parvaz P, Durantel S, Chevallier M, Chevallier P, Lot M, et al. Sustained HBs seroconversion during lamivudine and adefovir dipivoxil combination therapy for lamivudine failure. *J Hepatol* 2005; 42: 279-281.
78. Jilbert AR, Wu TT, England JM, Hall PM, Carp NZ, O'Connell AP, et al. Rapid resolution of duck hepatitis B virus infections occurs after massive hepatocellular involvement. *J Virol* 1992; 66: 1377-1388.
79. Kajino K, Jilbert AR, Saputelli J, Aldrich CE, Cullen J, Mason WS. Woodchuck hepatitis virus infections: very rapid recovery after a prolonged viremia and infection of virtually every hepatocyte. *J Virol* 1994; 68: 5792-5803.
80. Thimme R, Wieland S, Steiger C, Ghayeb J, Reimann KA, Purcell RH, et al. CD8(+) T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection. *J Virol* 2003; 77: 68-76.
81. Guidotti LG, Ando K, Hobbs MV, Ishikawa T, Runkel L, Schreiber RD, et al. Cytotoxic T lymphocytes inhibit hepatitis B virus gene expression by a noncytolytic mechanism in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci* 1994; 91: 3764-3768.
82. Guidotti LG, Ishikawa T, Hobbs MV, Matzke B, Schreiber R, Chisari FV. Intracellular inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* 1996; 4: 25-36.
83. Tsui LV, Guidotti LG, Ishikawa T, Chisari FV. Posttranscriptional clearance of hepatitis B virus RNA by cytotoxic T lymphocyte-activated hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci* 1995; 92: 12398-12402.
84. Sonsuz A. HBsAg (+) hastaya yaklaşım. Onuncu Ulusal İç Hastalıkları Kongresi, 2008.
85. Gitlin N. Hepatitis B: diagnosis, prevention, and treatment. *Clin Chem* 1997; 43: 1500-1506.

86. Sterneck M, Kalinina T, Günther S, Fischer L, Santantonio T, Greten H, et al. Functiona analysis of HBV genomes from patients with fulminant hepatitis. *Hepatology* 1998; 28: 1390-1397.
87. Taşyaran MA. Hepatit B virüs enfeksiyonunda klinik. *Viral Hepatit 2007*. Ankara: Viral Hepatitle Savaşım Derneği 2007; 118-122.
88. Özsan M. HBV Enfeksiyonunda mikrobiyolojik tanı. *Viral Hepatit 2007*. İstanbul: Viral Hepatitle Savaşım Derneği, Oban Matbası, 2007: 124-134.
89. Kohmoto M, Enomoto M, Tamori A, Habu D, Takeda T, Kawada N, et al. Quantitative detecyion of hepatitis B surface antigen by chemiluminescent microparticle immunoassay during lamivudine treatment of chronic hepatitis B virus carriers. *J Med Virol* 2005; 75: 235-239.
90. Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. *Hepatology* 2001; 34: 1225-1241.
91. Conjeevaram HS, Lok AS. Occult hepatitis B virus infection: a hidden menace? *Hepatology* 2001; 34: 204-206.
92. Schildgen O, Sirma H, Funk A, Olotu C, Wend UC, Hartmann H, et al. Variant of hepatitis B virüs with primary resistance to adefovir. *N Engl J Med* 2006; 354: 1807-1812.
93. Sirma H, Funk A, Gerlich W, Schildgen O. Does pre-treatment with lamivudine prime for adefovir resistance of hepatitis B virus infection? *J Antimicrob Chemother* 2007; 60: 448-449.
94. Brechtbuehl K, Whalle SA, Dusheiko GM, Saunders NA. A rapid real time quantitative polymerase chain reaction for hepatitis B virüs. *J Virol Methods* 2001; 93: 105-113.
95. Hunt CM, McGill JM, Allen MI. Clinical relevance of hepatitis B viral mutations. *Hepatology* 2000; 31: 1037-1044.
96. Özacar T, Hepatit D Virüsü. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (eds). *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*, 3. Baskı, İstanbul: Nobel Matbaacılık, 2008: 1905-1910.

97. Huang CR, Lo SJ. Evolution and diversity of the human hepatitis D virus genome. *Adv Bioinformatics*. 2010; 32: 36-54.
98. Wedemeyer H. Hepatitis D-Diagnostic procedures and therapy. *Hepatology* 2009; 155-167.
99. Grabowski J, Wedemeyer H. Hepatitis Delta: Immunopathogenesis and clinical challenges. *Dig Dis* 2010; 28: 133–138.
100. Gomes-Gouvêa MS, Pereira Soares Mdo C, Guedes de Carvalho Mello IM, Brito EM, Pereira Moia Lde J, Bensabath G, et al. Hepatitis D and B virus genotypes in chronically infected patients from the Eastern Amazon Basin. *Acta Tropica* 2008; 106: 149-155.
101. Gudima S, He Y, Meier A, Chang J, Chen R, Jarnik M, et al. Assembly of hepatitis delta virus: particle characterization, including the ability to infect primary human hepatocytes. *J Virol* 2007; 81: 3608-3617.
102. Günaydın M. Hepatit Delta Virüsü: Viroloji, Tabak F, Balık İ, Tekeli E (eds). *Viral Hepatit 2007*, İstanbul: Viral Hepatitle Savaşım Derneği, Oban Matbaası, 2007; 264-269.
103. Casey JL. Hepatitis delta virus. Genetics and pathogenesis. *Clin Lab Med* 1996; 16: 451–464.
104. Polish LB, Gallagher M, Fields HA, Hadler SC. Delta Hepatitis: Molecular biology and clinical and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev* 1993; 6: 211-229.
105. Kos A, Dijkema R, arnberg AC, van der Meide PH, Schellekens H. The hepatitis delta virus possesses a circular RNA. *Nature* 1986; 323: 558-560.
106. Ryu WS, Bayer M, Taylor J. Assembly of hepatitis delta virus particles. *J Virol* 1992; 66: 2310-2315.
107. Yalçın MS. Kronik HDV İnfeksiyonlu Hastalarda Serum HBV DNA ve HDV RNA Düzeyleri ile Histolojik Bulguların Hastalığın Klinik Evreleriyle İlişkisi: Karşılaştırmalı Prospektif Klinik Çalışma. Uzmanlık Tezi: Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Bölümü. Diyarbakır, 2008.

108. Langon T, Fillon S, Pichoud C, Hantz O, Trepo C, Kay A. Analysis of a hepatitis delta virus isolate from the Central African Republic. *Res Virol* 1998; 149: 171–185.
109. Behzadian F, Sabahi F, Karimi M, Sadeghizadeh M, Maghsoudi N, Forooshani RS, et al. Molecular phylogenetic analysis of Iranian HDV complete genome. *Virus Genes* 2005; 30: 383–393.
110. Gal FL, Gault E, Ripault MP, Serpaggi J, Trinchet JC, Gordien E, et al. Eighth major clade for hepatitis delta virus. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 1447–1450.
111. Niro GA, Gioffreda D, Fontana R. Hepatitis delta virus infection: Open issues. *Digestive and Liver Disease* 2011; 43: 19–24.
112. Pascarella S, Negro F. Hepatitis D virus: an update. *Liver International* 2010; 31: 7–21.
113. Bielawski KP, Zietkowski D, Charmuszko U, Sikorska K, Stalke P. Hepatitis delta virus infection in chronically HBV-infected patients from northern Poland. *Arch Virol* 2006; 151: 1207–1215.
114. Imazeki F, Omata M, Ohto M. Heterogeneity and evolution rates of delta virus RNA sequences. *J Virol* 1990; 64: 5594–5599.
115. Ivaniushina V, Radjef N, Alexeeva M, Gault E, Semenov S, Salhi M, et al. Hepatitis delta virus genotypes I and II cocirculate in an endemic area of Yakutia, Russia. *J Gen Virol* 2001; 82: 2709–2718.
116. Gomes-Gouvea MS, Soares MCP, Bensabath G, Carvalho-Mello IMVG, Brito EMF, Souza OSC, et al. Hepatitis B virus and hepatitis delta virus genotypes in outbreaks of fulminant hepatitis (Labrea black fever) in the western Brazilian Amazon region. *J Gen Virol* 2009; 90: 2638–2643.
117. Moriyama M, Taira M, Matsumura H, Aoki H, Mikuni M, Kaneko M, et al. Genotype Analysis, Using PCR with Type-Specific Primers, of Hepatitis B Virus Isolates from Patients Coinfected with Hepatitis Delta Virus Genotype II from Miyako Island, Japan. *Intervirology* 2003; 46: 114–120.

118. Ma SP, Sakugawa H, Makino Y, Tadano M, Kinjo F, Saito A. The complete genomic sequence of hepatitis delta virus genotype IIb prevalent in Okinawa, Japan. *J Gen Virol* 2003; 84: 461–464.
119. Sakugawa H, Nakasone H, Nakayoshi T, Kawakami Y, Miyazato S, Kinjo F, et al. Hepatitis delta virus genotype IIb predominates in an endemic area, Okinawa, Japan. *J Med Virol* 1999; 58: 366–372.
120. Arakawa Y, Moriyama M, Taira M, Hayashi N, Tanaka N, Okubo H, et al. Molecular analysis of hepatitis D virus infection in Miyako Island, a small Japanese island. *J Viral Hepat* 2000; 7: 375–381.
121. Radjef N, Gordien E, Ivaniushina V, Gault E, Anais P, Drugan T, et al. Molecular phylogenetic analyses indicate a wide and ancient radiation of African hepatitis delta virus, suggesting a deltavirus genus of at least seven major clades. *J Virol* 2004; 78: 2537–2544.
122. Hughes SA, Wedemeyer H, Harrison PM. Hepatitis delta virüs. *Lancet* 2011; 378: 73-85.
123. Değertekin H. Hepatit D virüs infeksiyonunun epidemiyolojisi ve korunma. Tabak F, Balık İ, Tekeli E. *Viral Hepatit 2007*. İstanbul: Viral Hepatitle Savaşım Derneği, Oban Matbaası, 2007: 256-262.
124. Değertekin H, Yalcin K, Yakut M, Yurdaydin C. Seropositivity for delta hepatitis in patients with chronic hepatitis B and liver cirrhosis in Turkey: a meta-analysis. *Liver International* 2008; 28: 494-498.
125. Tsatsralt-Od B, Takahashi M, Nishizawa T, Endo K, Inoue J, Okamoto H. High prevalence of dual or triple infection of hepatitis B, C, and delta viruses among patients with chronic liver disease in Mongolia. *J Med Virol* 2005; 77: 491-499.
126. Weisfuse IB, Hadler SC, Fields HA, Alter MJ, O'Malley PM, Judson FN, et al. Delta hepatitis in homosexual men in the United States. *Hepatology* 1989; 9: 872-874.
127. Rizzetto M. The delta agent. *Hepatology* 1983; 3: 729-737.

128. Troisi CL, Hollinger FB, Hoots WK, Contant C, Gill J, Ragni M, et al. A multicenter study of viral hepatitis in a United States hemophilic population. *Blood* 1993; 81: 412-418.
129. Hershov RC, Chomel BB, Graham DR, Schyve PM, Mandel EJ, Kane MA, et al. Hepatitis D virus infection in Illinois state facilities for the developmentally disabled. Epidemiology and clinical manifestations. *Ann Intern Med* 1989; 110: 779-785.
130. Kim HS, Kim SJ, Park HW, Shin WG, Kim KH, Lee JH, et al. Prevalence and clinical significance of hepatitis D virus co-infection in patients with chronic hepatitis B in Korea. *J Med Virol* 2011; 28: 494-498.
131. Demirdal T. Afyon Karahisar ilinde hepatit delta virüsü seroprevalansı. *Viral Hepatit Dergisi* 2009; 14: 104-107.
132. Nakano T, Shapiro CN, Hadler SC, Casey JL, Mizokami M, Orito E, et al. Characterization of hepatitis D virus genotype III among Yucpa Indians in Venezuela. *J Gen Virol* 2001; 82: 2183-2189.
133. Nisini R, Paroli M, Accapezzato D, Bonino F, Rosina F, Santantonio T, et al. Human CD4+ Tcell response to hepatitis delta virus: identification of multiple epitopes and characterization of T-helper cytokine profiles. *J Virol* 1997; 71: 2241-2251.
134. Huang YH, Tao MH, Hu CP, Syu WJ, Wu JC. Identification of novel HLA-A*0201-restricted CD8+ T-cell epitopes on hepatitis delta virus. *J Gen Virol* 2004; 85: 3089-3098.
135. Aslan N, Yurdaydin C, Wiegand J, Greten T, Ciner A, Meyer MF, et al. Cytotoxic CD4 T cells in viral hepatitis. *J Viral Hepat* 2006; 13: 505-514.
136. Jardi R, Rodriguez F, Buti M, Costa X, Cotrina M, Galimany R, et al. Role of hepatitis B, C, and D viruses in dual and triple infection: influence of viral genotypes and hepatitis B precore and basal core promoter mutations on viral replicative interference. *Hepatology* 2001; 34: 404-410.
137. Sagnelli E, Coppola N, Scolastico C, Filippini P, Santantonio T, Stroffolini T, et al. Virologic and clinical expressions of reciprocal inhibitory effect of hepatitis B, C, and delta viruses in patients with chronic hepatitis. *Hepatology* 2000; 32: 1106-1110.

138. Casey JL, Niro GA, Engle RE, Vega A, Gomez H, McCarthy M, et al. Hepatitis B virüs (HBV)/hepatitis D virus (HDV) coinfection in outbreaks of acute hepatitis in the Peruvian Amazon basin: the roles of HDV genotype III and HBV genotype F. *J Infect Dis* 1996; 174: 920-926.
139. Sonsuz A. Kronik Hepatit B ve Delta. Hepato- Bilier Sistem ve Pankreas Hastalıkları Sempozyum Dizisi, 2002: 67-78.
140. Maggiore G, Hadehouel M, Sessa F, Vinci M, Craxi A, Marzani MD, et al. A retrospective study of the role of delta agent infection in children with HBsAg positive chronic hepatitis. *Hepatology* 1985; 5: 7-9.
141. Caredda F, Rossi E, d' Arminio Monforte A, Zampini L, Re T, Meroni B, et al. Hepatitis B virus-associated coinfection and superinfection with delta agent: Indistinguishable disease with different outcome. *J Infect Dis* 1985; 151: 925-928.
142. Rizzetto M, Purcell RH, Gerin JL. Epidemiology of HBV-associated delta agent: geographical distribution of antidelata and prevalence in polytransfused HBsAg carriers. *Lancet* 1980; 1: 1215-1218.
143. Meşe S. HBsAg Pozitif Kan Donörlerinde HDV'nin Serolojik ve Moleküler Yöntemler Kullanılarak Araştırılması, Dicle Üniversitesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Bölümü, Uzmanlık Tezi: Diyarbakır, 2008.
144. Çelen MK. HDV enfeksiyonunun doğal seyri. Tabak F, Balık İ (eds). *Viral Hepatit 2009*. İstanbul: Viral Hepatitle Savaşım Derneği, Expres Matbaası, 2009; 183-186.
145. Rizzetto M. Hepatitis D: virology, clinical and epidemiological aspects. *Acta Gastroenterol Belg* 2000; 63: 221-224.
146. Dienes HP, Purcell RH, Popper H, Ponzetto A. The significance of infections with two types of viral hepatitis demonstrated by histologic features in chimpanzees. *J Hepatol* 1990; 10: 77-84.
147. Flodgren E, Bengtsson S, Knutsson M, Strebkova EA, Kidd AH, Alexeyev OA, et al. Recent high incidence of fulminant hepatitis in Samara, Russia: molecular analysis of prevailing hepatitis B and D virus strains. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3311-3316.

148. Tsatsralt-Od B, Takahashi M, Endo K, Buyankhuu O, Baatarkhuu O, Nishizawa T, et al. Infection with hepatitis A, B, C and delta viruses among patients with acute hepatitis in Mongolia. *J Med Virol* 2006; 78: 542-550.
149. Hoşoğlu S. HDV enfeksiyonunun kliniği ve tanısı. Tabak F, Balık İ, Tekeli E (eds). *Viral Hepatit 2009*. İstanbul: Viral Hepatitle Savaşım Derneği, Oban Matbaası, 2007: 270-274.
150. Fattovich G, Boscaro S, Noventa F, Pornaro E, Stenico D, Alberti A, et al. Influence of hepatitis delta virus infection on progression to cirrhosis in chronic hepatitis type B. *J Infect Dis* 1987; 155: 931-935.
151. Uzunalimoglu O, Yurdaydin C, Cetinkaya H, Bozkaya H, Sahin T, Colakoglu S, et al. Risk factors for hepatocellular carcinoma in Turkey. *Digestive Dis Sci* 2001; 46: 1022-1028.
152. Su CW, Huang YH, Huo TI, Shih HH, Sheen IJ, Chen SW, et al. Genotypes and viremia of hepatitis B and D viruses are associated with outcomes of chronic hepatitis D patients. *Gastroenterology* 2006; 130: 1625-1635.
153. Sheng WH, Hung CC, Kao JH, Chang SY, Chen MY, Hsieh SM, et al. Impact of hepatitis D virus infection on the long-term outcomes of patients with hepatitis B virus and HIV coinfection in the era of highly active antiretroviral therapy: a matched cohort study. *Clin Infect Dis* 2007; 44: 988-995.
154. Bozdayı M, Kural A, Özdemir S, Cengiz D, Türkvan M. Donörlerde HbsAg ve delta antikorlu sıklığı. *Endoskopi Dergisi* 1991; 12: 26-32.
155. Moatter T, Abbas Z, Shabir S, Jafri W. Clinical presentation and genotype of hepatitis delta in Karaichi. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 2604-2607
156. Sakugawa H. Determination of hepatitis delta virus (HDV)-RNA in asymptomatic cases of HDV infection. *Am J Gastroenterol* 1997; 92: 2232-2236
157. Wu JC, Li CS, Chen CL, Sheng WY, Lee SD, Lo KJ. Factors associated with viremia and elevated transaminase levels in asymptomatic hepatitis D virus-infected risk groups. *J Med Virol* 2005; 42: 86-90.

158. Dahl LE, Lai MM. Hepatitis delta virus: the molecular basis of laboratory diagnosis. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2000; 37: 45–92.
159. Zachou K, Yurdaydin C, Drebber U, Dalekos GN, Erhardt A, Cakaloglu Y, et al. Quantitative HBsAg and HDV-RNA levels in chronic delta hepatitis. *Liver Int* 2009; 30: 430–437.
160. Viral Hepatit Dergisi, II Viral Hepatit Tanı ve Tedavi Konsensus Toplantısı Raporu 2007. Hepatit D Enfeksiyonunda Tanı ve Tedavi. *Viral Hepatit Dergisi* 2008; 13: 51-56.
161. Erhardt A, Gerlich W, Starke C, Wend U, Donner A, Sagir A, et al. Treatment of chronic hepatitis delta with pegylated interferon-alpha2b. *Liver Int* 2006; 26: 805-810.
162. Wedemeyer H, Boker KH, Pethig K, Petzold DR, Flemming P, Tillmann HL, et al. Famciclovir treatment of chronic hepatitis B in heart transplant recipients: a prospective trial. *Transplantation* 1999; 68: 1503-1511.
163. Yurdaydin C, Bozkaya H, Gurel S, Tillmann HL, Aslan N, Okcu-Heper A, et al. Famciclovir treatment of chronic delta hepatitis. *J Hepatol* 2002; 37: 266-271.
164. Wolters LM, van Nunen AB, Honkoop P, Vossen AC, Niesters HG, Zondervan PE, et al. Lamivudine high dose interferon combination therapy for chronic hepatitis B patients coinfecting with the hepatitis D virus. *J Viral Hepat* 2000; 7: 428-434.
165. Niro GA, Rosina F, Rizzetto M. Treatment of hepatitis D. *J Viral Hepat* 2005; 12: 2-9.
166. Yurdaydin C, Bozkaya H, Onder FO, Senturk H, Karaaslan H, Akdogan M, et al. Treatment of chronic delta hepatitis with lamivudine vs lamivudine + interferon vs interferon. *J Viral Hepat* 2008; 15: 314-321.
167. Sheldon J, Ramos B, Toro C, Rios P, Martinez-Alarcon J, Bottecchia M, et al. Does treatment of hepatitis B virus (HBV) infection reduce hepatitis delta virus (HDV) replication in HIV/HBV-HDV-coinfecting patients? *Antivir Ther* 2008; 13: 97-102.

168. Casey J, Cote PJ, Toshkov IA, Chu CK, Gerin JL, Hornbuckle WE, et al. Clevudine inhibits hepatitis delta virus viremia: a pilot study of chronically infected woodchucks. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 4396-4399.
169. Rizzetto M, Rosina F, Saracco G, Bellando PC, Actis GC, Bonino F, et al. Treatment of chronic delta hepatitis with alpha-2 recombinant interferon. *J Hepatol* 1986; 3: 229-233.
170. Farci P, Roskams T, Chessa L, Peddis G, Mazzoleni AP, Scioscia R, et al. Long-term benefit of interferon alpha therapy of chronic hepatitis D: regression of advanced hepatic fibrosis. *Gastroenterology* 2004; 126: 1740-1749.
171. Niro GA, Ciancio A, Gaeta GB, Smedile A, Marrone A, Olivero A, et al. Pegylated interferon alpha-2b as monotherapy or in combination with ribavirin in chronic hepatitis delta. *Hepatology* 2006; 44: 713-720.
172. Castelnau C, Le Gal F, Ripault MP, Gordien E, Martinot-Peignoux M, Boyer N, et al. Efficacy of peginterferon alpha-2b in chronic hepatitis delta: relevance of quantitative RT-PCR for follow-up. *Hepatology* 2006; 44: 728-735.
173. Mirshafiee H, Mahmoodian-Shooshtari M, Sharifi Z, Hosseini SM. Genotype analysis of hepatitis delta virus from hepatitis B surface antigen-positive patients using PCR-RFLP in Tehran: *Arch Iranian Med* 2009; 12: 238-243.
174. Yurdaydın C, Idilman R, Bozkaya H, Bozdayı AM. Natural history and treatment of chronic delta hepatitis. *J Viral Hep* 2010; 17: 749-756.
175. Kiesslich D, Crispim MA, Santos C, Ferreira Fde L, Fraiji NA, Komninakis SV, Diaz RS. Influence of hepatitis B virus (HBV) genotype on the clinical course of disease in patients coinfecting with HBV and hepatitis delta virus. *J Infect Dis* 2009; 199: 1608-1611.
176. Casey JL, Brown TL, Colan EJ, Wignall FS, Gerin JL. Genotype of hepatitis D virus that occurs in northern South America. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90: 9016-9020.
177. Türkdöğän MK, Bozkurt H, Uygan İ, Tuncer İ, Irmak H, Buzgan T, et al. Chronic hepatitis delta virus infection in Van region of eastern Turkey. *Turk J Gastroenterol* 2005; 16: 17-20.

178. Dülger AC. Epidemiologic and clinical aspects of delta hepatitis in the Van region. *Van Tıp Dergisi* 2010; 17: 32-35.
179. Ramia S, El-Zaatari M, Sharara AI, Ramlawi F, Farhat B. Current prevalence of hepatitis delta virus (HDV) infection and the range of HDV genotypes in Lebanon. *Epidemiol Infect* 2007; 135: 959-962.
180. Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Hepatitis D virus genotypes in intravenous drug users in taiwan: decreasing prevalence and lack of correlation with hepatitis B Virus Genotypes. *J Clinical Microbio* 2002; 40: 3047–3049
181. Theamboonlers A, Hansurabhanon T, Verachai V, Chongsrisawat V, Poovorawan Y. Hepatitis D virus infection in Thailand: HDV genotyping by RT-PCR, RFLP and direct sequencing. *Infection* 2002; 30: 140-144.
182. Casey JL, Gerin JL. Genotype-Specific Complementation of hepatitis delta virus RNA replication by hepatitis delta antigen. *J Virol* 1998; 72: 2806-2814
183. Esmaeili R. Phylogenetic analysis of HDV Tehran Iran. *Hepatitis Monthly* 2009; 9: 196-200
184. Mohebbi SR, Zali N, Derakhshan F, Tahami A, Mashayekhi R, Amini-Bavil-Olyae S, et al. Molecular epidemiology of hepatitis delta virus (HDV) in Iran: a preliminary report. *J Med Virol* 2008; 80: 2092-2099.
185. Saady N, Sugauchi S, Tanaka Y, Suzuki S, Abdel AA, Zaid MA. Genotypes and phylogenetic characterization of hepatitis B and delta viruses in Egypt. *J Med Virol* 2003; 70: 529–536.
186. Wu JC, Chiang TY, Sheen IJ. Characterization and phylogenetic analysis of a novel hepatitis D virus strain discovered by restriction fragment length polymorphism analysis. *J Gen Virol* 1998; 79: 1105-1113.
187. Shakil AO, Hadziyannis S, Hoofnagle JH, Di Bisceglie AM, Gerin JL, Casey JL. Geographic distribution and genetic variability of hepatitis delta virus genotype I. *Virology* 1997; 234: 160–167.
188. Wu JC. Functional and clinical significance of hepatitis D virus genotype II infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006; 307: 173-186.

6. ÖZGEÇMİŞ

30 Nisan 1979 tarihinde, Elazığ'da dünyaya geldim. İlkokulu, Elazığ Bahçelievler İlkokulu'nda, ortaokulu, Elazığ Mezre Ortaokulu'nda ve lise eğitimimi Elazığ Balakgazi Lisesi'nde tamamladım. 1998 yılında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde tıp eğitimime başladım. 2004 yılında mezun oldum. 2007 yılı Temmuz ayında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda ihtisas eğitimime başladım. Halen aynı Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım. Evliyim ve biri erkek, biri kız iki çocuk annesiyim.