



**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA
TEZİ**

**KAZAKİSTAN, TÜRKİSTAN BÖLGESİNDEKİ
HEPATİT B, C VE D VİRÜSLERİNİN
MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİSİ**

SHAKHNOZA SARZHANOVA

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEMMUZ 2020



**KAZAKİSTAN, TÜRKİSTAN BÖLGESİNDEKİ HEPATİT B, C VE D
VİRÜSLERİNİN MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİSİ**

Shakhnoza SARZHANOVA

**DOKTORA TEZİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

TEMMUZ 2020

Shakhnoza SARZHANOVA tarafından hazırlanan “KAZAKİSTAN, TÜRKİSTAN BÖLGESİNDEKİ HEPATİT B, C VE D VİRÜSLERİNİN MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİSİ” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından **OY BİRLİĞİ** ile Gazi Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Gülenday BOZDAYI
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

.....

Başkan: Prof. Dr. Kayhan ÇAĞLAR
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Üye: Prof. Dr. Koray ERGÜNAY
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Üye: Prof. Dr. Işıl FİDAN
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Üye: Prof. Dr. A. Mithat BOZDAYI
Hepatoloji Enstitüsü, Ankara Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Üye: Prof. Dr. Aydın KARAARSLAN
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Tez Savunma Tarihi: 03/07/2020

Jüri üyeleri tarafından DOKTORA tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mustafa ASLAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Shakhnoza SARZHANOVA

03.07.2020

KAZAKİSTAN, TÜRKİSTAN BÖLGESİNDEKİ HEPATİT B, C VE D VİRÜSLERİNİN MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİSİ

(Doktora Tezi)

Shakhnoza SARZHANOVA

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Temmuz 2020

ÖZET

Viral hepatitler halen dünyanın her yerinde yaygın olarak görülen ve ülke ekonomisini olumsuz etkileyen önemli bir halk sağlığı sorunudur. Günümüzde testlerin artan analitik performansları, otomasyonun getirdiği hız, teşhis ve tedavi yöneteminde ciddi katkılar sağlamaktadır. Bu çalışmada Kazakistan'ın Türkistan bölgesi popülasyonundaki hepatit B, C ve D virüslerinin epidemiyolojik durumu ve moleküler profilinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmamıza toplam 881 daimi ikamet eden kişilerin serum örnekleri dahil edilmiştir. Katılımcıların 515'i (%58,4) kadın ve 366'sı (%41,6) erkek olup, yaşları 5-75 (yaş ortalaması: 34,2±17) yıl arasında değişmektedir. Tüm örnekler serolojik ve moleküler yöntemlerle incelenmiştir. Çalışmamızda anti-HBc ve HBsAg prevalansı sırasıyla %33,4 (%95 güven aralığı [CI], 30,3-36,6) ve %3,6 (%95 CI, 2,6-5,1) olarak saptanmıştır. Katılımcıların %47,4'ü (%95 CI, 44,3-50,9), anti-HBs ≥10.0 mIU/mL titresi gösterirken, %44,2'si (%95 CI, 40,9-47,5) çalışılan tüm HBV belirteçlerine karşı duyarlıydı. Anti-HCV pozitifliği ise %3 (%95 CI, 2,0-4,3) olarak tespit edilmiştir. HBsAg pozitif kişiler arasında anti-HDV prevalansı %12,5 (%95 CI, 4,4-28,7) olarak belirlenmiştir. HBV genotip D ve HDV 1'in ilgili enfeksiyonların %100'ü iken HCV genotip dağılımı 1b %60, 3a %30 ve 2c %10 olarak bulunmuştur. Sonuç olarak, aynı hastalarda yapılan mutasyonel analiz ve ilaç direnci sonucu, 1b subtipi saptanan bir hastada velpatasvir, elbasvir, ledipasvir, daclatasvire direnç ile ilişkili NS5A bölgesinde Y93C/H mutasyonu, yine bir hastada NS5B bölgesinde L159F mutasyonu ile ilişkili sofosbuvire azalmış duyarlılık gözlenmiştir. Ayrıca, I132V, M175L; A39V, Q80G, S122G, Q30R/H, H58P ve C316N aminoasit değişikliği tanımlanmıştır.

Bilim Kodu : 1039

Anahtar Kelimeler : HBV, HCV, HDV, epidemiyoloji, prevalans, genotip.

Sayfa Adedi : 146

Danışman : Prof. Dr. Gülendam BOZDAYI

MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF HEPATITIS B, C AND D VIRUSES IN KAZAKHSTAN, TURKISTAN REGION

(Ph. D. Thesis)

Shakhnoza SARZHANOVA

GAZI UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

July 2020

ABSTRACT

Viral hepatitis is still an important public health problem that is widespread throughout the world and has a negative impact on the country's economy. Currently, the increasing analytical efficiency of tests, the speed that automation brings, make a serious contribution to the method of hepatitis in diagnosis and treatment. The aim of this study is to determine the epidemiological status and molecular profile of viral hepatitis B, C and D in the population of the Turkestan region in Kazakhstan. Our study included serum samples from a total of 881 permanent residents. Of these, 515 (58,4%) participants are female, and 366 (41,6%) are male, age ranges from 5 to 75 years (mean age-standart deviation: 34,2±17). All samples were examined by serological and molecular methods. In our study, the prevalence of anti-HBc and HBsAg was 33,4% (95% confidence interval [CI], 30,3-36,6) and 3,6% (95% CI, 2,6-5,1) and 47,4% (95% CI, 44,3-50,9) of participants showed an anti-HBs titer $\geq 10,0$ mIU/mL, 44,2% (95% CI, 40,9-47,5) was sensitive to all HBV markers studied. Positivity against HCV was defined as 3% (95% CI, 2,0-4,3). The prevalence of anti-HDV among HBsAg-positive participants was determined as 12,5% (95% CI, 4,4-28,7). While the HBV d and HDV I genotype make up 100% of associated infections, the HCV genotype distribution was found as 1b 60%, 3a 30%, and 2c 10%. As a result of mutational analysis and drug resistance in the same patients, a patient with subtype 1b has reduced sensitivity to the Y93C/H mutation in the NS5A region associated with the resistance of velpatasvir, elbasvir, ledipasvir, daclatasvir and sofosbuvir associated with the L159F mutation in the NS5B region. Also I132V, M175L; changes in the amino acids A39V, Q80G, S122G, Q30R / H, H58P and C316N were detected.

Science Code : 1039

Key Words : HBV, HCV, HDV, epidemiology, prevalence, genotype.

Page Number : 146

Advisor : Prof. Gülendarm BOZDAYI, MD, PhD

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın en başından sonuna kadar planlanmasında ve gerçekleştirilmesinde emeklerini esirgemeyen, değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren, kıymetli tecrübelerinden faydalandığım başta tez danışmanım Prof. Dr. Gülendaml BOZDAYI'ya ve sayın Prof. Dr. A. Mithat BOZDAYI'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora Tezi olarak sunduğum bu çalışmayı destekleyen Ahmet Yesevi Üniversitesi (Proje kod no: 17/868) teşekkür ederim.

Değerli bilgi ve birikimlerini bizlerle paylaşan Gazi Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji ABD'nin saygıdeğer akademisyenleri Sayın Prof. Dr. Nedim SULTAN, Sayın Prof. Dr. Meltem YALINAY, Sayın Prof. Dr. Kayhan ÇAĞLAR ve Sayın Prof. Dr. Ayşe KALKANCI, Sayın Prof. Dr. Işıl FİDAN ve Sayın Prof. Dr.Funda DOĞRUMAN AL'a teşekkürü bir borç bilirim.

Türkiye'de doktora yapmama vesile olan Sayın Prof. Dr. Musa YILDIZ hocama ve tüm Ahmet Yesevi Üniversitesi Mütevelli Heyet Başkanlığı çalışanlarına ilgi ve yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Doktora yapma sürecinde birlikte çalıştığım Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı asistanları ve doktora arkadaşlarıma, laboratuvar sorumlularına ve laboratuvarında görevli tüm çalışma arkadaşlarıma minnettarım. Bununla birlikte kıymetli Burcu Çuhadar Uysal'a, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı çalışanlarına ve Blm. Uzm. Esra Yurdcu'ya, Hepatoloji Enstitüsü'ne işbirliklerinden dolayı teşekkür ederim.

Her zaman iyi dilekleri ve hayır dualarıyla bana güç veren sevgili annelerime, babama ve kardeşlerime, çalışma ortamımı hazırlayan ve her zaman destek olan eşime, minik kalpleriyle ve neşeleriyle manevi desteklerini sunan çocuklarıma çok teşekkür ederim.

Üniversitede tanıştığım, birlikte çalıştığım, beraber okuduğum ve anılar biriktirdiğim tüm arkadaşlarıma samimiyetlerinden dolayı teşekkür eder, başarılar dilerim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xii
RESİMLERİN LİSTESİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Hepatit B Virüsü.....	3
2.1.1. Tarihçe	3
2.1.2. Sınıflandırma ve virion yapısı	4
2.1.3. HBV replikasyon döngüsü	8
2.1.4. Patogenez ve immunité.....	11
2.1.5. HBV mutantları ve önemi	12
2.1.6. HBV epidemiyolojisi	15
2.1.7. Klinik	20
2.1.8. HBV'nin laboratuvar tanısı.....	23
2.1.9. Tedavi	29
2.1.10. Hepatit B'nin önlenmesi	32
2.2. Hepatit C virüsü	34
2.2.1. Tarihçe	34
2.2.2. Sınıflandırma ve virion yapısı	34

	Sayfa
2.2.3. HCV replikasyon döngüsü.....	41
2.2.4. Epidemiyoloji.....	43
2.2.5. Klinik bulgular.....	46
2.2.6. HCV tanı	47
2.2.7. Tedavi	50
2.3. Hepatit D Virüsü.....	50
2.3.1. Tarihçe	50
2.3.2. Sınıflandırma ve virüs yapısı	51
2.3.3. HDV replikasyon döngüsü.....	53
2.3.4. Epidemiyoloji.....	55
2.3.5. HDV Patogenez	58
2.3.6. Klinik	58
2.3.7. HDV tanı	59
2.3.8. Tedavi	62
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	63
3.1. Gereçler.....	63
3.1.1. Cihazlar.....	63
3.1.2. Reaktifler ve kimyasallar	63
3.1.3. Kullanılan kitler.....	64
3.2. Yöntemler	65
3.2.1. Örneklerinin toplanması, saklanması ve ulaştırılması	65
3.2.2. Serolojik yöntemler.....	65
3.2.3. Moleküler yöntemler.....	70
3.2.4. HBV, HCV ve HDV örneklerinin dizi analizleri	76
3.2.5. Filogenetik analiz	84

	Sayfa
3.2.6. İstatistiksel analiz	85
4. BULGULAR	87
4.1. HBV, HCV ve HDV Serolojik Belirteçlerin Dağılımı	87
4.2. HBV, HCV ve HDV Moleküler Epidemiyolojisi Sonuçları	91
5. TARTIŞMA	97
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	113
KAYNAKLAR	117
EKLER.....	141
EK-1. Etik Kurul Raporu	142
EK-2. Türkiye ve Kazakistan Sağlık Bakanlığında alınan izinler.....	144
ÖZGEÇMİŞ.....	146

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. HBV mutantları ve önemi.....	14
Çizelge 2.2. HBV endemisitesi düzeyleri	16
Çizelge 2.3. HBV genotiplerinin ve alt tiplerinin coğrafi dağılımı.....	18
Çizelge 2.4. HBV ve karaciğer hastalığı belirteçlerine dayalı kronik HBV enfeksiyonu olan hastaların doğal öyküsü ve değerlendirilmesi	22
Çizelge 2.5. HBV DNA için kantitatif yöntemlerin karşılaştırılması	27
Çizelge 2.6. Direkt etkili antiviraller.....	50
Çizelge 2.7. HDV epidemiyolojisinde endemik dağılım.....	57
Çizelge 3.1. HBV DNA ekstraksiyonu reaktifleri	71
Çizelge 3.2. HCV RNA ekstraksiyonu reaktifleri	71
Çizelge 3.3. HBV DNA amplifikasyon reaktifleri	72
Çizelge 3.4. HDV RNA real-time PCR’da kullanılan primer ve prob dizileri	75
Çizelge 3.5. HDV real-time PCR içeriği	75
Çizelge 3.6. HDV real-time PCR döngüleri.....	75
Çizelge 3.7. HBV 1. ve 2. tur PCR’de kullanılan primer dizileri.....	78
Çizelge 3.8. HBV 1. ve 2. tur PCR içeriği	78
Çizelge 3.9. HBV 1. ve 2. tur PCR döngüleri	78
Çizelge 3.10. HCV 1. ve 2.tur PCR’de kullanılan primer dizileri	79
Çizelge 3.11. HCV 1. ve 2.tur PCR içeriği	79
Çizelge 3.12. HCV 1 ve 2.tur PCR döngüleri.....	79

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.13. HCV parçalı genom PCR’de kullanılan primer dizileri.....	80
Çizelge 3.14. HCV 1. ve 2.tur PCR döngüleri.....	80
Çizelge 3.15. HDV RNA tüm genom PCR’de kullanılan primer dizileri.....	81
Çizelge 3.16. HDV PCR içerikleri	81
Çizelge 3.17. HDV PCR döngüleri.....	81
Çizelge 3.18. Dizi analizi PCR içerikleri.....	83
Çizelge 3.19. Termal döngü programı	84
Çizelge 4.1. Çalışmaya dahil edilen katılımcıların yaş ve cinsiyetlerine göre dağılımı	87
Çizelge 4.2. HBV, HCV ve HDV serolojik belirteçlerinin dağılımı	87
Çizelge 4.3. Çalışma popülasyonunun HBV serolojik yorumlama grupları	88
Çizelge 4.4. Cinsiyet ve yaş gruplarına göre HBV, HCV ve HDV prevalansı..	90
Çizelge 4.5. HBV, HCV ve HDV’nin serolojik ve moleküler yöntemlere göre pozitifliği	91
Çizelge 4.6. Çalışma grubunda HBV, HCV ve HDV viral yük dağılımı	92
Çizelge 4.7. Kazak izolatları arasında HCV NS3, NS5A ve NS5B bölgelerinde aminoasit değişiklikleri ve direnç mutasyonları.....	95
Çizelge 4.8. Çalışma grubunda HBV, HCV ve HDV genotip/alt genotiplerinin sıklığı	96
Çizelge 5.1. Hepatit B, C ve D virüslerinin Kazakistan, Türkiye ve çalışmamızdaki prevalansı	103

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. HBV partikül yapıları	5
Şekil 2.2. HBV genomunun şematik gösterimi.....	8
Şekil 2.3. HBV'nin replikasyon döngüsü	10
Şekil 2.4. HBV polimeraz bölgesindeki ilaca dirençli mutantlar	13
Şekil 2.5. HBV genotiplerinin dünya çapında coğrafi dağılımı.	17
Şekil 2.6. HBV enfeksiyonu boyunca patojenik olayların gösterilmesi	24
Şekil 2.7. HBV tedavi ajanları için ABD FDA onayının yılını gösteren bir zaman çizelgesi.	31
Şekil 2.8. HCV partikül yapısı	35
Şekil 2.9. HCV'nin genom organizasyonu, genom tarafından kodlanan poliprotein ve kesim bölgeleri	36
Şekil 2.10. HCV kor proteinin şematik şekli	37
Şekil 2.11. HCV E1 zarf proteininin şematik şekli.	38
Şekil 2.12. HCV E2 zarf proteininin şematik şekli	39
Şekil 2.13. NS3 proteininin şematik şekli.....	40
Şekil 2.14. HCV replikaasyon döngüsünün şematik gösterimi.....	43
Şekil 2.15. HCV genotiplerinin dünyadaki dağılımı.	46
Şekil 2.16. HDV'nin şematik gösterimi	52
Şekil 2.17. HDV genom yapısı ve organizasyonu.....	53
Şekil 2.18. HDV yaşam döngüsünün şematik gösterimi	55

Şekil	Sayfa
Şekil 2.19.HDV prevalansı ve genotipik dağılımını gösteren dünya haritası...	58
Şekil 2.20. Koenfeksiyonda HBV-HDV serolojisi	60
Şekil 2.21. Süperenfeksiyonda HBV-HDV serolojisi.	61
Şekil 4.1. HBV, HCV ve HDV serolojik belirteçlerinin cinsiyete göre dağılımı.	89
Şekil 4.2. HBV, HCV ve HDV belirteçlerinin yaşa göre dağılımı.	91
Şekil 4.3. Çalışmamızda elde edilen HBV gen dizilerinin kısmi filogenetik analizi.	93
Şekil 4.4. Çalışmamızda elde edilen HCV gen dizilerinin kısmi filogenetik analizi.	95
Şekil 4.5. Çalışmamızda elde edilen HDV gen dizilerinin filogenetik analizi. ..	96

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. HBV'nin elektron mikroskopik görüntüsü	5



SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
μ l	mikrolitre
ml	mililitre
mg	milligram
gr	gram
χ^2	ki kare
dk	dakika
sn	saniye
rpm	rounds per minute

Kısaltmalar	Açıklama
ADV	Adefovir dipivoksil
ALT	Alanin aminotransferaz
ASHV	Arctic Squirrel Hepatitis Virus
AST	Aspartat aminotransferaz
cccDNA	Covalently closed circular DNA (Kovalent bağlı kapalı sirküler DNA)
CDC	Centers for Disease Control and Prevention (Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezleri)
cDNA	Komplementer DNA
CI	Confidence interval (Güven aralığı)

Kısaltmalar	Açıklama
DNA	Deoksiribonükleik asit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (Enzim Bağlı İmmunosorbent Analizi)
ETV	Entekavir
GSHV	Ground Squirrel Hepatitis Virus
HAV	Hepatit A virüsü
HBcAg	Hepatit B kor antijeni
HBeAg	Hepatit B e (erken;early) antijeni
HBsAg	Hepatit B yüzey (surface) antijeni
HBV	Hepatit B virüsü
HCV	Hepatit C virüsü
HDV	Hepatit delta virüsü
HEV	Hepatit E virüsü
HIV	Human Immunodeficiency Virus
hNTCP	Human sodyum taurokolat kotransport polipeptide
HSK	Hepatosellüler karsinoma
HSPG	Heparin sülfat proteoglikan
KHB	Kronik HBV enfeksiyonu
KHC	Kronik HCV enfeksiyonu
LAM	Lamivudin
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
mRNA	Messenger RNA
NA	Nukleozid analogları

Kısaltmalar	Açıklama
NCBI	The National Center for Biotechnology Information
NS3	Yapısal olmayan protein 3
NS5A	Yapısal olmayan protein 5 A
NS5B	Yapısal olmayan protein 5 B
ORF	Open reading frame (Açık okuma bölgesi)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
pgRNA	pregenomik RNA
Pmol	Pikomol
RLU	Relative light units (Relatif ışık üniteleri)
RNA	Ribonükleik asit
RNA	Ribonükleik asit
RT	Reverse transcriptase (Ters transkriptaz)
TAF	Tenofovir alafenamid fumarat
TDF	Tenofovir disoproksil fumarat
WHV	Woodchuck Hepatitis Virus;
WMHBV	Woolly Monkey Hepatitis Virus

1. GİRİŞ

Viral hepatitler tüm dünyada yaygın olarak görülen ve ülke ekonomisini olumsuz etkileyen önemli bir halk sağlığı sorunudur [1]. Dünya çapındaki viral hepatitlerin başlıca nedenleri olan 5 hepatotropik virüs, 1963 ve 1989 yılları arasında keşfedilmiştir: hepatit A virüsü (HAV), hepatit B virüsü (HBV), hepatit C virüsü (HCV), hepatit delta virüsü (HDV) ve hepatit E virüsü (HEV) , primer olarak karaciğeri etkilerler [2].

Viral hepatitlere bağlı enfeksiyonlar farklı klinik seyir gösterebilir. Hepatotropik virüsler arasında, hepatit B, C ve D virüsleri kronik hepatit, siroz ve hepatoselüler karsinomaya (HSK) neden olabilir ve hepatite bağlı mortalitenin %96'sından sorumludur [3].

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) raporuna göre; 2015 yılında Dünya'da 257 milyon kronik hepatit B hastası; 71 milyon kronik hepatit C hastası olduğu tahmin edilmektedir [4]. Ayrıca her yıl yaklaşık 1,4 milyon kişi HBV ve HCV enfeksiyonuna bağlı olarak gelişen akut/kronik hepatit, karaciğer yetmezliği ve HSK gibi hastalıklar sonucu hayatını kaybetmektedir [5].

Dünya Sağlık Örgütü; ülkeleri, hepatit B enfeksiyonu taşıyıcılık oranları açısından düşük (<%2), orta (%2-8) ve yüksek (>%8) endemik bölgelere ayırmıştır. HBV'nin genel popülasyondaki prevalansı %3,5 olarak tesbit edilmiştir. En yüksek prevalansa sahip bölgeler Batı Pasifik ve Afrikadır [6].

Dünya Sağlık Örgütü; dünya nüfusunun yaklaşık %1'inin HCV ile enfekte olduğunu bildirmektedir [3]. Enfeksiyon, hepatit C virüsüne maruz kalan kişilerin %50-80'inde kalıcı hale gelir. Kronik hepatit C hastalığının prognozu oldukça değişkendir; bu durum konak ve viral faktörlere bağlıdır. Kronik HCV'li kişilerin yaklaşık %25'inde 25-30 yıllık bir sürede siroz gelişir ve son dönem karaciğer hastalığı ve hepatoselüler karsinomun komplikasyonları için bu hastalar risk altındadır [7].

Hepatit D virüsü, tek başına enfeksiyona neden olamayan, yaşam döngüsü için HBV'nin ürettiği yüzey proteinlerine gereksinim duyan, kusurlu (defektif) bir virüstür. Ayrıca HBV'den farklı zarflı virüsler (vezikülovirüs, flavivirüs ve hepakivirüs) hepatit D virüsünün in vivo yayılmasına neden olur [8]. Hepatit delta enfeksiyonu hepatit B'li

hastalarda eş zamanlı koenfeksiyon veya süper enfeksiyon olarak ortaya çıkabilir. HBV mono - enfeksiyonuna kıyasla, hepatit delta, karaciğer hastalığının siroz ve karaciğer dekompanseasyonuna daha hızlı ilerlemesi ve HSK insidansının artması ile ilişkilendirilmiştir. Hepatit D tüm dünyada görülür, ancak son yıllarda HBV'ne aşılama başlaması, sağlık ve yaşam koşullarının iyileştirilmesi HBV kontrolü, sanayileşmiş ülkelerde HDV'nin dolaşımını sürekli olarak azaltmıştır [9, 10].

Araştırmalar hepatit virüslerinin prevalansının coğrafik bölgelere göre değişiklik gösterdiğini bildirmektedir. Bununla birlikte, Kazakistan'da hepatit virüslerinin moleküler epidemiyolojisi hakkında yeterli düzeyde bilgi mevcut değildir. Igissinov ve diğerlerinin Kazakistan'da yaptıkları bir çalışmada, kan bankası verilerine göre HBV ve HCV prevalansı sırasıyla %2,1 ve %1,8 şeklinde bildirilmiştir [11]. Nurgalieva ve diğerlerinin Almatı eyaletinde 290 gönüllü ile yaptıkları bir çalışmada HBV ve HCV prevalansı sırasıyla %3,8 ve %3,2 olarak raporlanmıştır [12]. Nursultan'da Skorikova ve diğerlerinin 28 248 kan bağışçısında yaptıkları çalışmada HBV prevalansı %1,5 ve HCV prevalansı %0,87 olarak belirtilmiştir [13]. Kazakistan'da HBsAg pozitiflerde Hepatit Delta virüsünün prevalansı %1,6-15,5 arasında değiştiği bilinmektedir [14-17].

Yukarıda bahsedilen çalışmalar dışında, Türkistan bölgesine ait veri bulunmamaktadır. Bölge ile ilgili hepatit virüslerinin prevalansını ve genotip dağılımını belirlemek için Kazakistan'ın bu bölgesinde araştırma yapmaya ihtiyaç vardır. Viral hepatitin popülasyonda prevalansı ve moleküler profilinin değerlendirilmesi hepatit kontrol programının planlanması için gereklidir.

Bu çalışmada Kazakistan'ın Türkistan bölgesinde daha önce herhangi bir veri bulunmayan hepatit virüslerinin (Hepatit B, C, D) epidemiyolojisi ve moleküler profilinin, klinik açıdan önemli mutasyonlarının belirlenmesi planlanmıştır. Birikmiş bilgi havuzu, Türkistan bölgesinde sağlık politikalarının geliştirilmesinde ve gerekli önlemlerin alınmasındaki önemli bir veri kaynağı olacaktır. Türkistan bölgesinde virüs genotipleri ile ilgili veriler aynı zamanda Kazakistan'daki diğer bölgelerde virüs genotipleri için bir ipucu olacaktır. Çalışmamız oldukça kapsamlı bir araştırma olup, Türkistan bölgesinde kan yoluyla bulaşan hepatit B, C ve Delta virüslerinin dağılımı hakkında bilgi verecek ilk epidemiyolojik sonuçları içerecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hepatit B Virüsü

2.1.1. Tarihçe

Viral hepatit salgınlarına ait ilk bulgular milattan önce (M.Ö) 2000 yılında kaydedilmiştir [18]. Hepatitleri ilk defa Hipokrat M.Ö. 3'üncü yüzyılda tarif etmiş ve bulaşıcı olabileceğini düşünerek hastanın bulunduğu yerleşim yerine “karantina uygulaması” önermiştir [19]. Viral hepatitin ilk bilimsel tanımı, 1865'te ünlü patolog Rudolf Vichow tarafından yapılmış ve iltihabi sarılık anlamında “kataral ikter” olarak adlandırılmıştır. Bu sarılığın insan serumuyla geçmesi, 1885 yılında iki salgında bildirilmiştir. Parenteral yolla bulaşan hepatit formu çiçek aşısı kampanyası sonrasında gelişen “ikterus epidemisi” ile ilk kez 1885 yılında Almanya Bremen’de, Lurman tarafından tersane çalışanları arasında çıkan salgında tanımlanmıştır. Benzer bir salgın, aynı yıl Almanya'nın başka yerlerinde, Merzig'deki bir akıl hastanesindeki hastaların, çiçek hastalığına karşı aşılandığı zaman meydana gelmiştir [20]. İnsan serumu içeren sarıhumma aşısı, 1942 yılında Amerika Birleşik Devletleri Ordusunda 50 bin kişinin etkilendiği çok sayıda hepatit salgınına neden olmuştur [21]. Sonraki yıllarda sarılık salgınları tedavi amacıyla sterilize edilmemiş enjektörlerin kullanıldığı uygulamalar sonunda, diyabet ya da cinsel temasla bulaşan hastalıklar kliniğine başvuran kişiler arasında da gözlenmiştir. Sarılık salgınlarına yol açan etkenin bir virüs olduğu ise ilk kez 1940'lı yıllarda gönüllülerde yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur. MacCallum ve Bradley, 1947 yılında ilk kez enfeksiyöz hepatit için hepatit A ve serum hepatiti için hepatit B terimini kullanmıştır [22].

Blumberg ve diğerleri, 1965 yılında polimorfik serum proteinleri konusunda yapılan bir çalışma sırasında, bir Avustralya yerlisinin kanında o güne kadar tanımlanmamış yeni bir antijen varlığını belirlemiş ve Avustralya antijeni (Au Ag) olarak isimlendirmiştir. Bu araştırma ile Nobel ödülünü almıştır. Avustralya antijeninin keşfi ve HBsAg olarak tanımlanması, hepatit araştırmalarında hızlı ilerlemeye neden olmuştur [18]. Dane ve diğerleri, 1970 yılında elektron mikroskobu ile incelenen kan örneklerinde tüm hepatit B virüs parçacıklarını keşfetmiştir [23]. Bu gelişme

sonrasında HBV'nin farklı antijen ve antikorlarını tespit etmede kullanılan seroloji ve moleküler biyoloji teknikleri geliştirilmiştir. Krugman ve diğerleri, 1971 yılında ısı ile inaktive edilen HBsAg pozitif serumların immünojenik olduğunu ve aşı olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) 1972 yılında HBs antijeni için donör kanının test edilmesini gerektiren yasalar çıkarılmıştır. Hilleman ve diğerleri, 1975 yılında hepatit B aşısının testlerine başlamıştır. Viral genom klonlanarak 1979 yılında nükleotid dizisi karakterize edilmiştir [18, 24]. HBV-DNA'nın polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemiyle çoğaltılması, HBV ile ilgili araştırmalarla alınan başka bir Nobel ödülüne neden olmuştur. Yakın zamanda yapılan çalışmalarla HBV'nin moleküler biyolojisi, epidemiyolojisi, patogenezi, tanısı, tedavisi ve korunması konusunda çok önemli ilerlemeler yaşanmıştır [25].

2.1.2. Sınıflandırma ve virion yapısı

Hepadnaviridae, biyolojik özellikleri diğer hiçbir virüs ailesinde görülmediğinden kendi taksonomik gruplarını oluşturur. Konakçı ve filogenetik farklılıklara dayanarak, Hepadnavirüsler memelileri (*Orthohepadnavirüs*) ve kuşları (*Avihepadnavirüs*) enfekte eden virüslerin yer aldığı iki cins içerir. Orthohepadnavirüsler insanda (HBV), ağaçkakan (*Woodchuck Hepatitis Virüs*; WHV), yer sincabı (*Ground Squirrel Hepatitis Virüs*; GSHV), kutup sincabı (*Arctic Squirrel Hepatitis Virüs*; ASHV) ve yünlü maymunda (*Woolly Monkey Hepatitis Virüs*, WMHBV) bulunmuştur [25].

Hepatit B virüsü *Hepadnaviridae* ailesinin Orthohepadnavirüs genusunda yer alan, RNA aracılığı ile replike olan ve konak genomuna entegre olabilen, retrovirüslere benzer özellikler gösteren, küçük bir DNA virüsüdür [26]. HBV ile enfekte olmuş kişilerin serumlarında elektron mikroskopi ile üç farklı virüs partikülü gösterilmiştir: enfektif virionlar ve subviral partiküller (Resim 2.1) [27].

Dane partikülü yaklaşık 42 nm çapında, tam virion yapısında ve küresel görünümdeki enfeksiyöz partiküllerdir. Bu oluşumu 1970 yılında ilk kez bildirilen araştırmacının adı ile isimlendirirler [23]. Nükleokapsit 28 nm çapındadır ve DNA, hepatit B kor antijeni (HBcAg), hepatit B e antijeni (HBeAg) ve DNA bağımlı polimerazdan meydana gelir. Nükleokapsiti saran hepatit B yüzey antijeni (HBsAg) ve lipitten oluşan zarf bulunur. Zarf L (büyük), M (orta) ve S (küçük) olmak üzere 3 farklı yüzey (LHBs, MHBs, SHBs) glikoproteinlerinden oluşur.

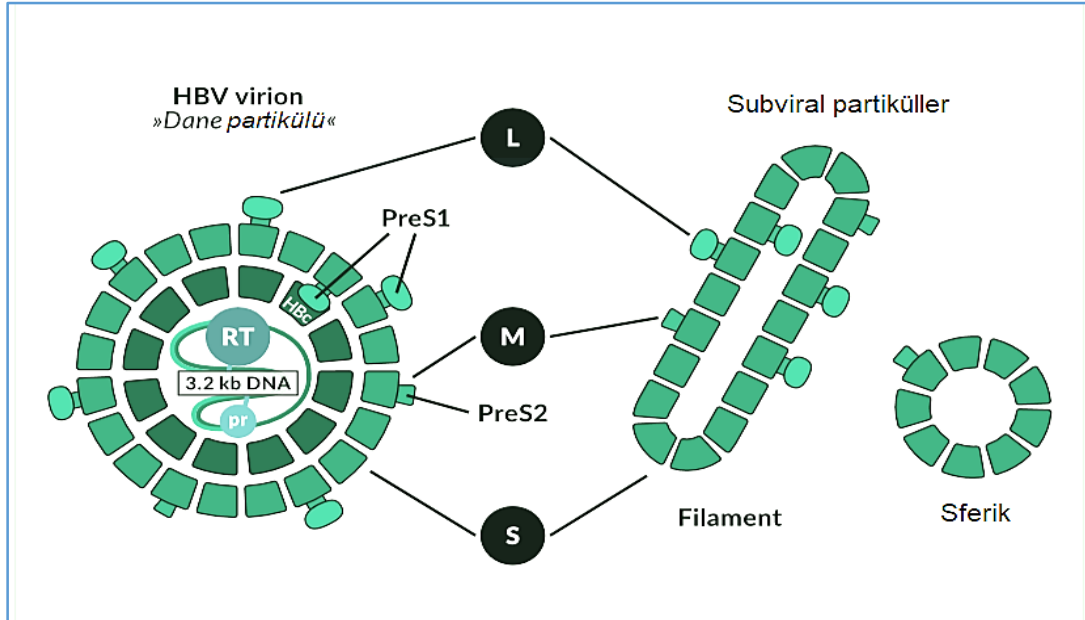
Sferik partiküller 22 nm (16-25nm) çapında, nükleik asit içermeyen, enfeksiyöz olmayan partiküllerdir. Primer olarak S proteinini, daha az miktarda M ve çok az miktarda L proteinini içerir.



Resim 2.1. HBV'nin elektron mikroskopik görüntüsü. Soldan sağa: Dane partikülü, filamentöz ve sferik partiküllerin elektron mikroskobu görünümü [27].

Filamentöz partiküller 22 nm çapında, 50-500 nm uzunlukta, enfeksiyöz olmayan partiküllerdir. Yüksek oranda L proteinine sahiptir (Şekil 2.1).

Bu partiküllerin hepsinin dış yüzeyinden HBsAg eksprese edilmektedir ve immunojeniktir. HBs antikorları ile reaksiyon verirler [18, 28].



Şekil 2.1. HBV partikül yapıları: Dane partikülü (42-47nm); Sferik partiküller 22 nm (16-25nm) çapında ve filamentöz partiküller 22 nm çapında, 50-500 nm uzunlukta [25].

Hepatit B virüsünün ikozahedral nükleokapsid yapısı; 28 nm çapında 240 viral kapsid proteinin bir araya gelmesiyle oluşmuştur ve viral genomik DNA ile DNA polimerazı paketlemektedir. Nükleokapsidin içinde, fonksiyonu henüz tanımlanmamış olan bir protein kinaz bulunur [29]. Hepatit B virüsünün genomu, yaklaşık 3200 nukleotid içeren kısmen çift sarmallı, gevşek dairesel (relaxed circular; RC) bir DNA molekülüdür [30]. Genomda viral proteinleri kodlayan uzun zincir (L veya negatif zincir) 3200 nükleotid taşımakta ve 5' ucunda terminal bir protein içermektedir. Daha kısa olan zincirin (1800-2700 nükleotid içeren, S veya pozitif zincir) uzunluğu değişkendir. Negatif ve pozitif zincirlerin uçları, viral genom üzerinde iki tam kez tekrar eden ve DR1 (direct repeat) ve DR2 olarak adlandırılan kısımları içerir. Viral DNA sentezinin başlamasında, DR1-DR2 önemli rol oynamaktadır [24]. Negatif zincir, tam viral genomu kodlar ve üst üste binen dört açık okuma bölgesini (*open reading frame*; ORF) içerir. En uzun ORF, viral polimerazı (Pol) kodlar. Açık okuma bölgeleri; Pre-S1, Pre-S2 ve S zarfı kodlamaktadır ve tamamen Pol ORF ile örtüşürken, Prekor/Kor (Pre-C/C) ve X ORF'leri kısmen örtüşmektedir. Bu ORF'ler çerçeveli bir şekilde üst üste binmektedir, bu da virüs iplikçisinin transkripsiyon sırasında yaklaşık bir buçuk kez okunduğu anlamına gelir [25, 31].

P geni, viral genomun %80'nini kapsayan en uzun okuma bölgesidir ve viral polimeraz enzimini kodlar. HBV polimeraz, enkapsidasyonda, negatif zincirin sentezinin başlangıcında, revers-transkriptaz aktivitesinde ve pregenomik RNA yıkımında sorumlu çok işlevli bir enzimdir. HBV polimeraz, 4 fonksiyonel domaine ayrılmaktadır: a) replikasyon başlangıcından sorumlu terminal protein domaini, b) görevi bilinmeyen ara domain, c) viral RNA transkripsiyonu ve replikasyonundan sorumlu ters transkriptaz domaini ve d) son olarak pregenomik RNA'yı parçalayan bir ribonükleaz H aktivitesine sahip karboksi-terminal D domaini. *Pol* geninin ürünü olan bu poliproteinin immunojenik özelliği vardır. Hastalardan alınan kan örneklerinde antipolimeraz antikorlar saptanabilir [32].

X geni, viral genomda yer alan en küçük okuma bölgesidir ve X mRNA translasyonu sonucunda HBx proteinini (HBxAg) kodlamaktadır. Yapısal olmayan X proteinini; sinyal iletimi, DNA onarımı, protein yıkım inhibisyonu ve HBV replikasyonunda rol oynar. Ayrıca, kronik enfeksiyonda HSK gelişiminden sorumlu olduğu düşünülmektedir [33, 34].

C geni, prekor ve kor olmak üzere iki bölgeye ayrılan viral kapsid yapılarını kodlayan genidir. Antijenik özellikleri farklı iki değişik protein (Hepatitis B core antigen; HBcAg ve Hepatitis B e antigen; HBeAg) sentezleme yeteneğine sahiptir. Kor antijeni, endoplazmik retikuluma girmeden konak hücre sitoplazmasında kalmaktadır ve viral DNA'ya sıkıca bağlanmaktadır. Dolayısıyla HBcAg'nine dolaşımda serbest olarak rastlanmaz. HBeAg, aktif HBV enfeksiyonu ve replikasyon için serolojik bir belirteçtir ve persistan enfeksiyonun oluşması için immuno-toleran gibi hareket edebilir [35].

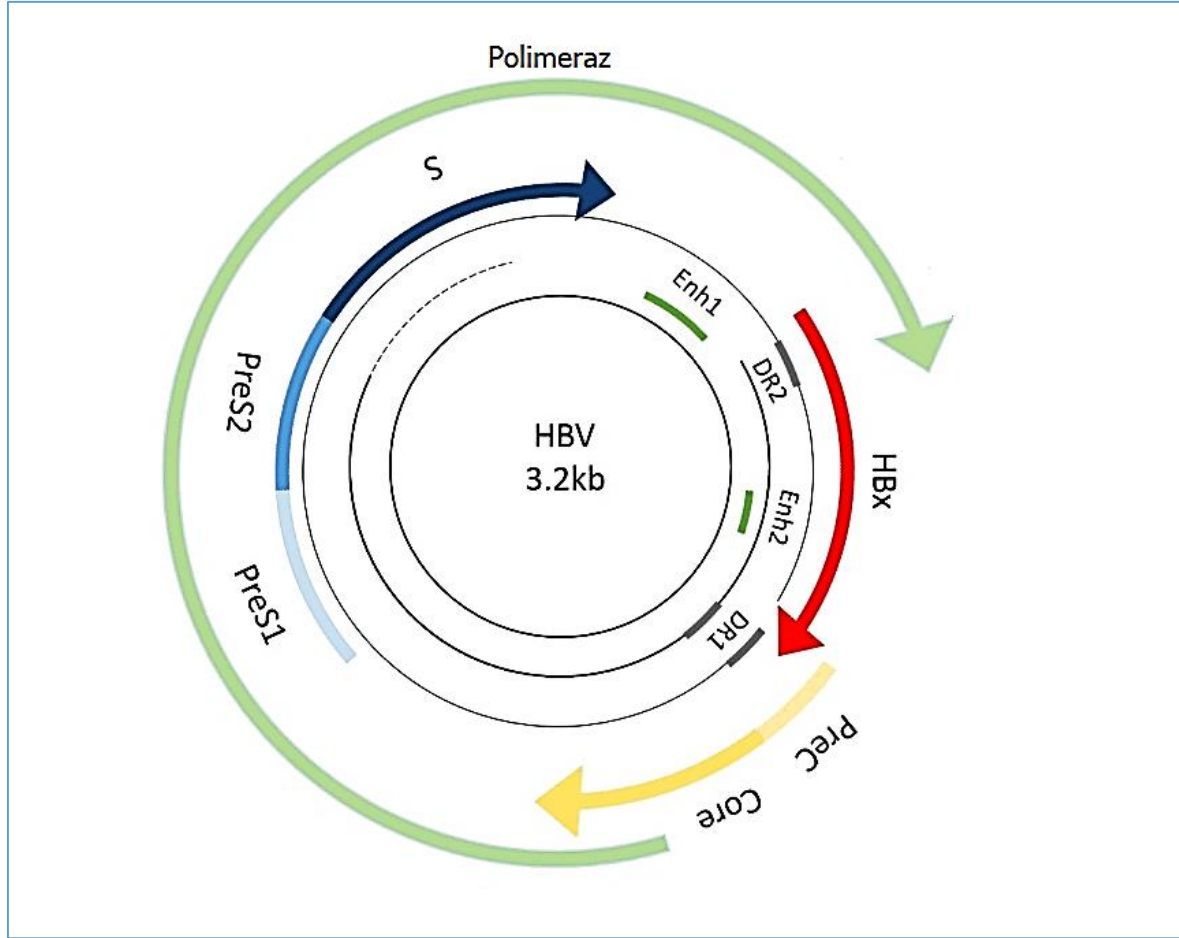
S geni, virionu çevreleyen zarf (yüzey) glikoproteini (S; HBsAg) kodlar ve preS1, preS2, S proteini olmak üzere üç kısma ayrılmıştır. S proteini: büyük (large; L), orta (middle; M) ve küçük (small; S) gibi üç formdan oluşur.

Büyük yüzey proteini (L-HBs), pre-S1, pre-S2, S'den oluşur ve enfeksiyöz virionun yüzeyinde yer alır. Önemli özellikleri: virüs-konak hücre bağlanması; Dane partikülünün yapımı ve salınması; hepatosit harabiyeti ve HSK gelişimi; korun kapsidle çevrenmesinde rol oynamaktadır.

Orta yüzey proteini (M-HBs), okumanın pre S2 bölgesinden başlaması ile oluşmaktadır. Muhtemelen hepatositlere bağlanmada ve HBV'nin hücre içerisine absorpsiyonunda görevlidir.

S proteini (S-HBsAg), esas ve en fazla eksprese edilen protein olarak bilinir. Aşılar için hedef proteindir. HBsAg'deki aminoasit farklılıklarına göre en az 5 antijenik determinant (a, d/y ve w/r) bulunduğu saptanmıştır. Bunlardan "a" antijeni bütün HBsAg pozitif hastalarda mevcut olup, ortak bir antijenik yapı (a determinantı) içermektedir. Buna karşı oluşan antikorlar HBV'nin hepatositlere bağlanmasını engeller ve tüm bütün serotiplere karşı koruyucu immünite sağlar [31, 36] .

Açık okuma bölgelerin transkripsiyonu promoter (prom=başlatıcı) ve enhancer (enh, güçlendirici) denilen düzenleyici dizinler tarafından kontrol edilmektedir [22, 32]. Hepatit B virüsünün genom yapısı Şekil 2.2'de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.2. HBV genomunun şematik gösterimi. Genom yaklaşık 3200 nükleotid uzunluğundadır ve kısmen çift sarmallı DNA'dan oluşur. Viral RNA'nın transkripsiyonunu düzenlemek için dört üst üste gelen açık okuma çerçevesi, dört destekleyici ve iki güçlendirici eleman vardır. S geni; HBsAg'yi kodlar ve üç başlangıç kodonu içeren uzun bir açık okuma çerçevesidir. Böylece, gen pre-S1, S2 ve S olarak üç bölüme ayrılır. Çekirdek (C) geni; kor ve perkor proteinleri kodlar; C bölgesinden başlarsa HBcAg, Pre-C'den başlarsa HBeAg. Polimeraz (P) geni; bütün S genini örter ve viral DNA polimerazını kodlar. Hepatit B x antijeni (HBxAg) en küçük gendir ve transkripsiyonun aktivasyonu ile ilişkilidir. Negatif-duyarlı iplikçik, viral mRNA'ya tamamlayıcıdır. DR1 ve DR2, HBV replikasyonu sırasında iplikçiğe özgü DNA sentezi için gereklidir. İki arttırıcı (Enh1 ve Enh2), bütün viral transkriptlerin ekspresyonunun düzenlenmesinde aktivite sergiler [37].

2.1.3. HBV replikasyon döngüsü

Hepatit B virüsünün temel hedefi, karaciğerin parenkimal hücreleridir. Ters transkriptaz (*reverse transcriptase*; RT) enzimini kullanarak RNA üzerinden replike

olması diğer DNA virüslerinden ayıran önemli özelliğidir [24]. Hepatit B virüsünün replikasyon döngüsü Şekil 2.3'te şematik olarak gösterilmiştir.

Replikasyonun ilk aşaması, HBV'nin duyarlı bir hepatosit üzerinde yer alan reseptöre bağlanması ve hücre sitoplazmasına nüfuz etmesidir. Çalışmalar, HBV'nin karaciğer hücre tropizmi ve türe özgüllüğünün en az iki farklı hücre faktörü katmanından kaynaklandığını göstermiştir. Enfeksiyonun başlamasındaki ilk basamak, virüs preS1'i spesifik hepatosit yüzeyinde yer alan heparin sülfat proteoglikanlarının (HSPG) düşük afinite ile geri dönüşümlü olarak bağlanması ile başlar. PreS1 bölgesinin hedef hücreye tutunmada önemli görev taşıyan epitopları içerdiği saptanmıştır. İkinci bir adım olarak, HBV virionları HSPG'den insan sodyum taurokolat kotransport polipeptide (hNTCP/SLC10A1) aktarılır ve bu da bir HBV giriş reseptörü olarak tanımlanır. Bu hNTCP sadece insan hepatositlerinde eksprese edilmektedir [38, 39]. Tutunmadan sonra hepatosit içine girişin endositoz ve füzyon ile olduğu öne sürülmüştür [40]. Kapsidin parçalanmasının hemen ardından viral DNA çekirdek porlarından içeri girer. Viral genom hücre çekirdeğinde tamir edilerek kovalent bağlı kapalı sirküler DNA (*covalently closed circular DNA*; cccDNA) formu oluşur ve epizomal olarak kalır. Hepatosit çekirdeğindeki cccDNA, konak hücre RNA polimerazları için kalıp görevi yapar ve dört tane mRNA sentez edilir. Sentezlenen viral RNA transkriptleri çekirdekten sitoplazmaya geçer ve protein sentezini başlatır. Kor proteini (HBcAg), erken protein (HBeAg) ve polimeraz proteini sentezi 3,5 kb'lik mRNA'dan; zarf proteinleri (preS-1, preS-2 ve S) 2,1/2,4 kb'lik subgenomik RNA'dan; X proteinini (HBx) ise 0,7 kb'lik RNA'dan sentezlenmektedir [22]. Prekor proteini endoplazmik retikulum (ER)'a taşınır ve HBe antijenini oluşturur. HBx hücrel transkripsiyon faktörleri ile etkileşime girer ve viral promotorların aktivitesini artırır. Yüzey proteinleri (HBsAg) de, ER'de glikozillenmekte ve membranına integre olmaktadır. Oluşan viral polimeraz pregenomik RNA (pgRNA)'nın enkapsidasyon dizisi etkileşmesi ile viral kapsid yapımı başlatılır. Ardından ters transkripsiyon ile viral DNA sentezi başlar. Burada pgRNA'dan negatif DNA zinciri sentezlenmesi viral kapsidin içinde hücre sitoplazmasında gerçekleşir. Negatif zincir sentezlenmesi sonrasında polimeraz enziminin RNaz aktivitesi ile pozitif DNA zinciri sentezlenir [41].

aktivitesinin sonlanmasıyla pozitif zincir sentezi tamamlanamaz ve bu zincirin eksik halde kalmasına neden olur. Sonuçta kısmen çift sarmallı, sirküler HBV DNA oluşur. Bu genomu içeren kor partikülü HBsAg/preS gibi kılıf proteinleriyle çevrilerek hepatosit dışına salınır [22, 42].

2.1.4. Patogenez ve immunité

Hepatit B virüsü akut veya kronik, semptomatik veya asemptomatik hastalığa neden olabilir. Bunlardan hangisinin oluşacağı, bireyin enfeksiyona karşı bağışıklık tepkisi ile belirlenir [43]. Hem viral faktörler hem de konakçı immün yanıtı, HBV enfeksiyonunun patogenezini ve klinik sonucunu etkiler [44]. Hepatit B virüsü sitopatik özellik göstermediği ve karaciğerde gelişen enflamasyonun da immün aracılı olduğu bilinmektedir. Hepatit B virüsüne karşı gelişen immün yanıt, virüsle enfekte hücreleri ortadan kaldırarak koruyucu olabildiği gibi, yıkıcı sonuçlara da neden olabilir [29]. Virüsün temizlenmesinde interferon alfa, beta, gama; Tümör Nekrozis Faktör alfa (TNF α) gibi antiviral sitokinler önemli rol oynarken, karaciğer parankim nekrozundan sitotoksik CD8+T (CTL) hücreleri ve NK hücreleri sorumludur [45]. İyileşen akut hepatit B'li kişilerde çeşitli viral antijenlere karşı (kor, polimeraz, zarf proteinleri) güçlü CTL yanıtları oluşmaktadır. Bununla birlikte akut enfeksiyonda kor ve polimeraz proteinlerine karşı CD4+ yardımcı T (Th) hücre yanıtı da oluşmaktadır. Kronik enfeksiyonu olan hastalarda ise T hücre yanıtı zayıf olduğundan virüs tam olarak elimine edilememektedir [24].

Hepatit B enfeksiyonunda, hem hücresel hem de humoral immün yanıt önemlidir. Hücresel immünite ve inflamasyon, enfekte hepatositleri ortadan kaldırarak enfeksiyonun iyileşmesini sağlar. Humoral immün yanıt da dolaşımdaki viral partikülleri temizlemekte ve virüsün yayılımını sınırlandırmaktadır [24]. Virüse karşı oluşan antikorlar, virüsün karaciğere yayılmasını engelleyerek enfeksiyonun başlamasını önleyebilir. Enfeksiyonun sonraki aşamalarında, serumdaki büyük miktarda HBsAg, nötralizan antikorlara bağlanarak ve etkilerini bloke ederek, antikorların enfeksiyonu önleme kabiliyetini sınırlar. Hepatit B yüzey antijeni ve anti-HBs arasında oluşan immün kompleksler, vaskülit, artralji, döküntü ve böbrek hasarı gibi sorunlara yol açan aşırı duyarlılık reaksiyonlarının (tip III) gelişimine katkıda bulunur.

Hepati B kor ve e antijenlere karşı antikorlar serumda bulunur, fakat koruyucu değildir. HBsAg gibi HBeAg proteini serum içine salınır ve üretildiği sürece anti-HBe bu antijene bağlanacağından saptanamaz düzeylerde [43].

2.1.5. HBV mutantları ve önemi

Hepatit B virüsü viral polimerazın hata yapma sıklığının yüksek olması yalnızca farklı genotiplerin ortaya çıkmasına değil, klinik açıdan önemli olan bazı mutasyonlara sahip viral varyantların da ortaya çıkmasını sağlamıştır. Hepatit B virüsünün nükleotid değişim hızı $1.4 \text{ ila } 3.2 \times 10^{-5}$ nükleotid/yıl olarak hesaplanmıştır [30, 46].

Doğal olarak oluşan HBV mutasyonları,

- Virüsün antijenik yapısını değiştirerek bağışık yanıttan kaçmasına neden olabilir.
- Virüsün hücreye bağlanmasını ve girişini kolaylaştırabilir.
- Antiviral ilaçlara direnç gelişimine neden olabilir.
- Aşılamada başarısızlıklara neden olabilir.
- Artan HBV replikasyonu düzeyleri ile virülansı artırarak temel ve klinik öneme sahip olabilir [47].

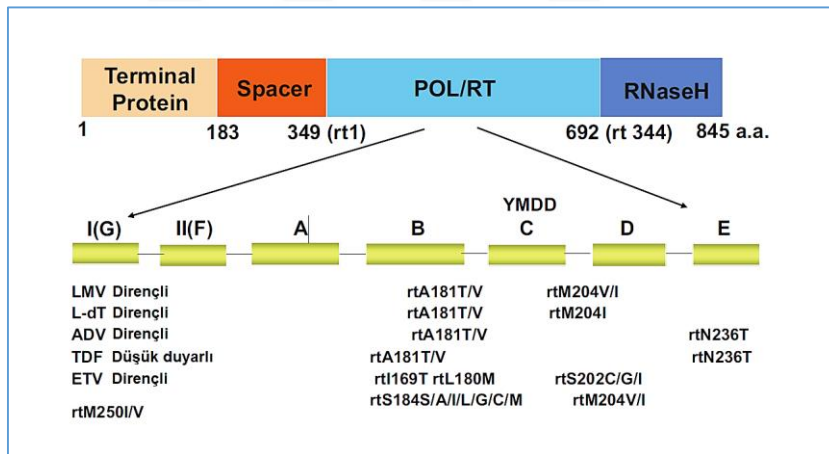
HBV genomunda çeşitli mutasyonlar tanımlanmıştır. Bunlar içinde özellikle yüzey mutasyonları, prekor ve kor promoter mutasyonları, polimeraz mutasyonlarıdır [48].

Yüzey geni mutasyonları:

Hepatit B yüzey antijeni (HBsAg), küçük (SHB'ler), orta (MHB'ler) ve büyük (LHB'ler) proteinleri içerir, her protein yüksek oranda immünojenetiktir ve hepsi enfeksiyon ve virion oluşumunda önemli rol oynar. HBsAg pre-S1, konak hücre reseptörüne bağlanma ve nötralize edici antikor bağlanma ile ilgilidir. Antikorlar, ağırlıklı olarak 99-170 amino asit pozisyonunda bulunan, "a-determinant" olarak bilinen ana HBsAg proteininin hidrofilik bölgesini hedefler. Bu nedenle, "a-determinant" mutasyonlar HBsAg antijenitesini etkileyebilir, aşı kaçışına, tanısal HBsAg saptama analizleri ve hepatit B immünoglobulin tedavisi başarısızlıkları ile yanlış negatif sonuçlara yol açabilir [49].

Polimeraz bölgesi mutasyonları:

Hepatit B virüsü polimeraz bölgesi genomun yaklaşık %80'nini oluşturan virüsün en uzun gen bölgesidir. Polimerazın aktif bölgesi revers transkriptaz C alanındaki tirozin-metionin-aspartat-aspartat (YMDD) motifi denilen korunmuş bölgedir ve S proteinin "a" determinantı ile aynı bölgede yer almıştır. Polimeraz bölgesindeki mutasyonlar, nukleozid analogları (NA) ve interferonlarla uzun süren KHB tedavisi sırasında oluşmaktadır. En iyi bilinen HBV mutantları lamivudine (LAM) dirençli olanlardır ve bunlar HIV suşları ile aynı mutasyona sahiptirler [50]. Adefovir direnç mutantları olan N236T ve/veya A181V sırasıyla viral polimerazın D ve B alanlarında yerleşir. Adefovir direnci LAM direncinden daha az görülmektedir. İki yıllık tedavi boyunca %2 oranında gelişmektedir. Entekavir direncine yol açan mutasyonlar; B domainindeki T184G, C domainindeki S202I ve D domainindeki M250V'dir [51]. Telbivudin direnci, viral polimerazın M204I mutasyonu ile ilişkilidir [52]. Lamivudin ve tenofovir alan HIV-HBV ile enfekte olmuş hastalarda tenofovire karşı iki direnç saptanmıştır. Bu hastalarda lamivudin direnç mutasyonlarına ek olarak bir de A194T mutasyonu bulunmuştur (Şekil 2.4) [53].



Şekil 2.4. HBV polimeraz bölgesindeki ilaca dirençli mutantlar. Polimerazın dört alanı belirtilmiştir ve Pol/RT alanı, iyi korunan alt alanları göstermek için genişletilmiştir. Lamivudin (LMV), Telbivudin (L-dT), Adefovir (ADV), Tenofovir (TDF) ve Entecavir (ETV) direnci ile ilişkili mutasyonlar belirtilmiştir [54].

Prekor/kor geni mutasyonları:

Hepatit B virüsünün e antijen ekspresyonunu etkileyen iki tür mutasyon saptanmıştır. Bunlardan ilki prekor bölgesinde 1896. nükleotidde izlenen G-A dönüşümü, TGA stop kodonu oluşturarak HBeAg üretiminin durdurulmasına, ancak kor proteini üretiminin devam etmesine yol açar [24]. Prekor mutantları klinik sonuçları ve karaciğer hasarının şiddetini etkileyebilir. Diğer bir mutasyon grubu bazal kor promotor (BKP) mutasyonları, prekor/kor RNA'larının transkripsiyonunda azalma şeklinde görülmektedir. Bazal kor promotor bölgesinde A1762T veya G1764A mutasyonları, tek ya da prekor mutasyonları ile birlikte görülebilirler. Bu mutasyonların ikisi birlikte olduğunda HBeAg sentezinde azalmaya ve viral yükte artışa neden olmaktadır [55].

X geni mutasyonları:

Hepatit B virüsünün X proteini (HBx), HSK ile ilgili virüs replikasyonunu uyararak veya konakçı gen ekspresyonunu değiştirerek HBV biyolojisine ve patogeneze katkıda bulunan çok işlevli yapısal olmayan bir proteindir [56]. HBx mutasyonları sadece ORF'yi değil, aynı zamanda örtüşen diğer bölgeleri de etkileyebilir. Klinik şiddete bağlı tüm HBx mutasyonları göz önüne alındığında, A1762T/G1764A BKP mutasyonu, en sık karşılaşılan HBx mutasyonlarından biridir ve HBV enfeksiyonları olan kronik hastalarda karaciğer hastalığı ilerlemesinde önemli bir rol oynar. Ayrıca, EnhII / BKP bölgesindeki T1753V (I127L, T, N, S) ve C1653T (H94Y) mutasyonlarını indükleyerek HSK gelişimine neden olmaktadır [57].

Hepatit B virüs genomunun farklı bölgelerinde tespit edilen ve klinik açıdan önemli olan mutasyonlar Çizelge 2.1'de değerlendirilmiştir.

Çizelge 2.1. HBV mutantları ve önemi [58-60]

HBV genomik bölge	Mutasyon	Klinik önemi
Prekor	G1896A, G1899A, A2149C/T, C1913A, C1914T, A2149C/T, A2188T/C, C2198A, C2444A/T	HBeAg negatif mutantlar, hastalığın daha ağır formu, siroz, HSK
Bazal kor promotor	C1653T, A1753T, T1267A, T1764C, C1766T, A1762T, T1753V	Hastalığın hızlı ilerlemesi ve HSK, fulminan hepatit
X geni	K130M, V131I, A10R/S144R çift mutasyonu,	HSK gelişimi

Çizelge 2.1. (devam) HBV mutantları ve önemi

Pre-S	T207A, T126A, Q129H,	Potansiyel olarak HSK gelişimi ile ilişkili
S geni	T207A, T126A, Q129H, M133L, T143M, D144H/A, G145R/A	Hastalığın hızlı seyri, aşından kaçış mutasyonları
Polimeraz	L180M, A181S/I/T, T184L/F/A/M/S/I/C/G, N236T/D, M250V, rtA181T / sW172X	Antiviral direnç

2.1.6. HBV epidemiyolojisi

Dünya Sağlık Örgütü, 2015 yılında 257 milyon kişinin veya nüfusun %3,5'inin kronik HBV enfeksiyonu ile yaşadığını tahmin etmiştir ve her yıl yaklaşık 620,000 enfekte kişi HBV'nin neden olduğu akut/kronik hastalık, karaciğer yetmezliği, siroz ya da HSK gibi geç komplikasyonlar nedeniyle kaybedilmektedir [4]. Birçok ülkede etkin aşılama programlarının uygulanmasıyla akut HBV enfeksiyonlarının insidansında azalma olmasına rağmen, henüz rutin aşılama programına ulaşamayan ülkelerin varlığı ve yaş nedeniyle aşılama programının dışında kalmış olan kitlelerde HBV morbidite ve mortalitenin nedeni olmaya devam etmektedir [61].

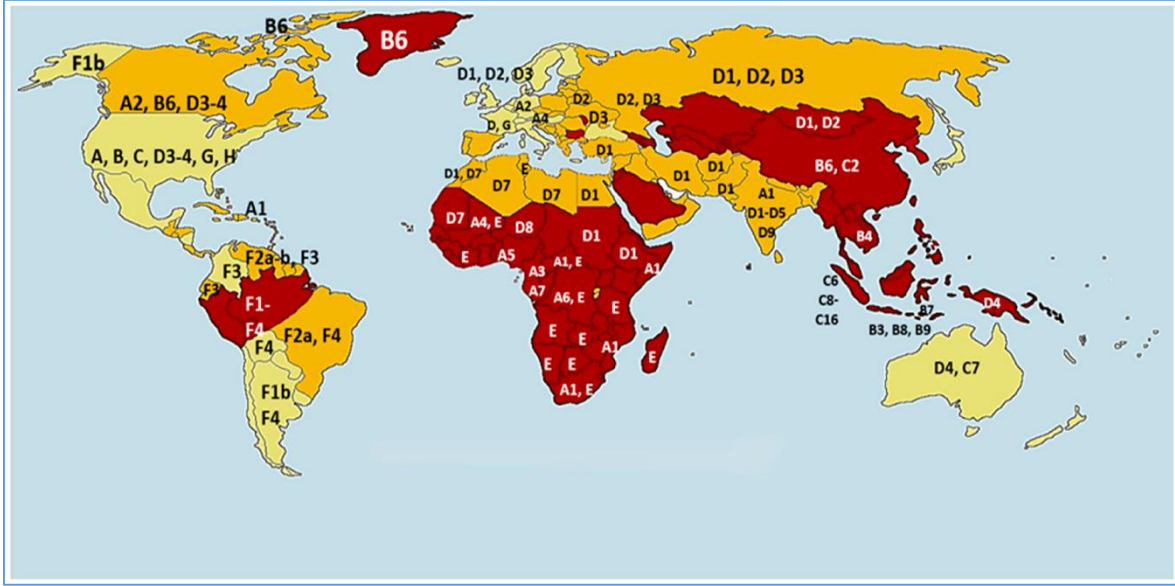
Hepatit B virüsünün dünyada görülme sıklığı bölgesel farklılıklar göstermektedir ve dünya ülkeleri: yüksek, orta, düşük endemisite bölgeleri olarak üç gruba ayrılmıştır [62] (Çizelge 2.2). Endemisite oranlarındaki farklılık çoğu kez enfeksiyonun bulaş şekli ve kazanım yaşıyla da ilişkilidir. Maruz kaldıktan sonra kronik enfeksiyon riski, bebeklerde yaklaşık %90, küçük çocuklarda %50 ve yetişkinlerde %5 arasında değişir. Yaş ilerledikçe kronikleşme riski azalır [61].

Kazakistan'da farklı coğrafik bölgelerde farklı prevalans oranları saptanmış olup; 2015 yılında nüfusun %3'ten fazlası (yaklaşık 514 380 kişi) HBV ile enfekte olduğu bildirilmiştir [63]. Ancak etkili bir raporlama sisteminin bulunmaması nedeniyle, Kazakistan'daki gerçek hasta sayısı önemli derecede yüksek olabilir. Hepatit B virüsünün genel nüfusta tahmin edilen prevalansı, Kazakistan'ın farklı bölgelerinde yaklaşık %1,5 - %6 arasında değişmektedir [11-17].

Çizelge 2.2. HBV endemisitesi düzeyleri

Emdemisite çeşitleri	HBsAg prevalansı	Enfeksiyon modu	Coğrafi dağılımı
Yüksek	>%8	Perinatal geçiş	Orta Asya (Kazakistan), Güney Asya, Sahraaltı Afrika ve Amazon bölgeleri
Orta	%2-7	Perinatal ve yatay geçiş	Orta Doğu, Doğu Avrupa, Akdeniz havzası
Düşük	<%2	Yatay geçiş	Amerika Birleşik Devletleri, Kuzey Avrupa, Avustralya, Yeni Zelanda

Hepatit B virüsünün genotip sınıflandırması, tüm genomun filogenetik analizine dayanmaktadır [35]. En az 10 HBV genotipi (A'dan J'ye) tanımlanmıştır. Genotipler, genom boyunca %4-8'lik bir dizi sapmasıyla birbirlerinden farklı alt genotiplere de ayrılabilir ve neredeyse kırk alt genotip vardır [64]. A, D ve F genotipleri çeşitli alt genotiplere bölünmüştür; E, G ve H genotipleri için alt genotip tanımlanmamıştır. Ana genotipler coğrafi dağılımlara göre değişir (Şekil 2.5). Genotip A, Sahra altı Afrika, Kuzey Avrupa ve Batı Afrika'da yaygındır; genotip B ve C Asya'da yaygındır; genotip C, öncelikle Güneydoğu Asya'da gözlenir; genotip D, Afrika, Avrupa, Akdeniz ülkeleri ve Hindistan'da baskındır; genotip G Fransa, Almanya ve Amerika Birleşik Devletleri'nde rapor edilmiştir; genotip H yaygın olarak Orta ve Güney Amerika'da görülür. Genotip I son zamanlarda Vietnam ve Laos'ta rapor edilmiştir. En yeni HBV genotipi, genotip J, Japonya'daki Ryukyu Adaları'nda tanımlanmıştır [65].



Şekil 2.5. HBV genotiplerinin dünya çapında coğrafi dağılımı. HBV'nin farklı global ve epidemiyolojik dağılımlara sahip on tane genotipi vardır. Kırmızı renk, yüksek HBV prevalansına sahip ülkeleri, turuncu, orta HBV prevalansına sahip ülkeleri ve sarı, HBV prevalansının düşük olduğu ülkeleri temsil eder [37].

Hepatit B virüsü genotiplerinin coğrafik dağılımı maruz kalma yolu ile ilişkili olabilir. Örneğin, B ve C genotipleri, viral transmisyonunda önemli bir rol oynayan perinatal veya vertikal maruz kalmanın yüksek endemik bölgelerinde daha yaygındır. Genotip A ve D'nin baskın olduğu, HBV prevalansının düşük olduğu Avrupa ülkelerinde (prevalans oranı $< 2\%$), cinsel geçiş ve güvenli olmayan enjeksiyon uygulamaları HBV geçişinin ana geçiş yoludur [66]. Birçok çalışmada HBV'nin genomik değişkenliğinin, karaciğer hasarı ve interferon tedavisine yanıt arasında ciddi bir ilişki bulunduğu saptanmıştır. Örneğin, genotip C, daha ciddi hastalık sonuçları ile ilişkili iken, genotip B interferon tedavisine genotip C'ye göre daha yüksek oranlarda yanıt vermektedir [29, 35]. HBsAg antijenik determinantlarını ve HBV genotip subgruplarını ifade etmek için subtip ve serotip terimleri kullanılmaktadır. Viral zarf glikoproteinlerinin antijenik farklılıklarına göre en az 4 serolojik serotip bildirilmiştir. Tüm HBV kökenlerinde immünodominant olan ve nötralizan antikor yapımını indükleyen "a" determinantını içerir, ek olarak iki determinant daha tanımlanmıştır. Bunlar *d/y* özgüllüğünde olan 122. aminoasit ve *w/r* özgüllüğünde olan 160. amino asittir. Buna göre 4 major (*adw*, *ayw*, *adr*, *ayr*) ve 9 minör (*ayw1*, *ayw2*, *ayw3*, *ayw4*,

ayr, *adw2*, *adw4*, *adrq-* ve *adrq+*) HBsAg serotipi saptanmıştır. Serotipler enfeksiyon kaynağının belirlenmesi açısından önem taşımaktadır [24, 67]. HBV genotip ve serotiplerinin coğrafik dağılımı Çizelge 2.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 2.3. HBV genotiplerinin ve alt tiplerinin coğrafi dağılımı [32]

Genotip	Alt tipler	Serotip	Dünyada Dağılımı
A	A1	<i>adw2/ayw2</i>	Sahra Altı Afrika, Hindistan, Brezilya, Arjantin
	A2	<i>adw2</i>	Avrupa, Amerika Birleşik Devletleri, Kuzey Kutbu, Avustralya
	A3	<i>ayw1</i>	Batı Afrika
	A4	<i>ayw1</i>	Afrika
B	B1	<i>adw2</i>	Japonya
	B2-5	<i>ayw1/adw2</i>	Doğu Asya
	B6	<i>adw2</i>	Alaska, Kuzey Kanada, Grönland
C	C1-5	<i>adr</i>	Çin, Kore, Güneydoğu Asya, Japonya, Güney Pasifik Adaları, Avustralya
	C1-5	<i>adr</i>	Çin, Kore, Güneydoğu Asya, Japonya, Güney Pasifik Adaları, Avustralya
D	D1-4	<i>ayw2/ayw3</i>	Rusya, Ortadoğu, Akdeniz, Moğolistan, Kuzey Afrika, Avrupa, Hindistan, Kuzey Kutbu, Güney Amerika, Asya
E	E	<i>ayw4</i>	Batı ve Orta Afrika, Suudi Arabistan
F	F1	<i>adw4</i>	Alaska, Orta Amerika, Güney Amerika, Bolivya
	F2	<i>adw4</i>	Orta Amerika, Amazon Bölgeleri
	F3-4	<i>adw4</i>	Arjantin
G	G	<i>adw2</i>	Fransa, Almanya ve Amerika Birleşik Devletleri
H	H	<i>ayw4</i>	Orta Amerika, Amazon Bölgeleri
I	I	<i>adw2/ayw2</i>	Vietnam ve Laos
J	J		Japonya

HBV, enfekte vücut salgılarıyla insandan insana bulaşır. Bulaşmadan sorumlu en önemli materyal kan ve kan ürünleridir. Ancak tükürük ve semen gibi diğer vücut sıvılarıyla bulaşma da söz konusudur.

HBV'nun 4 ana bulaşma paterni vardır:

- Perinatal (enfekte anneden yenidoğana geçiş).
- Cinsel temas.
- Horizontal (enfekte kişilerle temas).
- Parenteral (perkütan) yol.

Farklı coğrafi bölgelerde bulaşma yollarının baskınlığında önemli farklılık vardır. Örneğin, Batı Avrupa gibi düşük prevalanslı bölgelerde, çoğunlukla korunmasız cinsel ilişki ve intravenöz ilaç kullanımı baskın bulaşma şeklidir. Perinatal bulaşma yolu, Sahra altı Afrika gibi yüksek epidemik bölgelerde karşımıza çıkar. Yatay geçiş, özellikle erken çocukluk döneminde, orta yaygınlık alanlarındaki ana geçiş yolu olarak kabul edilir [68].

Perinatal bulaşma

Hepatit B virüsü, enfekte anneden yenidoğana geçişte üç olası yol vardır. Birinci yolu HBV'nin uterus içinde transplasental geçişi, ikincisi doğum esnasında perinatal geçiş, son yol ise bakım ya da süt verme sırasında postnatal geçiştir. İntrauterin enfeksiyon oranı nadirdir (%5-10). Perinatal bulaşmanın en önemli özelliği, enfekte olan bebekte immatür immün sistem nedeniyle enfeksiyonun kronikleşme oranının %90 gibi çok yüksek düzeylere ulaşmasıdır. Perinatal bulaşmanın önlenmesinde doğum sonrasında aktif ve pasif immünizasyonun birlikte uygulanması iyi bilinen efektif korunma yoludur [69, 70].

Cinsel yolla bulaşma

Hepatit B virüsünün diğer bir yoldan bulaşı cinsel temasdır [71]. Semen ve genital sekresyonlar kandan daha az miktarlarda virüs içermelerine rağmen bulaşmaya neden olmaktadır. Aşılanmamış kişilerde HBV cinsel iletimi büyük ölçüde birden fazla seks partneri olan veya seks işçileriyle temas eden heteroseksüel erkekler veya kadınlar, ya da erkeklerle seks yapan erkekler (homoseksüel) arasında gerçekleşir [72]. Düşük prevalanslı bölgelerde cinsel geçiş, bulaşmaların ana yoludur. Amerika Birleşik Devletleri'ndeki yeni HBV enfeksiyonlarının yaklaşık %40'ı heteroseksüel ilişki yoluyla bulaşır ve %25'inden homoseksüel ilişki sorumlu tutulmuştur [73]. Almanya'da 2018'de HBV enfeksiyonlarının %27'sinin cinsel ilişkiden kaynaklandığını, %58'ini heteroseksüel temasla, %42'sinin ise homoseksüel ilişki ile bulaştığı bildirilmiştir [74]. HBV bulaşını önleyici tedbirler, aşılama ve güvenli cinsel ilişki, yani kondom kullanımı gibi uygulamalar önerilmektedir [32].

Perkütan bulaşma

Virüsün en önemli bulaş yolu perkütan yoldur. Kan ve kan ürünlerinin transfüzyonu, damar içi ilaç bağımlıları, hemodiyaliz, endoskopi, akapunktur işlemi, dövme, manikür/pedikür, sağlık bakım uygulamaları gibi yollar bu tip bulaşın en önemli örnekleridir. Kan merkezlerinde HBsAg taraması ile bu yolla bulaş azalmıştır, ancak HBsAg negatif enfeksiyöz HBV taşıyıcıların varlığı nedeniyle kan transfüzyonu ile bulaş tamamen ortadan kaldırılamamıştır [32, 72].

Horizontal bulaşma

Perinatal, perkütan veya cinsel temasın gösterilmediği durumlarda ortaya çıkan bulaşma, horizontal bulaşma olarak tanımlanır. Çocuklar, cilt veya mukoza zarlarındaki küçük kırılmalar yoluyla yatay geçiş yoluyla HBV enfeksiyonunu kazanabilir veya diğer çocuklarla yakın temasta bulunabilirler. Aile içinde kullanılan kontamine havlu, diş fırçası, tıraş makinesi, banyo malzemeleri, hatta oyuncaklarla bile bulaşma olabildiği bildirilmiştir. Bu durumda HBV'nin uzun süre insan vücudunun dışında yaşamaya devam etmesi ve çevrede en az 7 gün bulaşıcı olması rol oynamaktadır [68, 72].

2.1.7. Klinik

Hepatit B enfeksiyonu, asemptomatik enfeksiyondan fulminant hepatite, inaktif taşıyıcılıktan karaciğer sirozu ve karaciğer kanserine kadar yol açan farklı klinik seyir göstermektedir. Ekstrahepatik belirtiler hem akut hem de kronik enfeksiyonda ortaya çıkabilir [72].

Akut enfeksiyon

Hepatit B virüsüne maruziyeti sonrası inkubasyon dönemi 60-150 gündür. Akut HBV enfeksiyonunun klinik seyri hastanın yaşına ve immün durumuna bağlı olarak büyük ölçüde değişir. Bebekler, 5 yaşından küçük çocuklar ve immünsüpresif yetişkinler çoğu durumda tamamen asemptomatiktir. Akut HBV enfeksiyonu bu kişilerde sıklıkla tanınmaz. Hastaların çoğunda akut HBV enfeksiyonunun semptomları spesifik değil, sinsiz ve kısa sürelidir. En sık görülen semptomlar anoreksi, halsizlik, bulantı, kusma ve karın ağrısıdır ve bunlar yalnızca 1 ile 5 gün sürebilir. Bu belirtiler hafifse, hasta tıbbi yardım istemezse veya karaciğer transaminazları bu belirtiler için

tıbbi bir değerlendirme sırasında test edilmezse, akut HBV enfeksiyonunun teşhisi kolayca gözden kaçırılabilir. Bu tür bireyler, HBV veya kronik hastalığa önceden maruz kalmanın serolojik kanıtlarına sahip olduktan yıllar sonra bulunabilir [32, 75]. Akut HBV enfeksiyonunun ikterik evresi sarılık başlangıcı ile oluşur. Akut HBV'li gençlerin ve yetişkinlerin yaklaşık %30 ile %50'si sarılık geliştirir. Buna karşılık, sarılık bebeklerde ve küçük çocuklarda nadiren görülür. Sarılık hafif veya belirgin olabilir ve bu HBV'ye yönelik konak immün yanıtının ciddiyetine bağlıdır [76]. Akut HBV enfeksiyonunda serum karaciğer transaminazları 1000 IU/L veya daha büyük düzeylere kadar çıkabilmektedir; tipik olarak alanin aminotransferaz (ALT) ve aspartat aminotransferazdan (AST) daha yüksektir. Prognozu belirlemede protrombin zamanı (PT) önemli belirteçtir. Yüksek PT düzeyleri karaciğer yetmezliğini göstermektedir [77]. İlk başta anti-HBc immünglobülin (Ig) M pozitifleşmekte ve bunu takiben kısa bir süre sonra IgG sınıfı antikorlar da ortaya çıkmakta ve genellikle hayat boyu saptanabilir düzeylerde kalmaktadırlar. Aynı anda serumda HBsAg ve HBV DNA da bulunmaktadır. HBV DNA, HBsAg, HBeAg ve anti-HBc IgM kayıp olması; anti-HBs, anti-HBe antikorlarının gelişimi bağışıklığı göstermektedir [78].

Kronik enfeksiyon

Altı aydan uzun süreli HBsAg pozitifliği, kronik HBV enfeksiyonunun işaretidir. Kronik HBV enfeksiyonunun gelişimi, bireyin enfekte olduğu yaşla ters orantılıdır. Virüs bulaşmış bebeklerin %90'ına kadar kronik enfeksiyon, ancak enfekte yetişkinlerin %5'inden daha azında kronik enfeksiyon gelişmektedir. Kronik HBV enfeksiyonu olan kişilerde karaciğer sirozu (%25) ve kanser (%5) dahil olmak üzere yüksek komplikasyon riski vardır [79].

Kronik HBV enfeksiyonun doğal öyküsü, HBeAg, HBV DNA seviyeleri, serum ALT konsantrasyonları ve karaciğer iltihabının varlığı ve yokluğu dikkate alınarak 5 faza ayrılmıştır (Çizelge 2.4). Bu fazların seyri karışıktır, sırayla olmayabilir, bir hastada her faz görülmeyebilir, fazlar arasındaki geçiş süreleri her hastada farklı olabilir [80].

Çizelge 2.4. HBV ve karaciğer hastalığı belirteçlerine dayalı kronik HBV enfeksiyonu olan hastaların doğal öyküsü ve değerlendirilmesi [80]

	HBeAg Pozitif		HBeAg Negatif	
	Kronik Enfeksiyon	Kronik Hepatit	Kronik Enfeksiyon	Kronik Hepatit
HBsAg	Yüksek	Yüksek/orta	Düşük	Orta
HBeAg	Pozitif	Pozitif	Negatif	Negatif
HBV DNA	>10 ⁷ IU/ml	10 ⁴ -10 ⁷ IU/ml	<2000 IU/ml	>2000 IU/ml
ALT	Normal	Yüksek	Normal	Yüksek
Nekroinflamatuvar aktivite	Yok/minimal	Orta/ciddi	Yok	Orta/ciddi
Eski terminoloji	İmmün toleran	İmmün reaktif	İnaktif taşıyıcı	HBe negatif kronik hepatit

İmmün toleran faz

HBeAg-pozitif kronik HBV enfeksiyonu. Genellikle hastalığın perinatal bulaşmayla başladığı ya da erken çocukluk çağında alan olgularda görülmektedir. Organizmanın virüsa karşı gösterdiği immün tolerans HBeAg ve HBV DNA'nın yüksek düzeylerde bulunmasına olanak sağlar. Ancak immün yanıt mekanizmasına bağlı karaciğer hasarı gelişmediğinden, hastalığın biyokimyasal bulguları (ALT, AST) ve karaciğer biyopsisi normal seviyelerde bulunur. Bu aşamada spontan HBeAg negatifleşmesi nadirdir. Bu hastalar yüksek HBV DNA nedeniyle oldukça bulaşıcıdır [80, 81].

İmmün klirens faz

HBeAg pozitif kronik hepatit B ile karakterizedir. Bu dönemde, virüse karşı gösterilen immün yanıtın ortaya çıkmasıyla hepatosit nekroinflamasyonu başlamıştır. HBeAg pozitifdir, HBV DNA immüntoleran döneme göre azalmış olmakla birlikte yüksektir. ALT, immün yanıt ile hepatosit lizisi olduğundan dönemsel alevlenmeler göstermektedir. KC'de aktif inflamasyon vardır ve fibrozise gidiş hızlanmıştır [82].

İnaktif HBV taşıyıcılığı

HBeAg negatif kronik HBV enfeksiyonu. İnfeksiyonun immünolojik kontrolünün sağlandığı bu dönemde, HBeAg negatif, anti-HBe pozitif, HBV DNA düşük pozitif (<2000 IU/ml) veya negatif düzeyde, sürekli normal ALT düzeylerinde karaciğer histopatolojisinde hasar yok ya da minimaldir. Bu dönemdeki hastaların uzun süreli prognozu genellikle iyi seyirlidir. Ancak zamanla HBsAg'nin negatifleşmesi ve anti-

HBs pozitifliği gözlenebileceği gibi, hastalığın yeniden aktif formlara geçmesi de mümkündür [80, 81].

HBeAg negatif kronik hepatit B (Reaktivasyon dönemi)

İnaktif döneme geçen hastaların büyük bir kısmı inaktif taşıyıcı olarak ömür boyu kalırken, diğer bir kısmında viral replikasyonun yeniden başlamasıyla HBeAg negatif kronik B hepatiti gelişmektedir. Hepatit B virüs reaktivasyonu (HBVr) kendiliğinden ya da immunsupresif tedavi alanlarda olabilir. Bu dönemde HBV DNA düzeyleri önceki iki dönemden (immun tolerans dönemi ve immun klirens dönemi) daha düşüktür. Serum ALT düzeylerinde dalgalanmalar gösterilmektedir. Hepatit B virüs reaktivasyonu, vakaların %4-60'ında ölümcül sonuçlara yol açabilir [83].

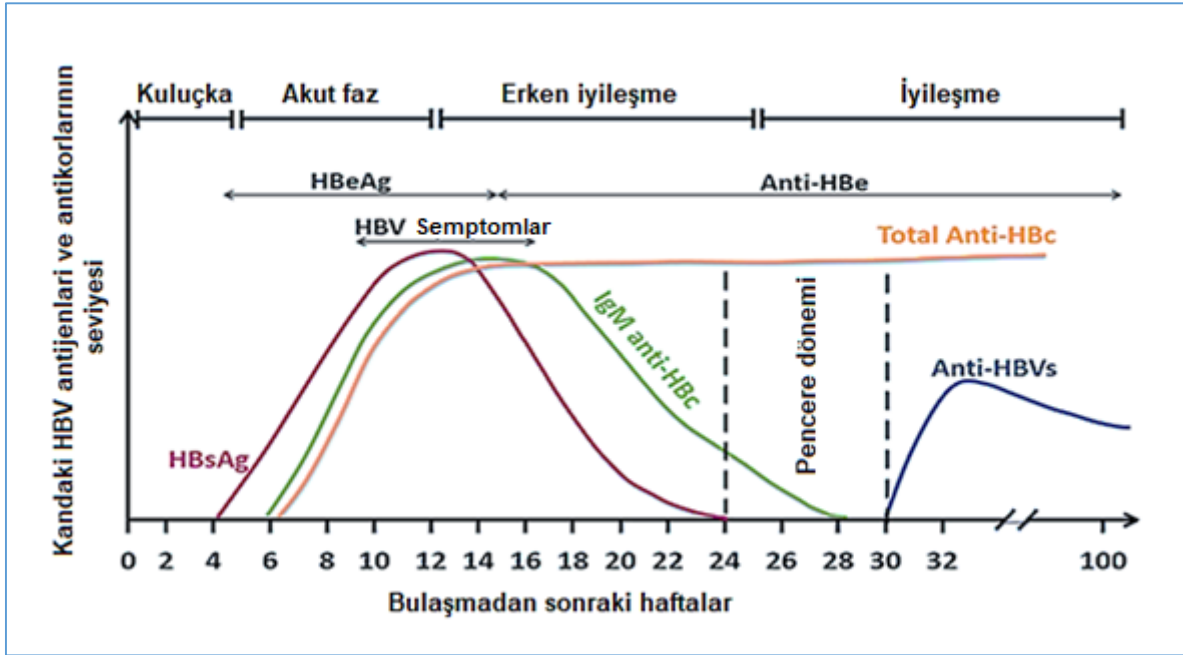
Hepatit B yüzey antijeni negatif faz (İyileşme)

Bazı olgularda spontan HBsAg kaybının söz konusu olduğu dönemdir. Enfeksiyonun daha ileri yaşlarda kazanıldığı bölgelerde daha sık görülmektedir. Bu dönemde enfeksiyon genelde iyi seyirlidir ve düşük düzey HBV replikasyonu devam edebilir. Hastada immun supresiyon gelişmesi, HBV reaktivasyonuna yol açabilmektedir. Bazı hastalar kendiliğinden HBsAg'yi temizler, ancak bu olay nadirdir ve yılda %0,5 ile %1 oranında görülmektedir. Bu hastalar hepatit B çekirdek antikoruna için pozitif kalır ve bazıları anti-HBs geliştirebilir. HBsAg'yi temizleyen hastaların çoğunda serumda saptanamayan HBV DNA vardır, ancak HBV DNA bazılarında serumda ve tüm hastalarda karaciğerde kalır. Bu hastaların gizli HBV enfeksiyonu olduğu düşünülmektedir [19, 80, 81].

2.1.8. HBV'nin laboratuvar tanısı

Hepatit B enfeksiyonu önemli bir küresel sağlık tehdidi olarak kabul edilir. HBV enfeksiyonunun doğru tanısı tedavi için çok önemlidir. Yukarıda bahsedildiği gibi HBV enfeksiyonunun birkaç aşaması vardır, burada her biri viral DNA veya viral antijenlere karşı insan antikorları gibi spesifik biyobelirteçlerin varlığı ile karakterize edilir (Şekil 2.6). HBV, in vitro olarak hücre kültüründe üretilemediğinden, enfeksiyonun laboratuvar tanısı ve izlemi temel olarak serolojik ve moleküler yöntemlere dayanmaktadır. Bu amaçla virüsün antijenleri ve onlara karşı oluşan

antikorlar yaygın olarak ELISA temelli yöntemlerle (Çizelge 2.5), yanı sıra HBV DNA ise yaygın olarak PCR temelli yöntemlerle araştırılmaktadır [37].



Şekil 2.6. HBV enfeksiyonu boyunca patojenik olayların gösterilmesi. HBsAg, akut enfeksiyon seyrinde çok erken tespit edilebilir ve enfeksiyondan 23 ila 24 hafta sonra serumda saptanamayan seviyelere düşmeye başlar. HbeAg aktif replikasyon ve enfektivitenin işaretidir. Oluşan ilk HBV antikor, HBc IgM'dir ve enfeksiyondan sonra 28 hafta kadar devam edebilir. Bu nedenle, IgM'nin tespiti, bir akut HBV enfeksiyonunu temsil eder. Bununla birlikte, kronik enfeksiyon aşamasında, IgG saptanabilir hale gelir ve IgM'den daha uzun bir süre devam eder. İyileşme döneminde, HBsAg temizlendikten sonra anti-HBs birkaç hafta görünmeyecektir. Hem HBsAg hem de anti-HBs'nin iyileşme sırasında negatif olması mümkündür. Buna akut enfeksiyonda pencere dönemi denir. Daha sonra, anti-HBs oluşacaktır [37].

Çizelge 2.5. HBV tespiti için kullanılan farklı ticari immünolojik testlerin duyarlılığı ve özgüllüğü

Şirket adı	Kaplama	Biomarker	Duyarlılık	Özgüllük	Örnek boyut	Referans
Elecsys® HBsAg Assay	II Anti-HBsAg	HBsAg	%100	%99.97	9084	[84]
Architect	-	HBcAb	%79.90	%98	260	[85]
	-	HBsAg ve HBcAb	%100	%90		
Elecsys	-		%78.90	%90.20		
Hepalisa	Direkt sandviç ELISA, Anti-HBsAg ile kaplanmış mikrokuyu plakaları	HBsAg	%100	%100	100	[86]
Microscreen HBsAg	Anti-HBsAg ile kaplanmış mikrokuyu plakaları		%100	%97.8		
ERBA LISA Hepatitis B	Sandwich ELISA, Anti-HBsAg ile kaplanmış mikrokuyu plakaları		%100	%100		
Hepacard Crystal Hbsag	Immunokromatografik test, Anti-HBsAg ile kaplanmış membran	HBsAg	%100	%100	100	
SD BIOLINE HBsAg						

HBV enfeksiyonlarında serolojik göstergeler:

HBsAg/Anti-HBs

Serumda ilk olarak saptanan ve enfeksiyon göstergesi olarak kabul edilen serolojik markerdir. Semptomlardan 1-2 hafta önce ortaya çıkar ve akut enfeksiyonlarda 2-6 ay içinde kaybolmaktadır. Bir pencere döneminden sonra koruyucu anti-HBs antikorları ortaya çıkmaktadır. Anti-HBs'nin geç dönemde saptanmasının nedeni; bu antikorların akut dönemde oluşmamasına değil, HBsAg fazlalığı nedeniyle immün kompleksler halinde bulunduğundan dolayı rutin testlerle tespit edilememesine bağlıdır. Akut enfeksiyon geçiren bir hastada, HBsAg pozitifliğinin 6 aydan fazla sürmesi, hastalığın kronikleştiğine işaret eder. Anti-HBs nötralizan özellikte olur ve uzun süreli bağışıklık sağlar [87]. Anti-HBs antikorlarının pozitifleşmesi iyileşmeyi gösterir. Tek başına Anti-HBs pozitifliği aşılama sonucu kazanılmış bağışıklamayı ifade eder. Anti-HBs ile anti-HBc'nin birlikte pozitif olması ise, doğal enfeksiyon sonucu kazanılan immunitiyi gösterir [88].

HBcAg/Anti-HBc

Kor antijeni sekrete edilen bir protein değildir ve asıl olarak karaciğerde bulunur, normalde direkt olarak kanda saptanamamaktadır. Kor antijenine karşı oluşan antikorlar (anti-HBc), HBsAg'nin pozitifleşmesinden kısa süre sonra ve anti-HBs ortaya çıkmadan önce görülmektedir. İlk başta anti-HBc immünglobülin (Ig) M pozitifleşmekte ve kısa bir süre sonra IgG/total antikorlar da ortaya çıkmakta ve genellikle ömür boyu saptanabilir düzeylerde kalmaktadırlar. Anti-HBc IgM'nin önemli özelliği, akut HBV enfeksiyonunun pencere dönemi esnasında (HBsAg ve anti-HBs saptanamadığı dönem) enfeksiyonun tek göstergesi olmasıdır [78].

HBeAg/Anti-HBe

Akut olgularda serumda HBeAg, HBsAg ile hemen hemen aynı dönemde ortaya çıkmakta ve HBsAg'den daha önce kaybolmaktadır. HBeAg'nin varlığı, bulaştırmacılığın, aktif replikasyon ve enfektivitenin yüksek olduğunun bir göstergesidir.

HBeAg'nin kaybolması ile birlikte serumda anti-HBe'nin saptanması, hastalığın iyileşmeye doğru gittiğini düşündürmektedir. HBeAg ve anti-HBe, rutin tanı paneli içinde yer alan belirteçler değildir; ancak kronik hepatit fazlarının belirlenmesinde ve kronik hastalığın izleminde (KC biyopsisi, antiviral tedaviye başlangıç gibi) karar vermek açısından önemlidir [87, 88]. HBV ile ilgili serolojik belirteçlerin yorumlanması hakkında detaylı bilgi Çizelge 2.6'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.6. HBV serolojik testlerinin yorumlanması [89]

Belirteçler	Sonuç	Yorum
HBsAg	Negatif	HBV'ye karşı duyarlılık; aşılama önerilir
Anti-HBc	Negatif	
Anti-HBs	Negatif	
HBsAg	Negatif	Geçirilmiş doğal enfeksiyon sonucu kazanılmış bağışıklık
Anti-HBc	Pozitif	
Anti-HBs	Pozitif	
HBsAg	Negatif	Aşılanmış
Anti-HBc	Negatif	
Anti-HBs	Pozitif	
HBsAg	Pozitif	Aktif HBV enfeksiyonu (genellikle kronik) Anti-HBc IgM varsa, akut enfeksiyonu gösterir
Anti-HBc	Pozitif	
Anti-HBs	Negatif	

Çizelge 2.6. (devam) HBV serolojik testlerinin yorumlanması

HBsAg	Negatif	Çok önceden geçirilmiş enfeksiyon
Anti-HBc	Pozitif	Pencere dönemi: iyileşmeye başlayan akut enfeksiyon
Anti-HBs	Negatif	Yanlış pozitif
		"Düşük düzey" KHB

Moleküler tanı yöntemleri

Viral DNA, virüsün replikasyon aktivitesini ortaya çıkaran viral yükün doğrudan bir ölçümüdür. Enfeksiyonun erken aşamasında tespit edilebilir (HBV enfeksiyonundan 1 ay sonra) ve HBV'ye maruz kaldıktan yaklaşık 3 ay sonra en yüksek seviyeye (10^8 kopyadan/mL'den fazla) artar ve daha sonra kronik enfeksiyonda yavaş yavaş azalır veya HBV enfeksiyonundan iyileşme sırasında kaybolur. HBV DNA'nın tespiti, replikasyon aktivitesinin güvenilir bir belirteçidir ve daha yüksek HBV DNA titreri, daha hızlı hastalık ilerlemesi ve daha yüksek HSK insidansı ile ilişkilidir. Ayrıca, HBV DNA için moleküler testler, çoğunlukla viral yükün kantitatif yöntemlerle saptanması, virüsün genotiplendirilmesi, ilaç direnci ya da klinik gidişle ilgili mutasyonların varlığının gösterilmesine yöneliktir [87]. Bu amaçla, PCR, gerçek zamanlı (real time) PCR, DNA dizi analizi ve line prob assay gibi yöntemler kullanılmaktadır. Moleküler tanı konusunda en önemli gelişme gerçek zamanlı PCR tekniğinin ortaya çıkmasıdır. Böylece kantitatif sonuçlar kısa bir sürede verilmektedir (Çizelge 2.5).

Çizelge 2.5. HBV DNA için kantitatif yöntemlerin karşılaştırılması [87]

Yöntemler	Ticari tahlil adı	Üretici firma	Ölçülebilir aralık (IU / mL)	Tespit sınırı (IU / mL) (DSÖ HBV standardını kullanarak)
Yarı otomatik qPCR	COBAS AmpliPrep / COBAS TaqMan HBV Testi v2.0	Roche Moleküler Sistem, Kaliforniya, ABD	$20-1.7 \times 10^7$	20
Yarı otomatik gerçek zamanlı PCR	Yüksek saflıkta kullanım için COBAS TaqMan HBV Testi	Roche Moleküler Sistem, Kaliforniya, ABD	$29-1.1 \times 10^7$	6
Otomatik gerçek zamanlı PCR	Abbott Real-time HBV	Abbott Diagnostic, Şikago, ABD	$10-1 \times 10^9$	10
Otomatik gerçek zamanlı PCR	Xpert HBV Viral Yüğü	Cepheid Sunnyvale, Kaliforniya	$10-1 \times 10^9$	10

HBV genotipleme yöntemleri

Hepatit B virüsü genotiplemesi HBV hastalığının ilerlemesini öngörmek ve uygun antiviral tedaviyi belirlemek için önemlidir [87]. Değişken hassasiyet, özgüllük, zaman alıcı ve maliyete sahip farklı genotipleme yöntemleri geliştirilmiştir [90]. Aşağıda HBV genotiplemede yaygın olarak kullanılan yöntemler sunulmuştur.

Dizileme ve filogenetik analiz

Hepatit B virüsü genotiplemesi için altın standart yöntem, tüm genom dizilemesi ve ardından filogenetik analizdir. Bu teknik oldukça hassas, yeni ve rekombinant genotiplerin tespit edilmesine izin vermesine rağmen, pahalı, zaman alıcı ve genotip karışımlarında ağırlıklı olarak baskın olan genotipi saptamaktadır. Bütün genom dizilemeye bir alternatif olarak, HBsAg ve polimeraz gibi tek gen dizilemesi ile de genotipleme yapılmaktadır [90].

Restriksiyon fragman uzunluk polimorfizm (RFLP)

Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizm yöntemi, basit ve uygun maliyetli yöntemdir. PZR sonrası araştırılacak genin belirli bölgelerden restriksiyon enzimleriyle kesilmesi ve kesilen bölgenin agaroz jel elektroforezinde yürütülmesi esasına dayanmaktadır. GenBank'ta farklı HBV genotip dizilerine göre RFLP için farklı restriksiyon enzimler kombinasyonu kullanılmıştır. Bu yöntem HBV'nin A-F genotiplerini belirlemek için kullanılmıştır [90].

Serolojik alt tiplendirme

Bu yöntemle HBsAg'ye karşı antikorlar kullanılarak HBV serotipleri veya alt tipleri tespit edilmektedir. Serotipler, sabit bir "a" determinantından, artı iki değişken, karşılıklı olarak ayrılan d / y ve w / r determinantlardan oluşur ve dokuz serolojik alt tip, *ayw1*, *ayw2*, *ayw3*, *ayw4*, *ayr*, *adw2*, *adw4*, *adrq* + ve *adrq* - ile sonuçlanır. PCR ve dizileme analizi, genotipleme için standart yöntemler olarak kullanılmasına rağmen, dizileme, geniş epidemiyolojik çalışmalar ve popülasyon taraması için uygun değildir. Buna karşılık, bir enzim immünoassay biçiminde sınırlı alt tip özelliklerine sahip monoklonal anti-HBs antikorları kullanan serolojik analizler, daha düşük maliyetli, uygulaması kolay ve daha yüksek verime sahiptir [87].

Real-time PCR

Bu yöntem, hem HBV genotipini hem de serumda HBV DNA seviyesini tanımlamaya yardımcı olur. Real-time PCR'de kullanılan SYBR green I (çift sarmallı DNA'ya bağlanan bir nükleik asit boyası) veya floresan problemleri HBV DNA'sının saptanmasını sağlarken, erime eğrisi analizi genotiplerin belirlenmesine izin verir. Erime sıcaklığı (T_m) değeri, prob ile hedef veya hibridizasyon dizisinin GC içeriği arasındaki tamamlayıcılığa bağlı olarak farklı genotipler arasında farklılık göstermektedir [91]. Diğer genotipleme yöntemlerinden farklı olarak, yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olması, zaman tasarrufu sağlaması, geniş dinamik aralığa sahip olması ve örneklerde viral yükü kantite edebilmesi bu metodu viral hepatitlerin tanısında altın standart hale getirmektedir. Bu yöntemin ana dezavantajı, A ve C gibi erime sıcaklığı değerleri arasındaki yakınlığı olan genotipleri ayırt etme kabiliyetinin daha düşük olması ve bu nedenle farklı genotipleri içeren Kuzey Amerika gibi bazı ülkelerde uygulanamamasıdır [90, 92]. Naito ve diğerlerinin, A-F genotiplerinin tespiti için geliştirdikleri multipleks PCR yöntemi de günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır [93].

Oligonükleotid mikroarray

Song ve diğerleri, ilk defa oligo mikroarray kullanan yeni bir HBV genotipleme yöntemini geliştirmiştir [94]. Bu yöntem, çip üzerinde immobilize edilmiş tipe özgü oligonükleotit problemlerine hibritlenen Cy5 etiketli amplikonlarla ters hibridizasyon prensibine dayalı olarak tasarlanmıştır. Yıkama ve kurutma işleminden sonra, tarayıcı kullanılarak floresan sinyalleri alınmıştır. Bu yöntemin spesifik olduğu ve hem tek hem de karışık genotiplerin belirlenmesinde duyarlı olduğu bulunmuştur [95, 96].

2.1.9. Tedavi

Kronik hepatit B tedavisinin amacı, siroz ve son evre KC hastalığı riskini önleyerek sağkalımı iyileştirmek ve yaşam kalitesini arttırmaktır. Mevcut tüm tedavi kılavuzları, akut KC yetmezliği, dekompanse siroz veya kronik HBV'nin şiddetli alevlenmesi kanıtı olan hastaları tedavi etmeyi önermektedir. Siroza ilerleme göstermeyen

hastalar için tedavi kararı, serum HBeAg, HBV DNA ve ALT seviyelerinin yanı sıra KC hastalığının ciddiyetine dayanmaktadır [97, 98].

Kronik hepatit B için mevcut antiviral tedavi, nükleozit/nükleotit analogları (NA) ve interferon alfa (IFN - α)/pegile interferondur (PEG-IFN) [99].

İnterferonlar

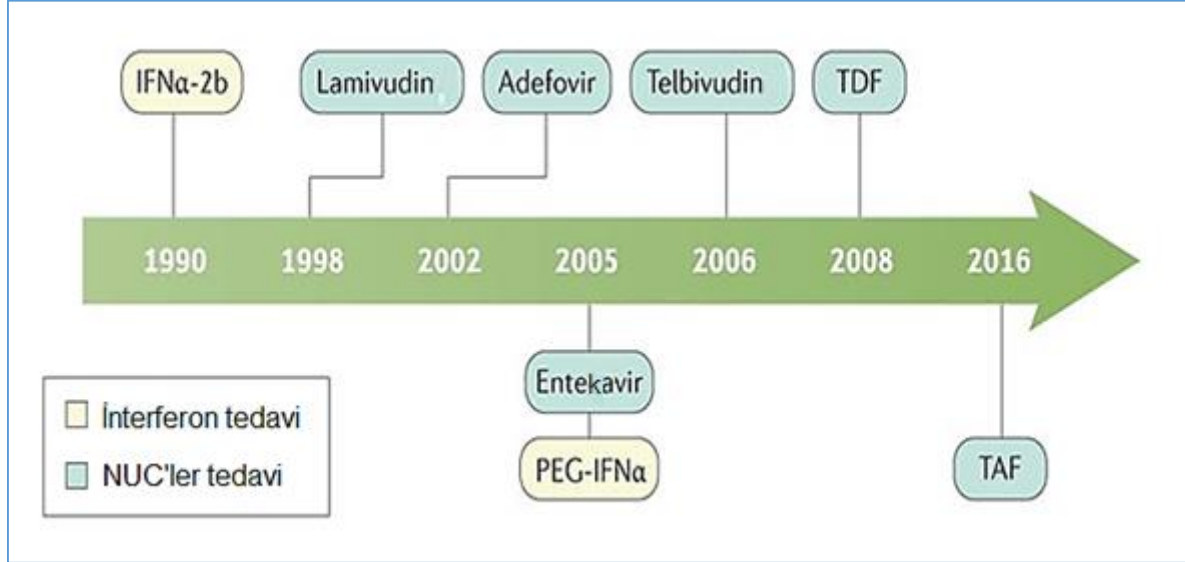
IFN - α , kronik HBV enfeksiyonu için onaylanan ilk tedavidir (Şekil 2.7) ve HBV pregenomik RNA'nın transkripsiyonunu azaltma, cccDNA'nın parçalanması, gelişmiş hücre aracılı immünite ve enfekte hepatositlerin temizlenmesini içeren farklı etki mekanizmalarına sahiptir. PEG-IFN α , daha uzun yarı - ömür, daha az sıklıkta dozaj ve daha uzun süren etkinlik nedeniyle standart IFN- α 'ya göre tercih edilmektedir. IFN tedavisinin NA'larla karşılaştırıldığında avantajları, özellikle genotip A enfeksiyonunda, yüksek oranda dayanıklı yanıt ve yüksek HBeAg ve HBsAg kaybı oranları ile sınırlı bir tedavi süresi içerir. Bununla birlikte, IFN tedavisi, NA'lara kıyasla viral replikasyonun bastırılmasında daha az etkilidir, parenteral uygulama gerektirir ve gebelik, dekompanse siroz veya hepatitin şiddetli alevlenmeleri olan hastalarda kontrendikedir. Ayrıca grip benzeri semptomlar, baş ağrısı, yorgunluk, altta yatan duyu durum bozukluklarının kötüleşmesinin yanı sıra otoimmün hastalıkların şiddetlendirilmesi gibi olumsuz yanları da vardır. Bu nedenle, PEG-IFN, HBV tedavisinde yaygın olarak kullanılmaz [97, 99, 100].

NA'lar, viral polimeraz/ters transkriptaz alanını hedefler ve şu anda HBV'ye karşı doğrudan etkili küçük molekülü antiviral ilaçların onaylanmış tek sınıfıdır. Bu sınıf, lamivudin (LAM), telbivudin, entekavir (ETV), adefovir dipivoksil (ADV), tenofovir disoproksil fumarat (TDF) ve yakın zamanda onaylanmış tenofovir alafenamid fumarat (TAF) içerir. Çoğu ülkede tedavinin temeli NA'larıdır ve genel olarak oral yoldan uygulanır [97].

Lamivudin

Lamivudinin önemli avantajı ucuz olması ve gebelik dahil birçok koşullarda güvenli olarak kullanılmasıdır. Ancak virüsün ilaca karşı sıklıkla direnç geliştirmesi başlıca dezavantajıdır. Bu direnç lamivudin kullananlarda beşinci yılın sonunda %70'lere kadar ulaşabilmektedir. Direnç saptanan hastalarda karaciğerin histolojik iyileşmesi durmakta ve alevlenmeler görülebilmektedir. Lamivudin, yeni antivirallerin

geliştirilmesiyle önemini yitirmiştir ama halen insan immün yetmezlik virüsü (HIV)-HBV koenfeksiyonu olan hastalarda tenofovir ile birlikte kullanılmaktadır [101].



Şekil 2.7. HBV tedavi ajanları için ABD FDA onayının yılını gösteren bir zaman çizelgesi. Tüm tedavi ajanları ayrıca Avrupa İlaç Ajansı ve çeşitli Asya ülkelerinde onaylanmıştır. Mavi kutular nükleosid veya nükleotid analoglarını (NUC'ler) belirtir ve soluk pembe kutular interferon bazlı tedaviyi belirtir. 2018'de, önerilen birinci sıradaki ajanlar, pegile interferon a-2a (PEG-IFNα), entekavir, tenofovir disoproksil fumarat (TDF) ve tenofovir alafenamid'dir (TAF) [79].

Adefovir dipivoksil

Adefovir (ADV), 2002 yılında KHB tedavisinde kullanılması için onay almıştır. Lamivudin dirençli hastalarda kullanabildiği için bir dönem sıklıkla tercih edilmiştir. Antiviral etkisi zayıftır ve hastaların yaklaşık %25'inde viral baskılanma hiç olmamakta veya minimal olmaktadır. Beş yıllık tedavi sonunda adefovir alanlarda % 29 oranında ilaca karşı direnç gelişebilmektedir [102, 103].

Entekavir

Entekavir (ETV), tenofovir alafenamide (TAF) ve tenofovir disoproksil fumarat (TDF), diğer NA'lara kıyasla daha yüksek antiviral etkisine ve nispeten düşük direnç frekansına sahiptir ve bunlar birinci basamak tedaviler olarak önerilmektedir.

Entekavir, dekompanse sirozu olan hastalarda kullanıma uygundur. Ancak ETV ve LAM arasındaki çapraz direnç nedeniyle, daha önce lamivudin direnci geliştirmiş olan lamivudin ile tedavi edilen hastalar, entecavir direncinin gelişimi için gerekli olan üç mutasyondan ikisine sahip olacaklardır. Bu hastaların % 51'i 5 yıl içinde entecavir direnci geliştirecektir [97, 101]. İmmünsüpresyonu olan hastalarda önleyici tedavi için önerilir [103].

Telbivudin

Telbivudin (LdT), doğal bir nükleozid analogudur ve HBV tedavisinde kullanım onayını 2006 yılında almıştır. Lamivudine göre daha etkili olduğu gösterilmiştir ve daha pahalıdır. Telbivudin direncine neden olan mutasyonlar, LAM ve ETV ile çapraz direnç oluşturur ve direnç gelişme potansiyeli de yüksektir. . Bu nedenle, tedavinin 3-6 aylık dönemlerinde hastanın direnç gelişimi açısından takip edilmesi gerekir. İkki yıllık telbivudin kullanımı sonrası %22 vakada ilaca direnç gelişmektedir [104]. Çalışmalarda, hem LdT hem de TDF, gebelerde (kategori B) HBV dikey geçişini engellemek için etkili ve güvenilir olduğu gösterilmiştir [105].

Tenofovir

Kronik hepatit B tedavisi için 2008 yılında onaylanmasından bugüne kadar tenofovir disoproksil fumarat (TDF), dirençsiz güçlü antiviral aktivite göstermiştir ve LAM veya ETV direnci ayarında tercih edilen madde haline gelmiştir. Yapısal olarak ADV'ye benzeyen bir nükleotid analogudur. Ek olarak, anneden bebeğe geçişin önlenmesi için TDF kullanımı üzerine yapılan çalışmalar, TDF'nin bu ortamda tercih edilen tedavi düzeyine yükselmesine neden olmuştur [106]. Amerika Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration; FDA) tarafından Kasım 2016'da onaylanan tenofovir alafenamid fumarat (TAF), TDF'ye benzer fakat daha düşük bir dozda antiviral etkinlik sağlayan bir TDF ön ilacıdır. Genel olarak, TAF'nin, TDF'ye göre daha yüksek plazma stabilitesine ve ilacın hepatositlere daha verimli verildiğine sahip olduğu gösterilmiştir [99, 103].

2.1.10. Hepatit B'nin önlenmesi

Önleme, özellikle çoğu durumda yaşam boyu tedavi gerektiren HBV'de, tedaviden çok daha kolaydır. Enfekte olmuş insanlardan kan temini taraması ve evrensel

önlemler yoluyla bulaşmanın engellenmesinin yanı sıra, aşılama, küresel hastalık yükünü azaltmanın en önemli yoludur [107]. Yüksek düzeyde koruma sağlayan güvenli ve etkili, aktif immünizasyonda kullanılan HBV aşıları mevcuttur. Doğumda HBV'ye karşı aşılama HBV'nin ortadan kaldırılması ve KC kanseri insidansının azaltılması için ana strateji olmaya devam etmektedir. İlk plazma türevli hepatit B aşısı 1981 yılında ABD'de lisanslanmıştır ve 1986 ile 1989 yıllarında rekombinant hepatit B aşıları ile değiştirilmiştir.

Hepatit B aşısı sadece HBV'ye ait antijeni içeren tekli şeklinde bulunabildiği gibi, diğer aşılarla birlikte kombinasyon halinde de bulunabilmektedir. HBV aşısı doğumda yapılacaksa monovalan olan formu uygulanmalıdır.

Tek antijen içeren HBV aşıları

Engerix-B®

Recombivax HB®

Kombinasyon aşıları

Comvax®: HBV ve *Haemophilus influenzae* tip b (Hib) konjuge aşılarının kombinasyonudur. Altı haftadan küçük olan bebeklerde ve 71 aydan büyük bebeklerde kullanılamaz.

Pediarix®: HBV, tetanoz toksoidi, difteri, aselluler boğmaca (DTaP) ve inaktif polyovirüs (IPV) aşılarının kombinasyonudur. Altı haftadan küçük bebeklerde ve 7 yaştan büyük çocuklarda kullanılmaz.

Twinrix®: Hepatit A ve hepatit B aşılarının kombinasyonudur. Hem HAV, hem HBV enfeksiyonu açısından risk taşıyan ≥ 18 yaş kişilere uygulanır [108].

Dünya Sağlık Örgütü, tüm bebeklerin perinatal HBV bulaşını önlemek için doğumdan sonra, en kısa sürede, tercihen 24 saat içinde bir monovalent hepatit B aşısının ilk dozunu almasını önerir. İlk dozu, iki doz monovalent hepatit B aşısı veya hepatit B içeren kombinasyon çocukluk aşısı olarak bilinen en az iki destekleyici doz takip etmelidir. Komple hepatit B aşı serisi (doğum dozu artı iki ek destek dozu) aşılanmış bebeklerin % 95'inden fazlasında koruyucu miktarlarda anti-HBs

antikorları oluşturur [3]. HBsAg pozitif annelerden doğan bebeklere yapılan aşıya ek olarak Hepatit B hiperimmünglobulini de (HBIG) verilebilir. Pasif bağışıklamada kullanılan HBIG yüksek titrede anti-HBs içermektedir ve yüksek düzeyde anti-HBs antikorları içeren insanların plazmasından elde edilmektedir [109].

HBV ile cinsel yolla karşılaşma ve perkütan ya da mukozal temas durumu varsa hem aşı hem de pasif immunizasyon yapılmalıdır. Cinsel yolla karşılaşma sonrası ilk 14 günde, perkütan maruziyetler sonrası ilk 7 günde, bağışıklamaya başlanması önerilmektedir [110, 111].

Kazakistan'da HBV aşısı 1998 yılında, kronik HBV enfeksiyonunu önlemek, bununla ilişkili hastalık ve kanser insidanslarını azaltmak amacı ile ulusal aşı programına eklenmiştir. Takvimimizde hepatit B aşısı üç doz olarak 0., 2. ve 4. aylarda yapılmaktadır [112].

2.2. Hepatit C virüsü

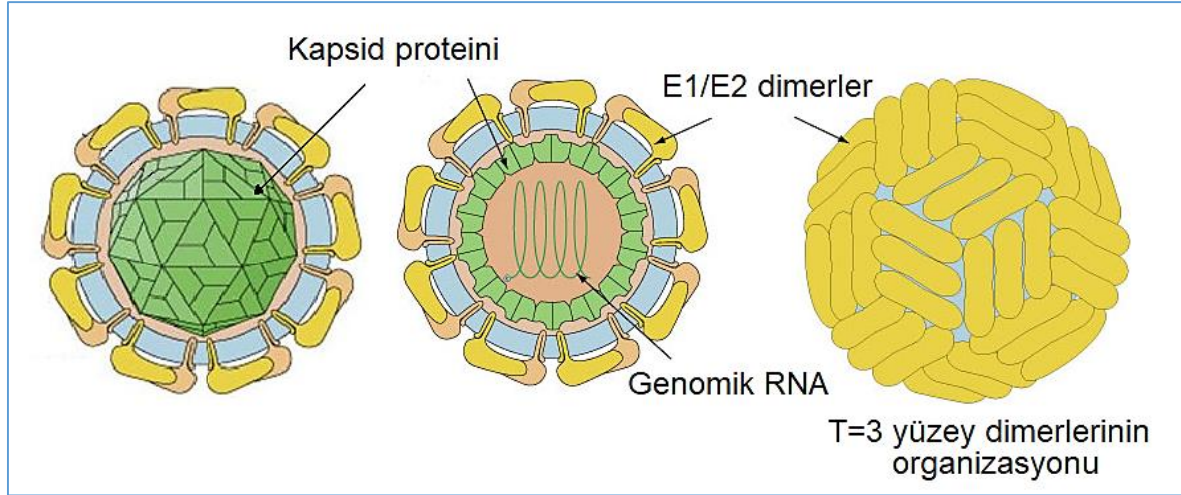
2.2.1. Tarihçe

Hepatit C virüsü (HCV), dünyadaki kronik karaciğer hastalıklarının önde gelen nedenidir. HCV'yi ilk olarak Feinstone ve diğerleri 1975 yılında Hepatit A ve Hepatit B olmadığı bilinen post-transfüzyon hastalarında saptamıştır ve non-A non-B hepatiti olarak adlandırmıştır [113]. Etken, Choo ve diğerleri tarafından 1989 yılında Hepatit C virüsü olarak tanımlanmıştır [114]. Non-A non-B hepatitin temel nedeninin HCV olduğu kesinleşmesinden sonra çoğu batı ülkelerinde donör taramaları başlatılmıştır. HCV'ye karşı oluşan antikorlar için geliştirilen I ve II. jenerasyon testlerinin 1990 ve 1992 yılları arasında uygulanması hepatit insidansında %70 azalmayla sonuçlanmıştır. İlerleyen zaman içinde, genom tespitine dayalı daha duyarlı yöntemlerin geliştirilmesiyle HCV bulaşı azalmıştır [115].

2.2.2. Sınıflandırma ve virion yapısı

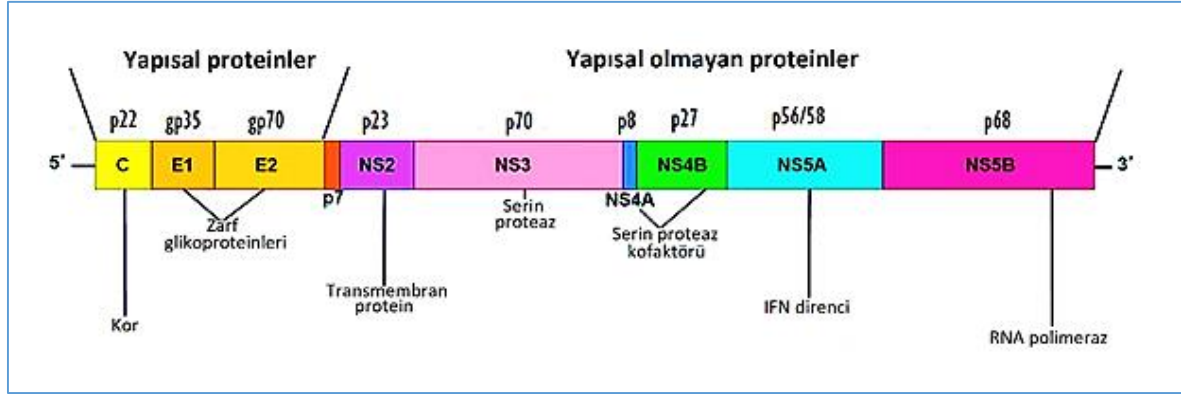
Sekizinci Uluslararası virüs taksonomisi birliğinin (ICVT) 2005 yılında yayınladığı raporuna göre HCV *Flaviviridae* ailesinin *Hepacivirus* cinsi içinde sınıflandırılmıştır. Hücre kültüründe üretilmesindeki zorluklardan dolayı HCV'nin serotiplendirmesi yapılmamıştır. Tiplendirme genomdaki değişikliklerin belirlenmesine dayalıdır [116].

Hepatit C virüsü, yaklaşık 50 nm boyutlarında zarflı, pozitif sarmallı, bir RNA virüsüdür (Şekil 2.8). Zarf karbonhidrat ve proteinlerle (glikoprotein) birleşmiş lipidlerden oluşur ve çift katlıdır. Zarfın lipid komponentinin %60'ı fosfolipid, geri kalan kısmının çoğu kolesteroldür. Peplomer denilen çıkıntıları vardır ve bunlar konak hücrelerine yapışmasını sağlar [117].



Şekil 2.8. HCV partikül yapısı. HCV çekirdek proteini, nükleokapsidi oluşturmak için viral genomik RNA ile etkileşir.

Viral RNA (genom), uzunluğu yaklaşık 9600 nükleotid bazdan oluşan tek iplikçikli, pozitif duyarlı bir RNA'dan oluşur [118]. Viral genomun 5' ve 3' uçlarında herhangi bir proteini kodlamayan (NCR: non-coding region ya da UTR: untranslated region) ancak viral proteinlerin translasyonunda ve viral replikasyonda görev alan bölgeler bulunmaktadır. IRES (internal ribosomal entry site) adı verilen ve genomun ökaryotik ribozomun 40S alt ünitesine tutunduktan sonra ribozom tarafından okunmasını sağlayan bölge 5'-NCR içinde yer almaktadır. Viral genomun her iki ucunda yer alan bu kodlanmayan bölgelerin arasında virüsün yapısal ve yapısal olmayan proteinlerini kodlayan bölge yer almaktadır. Bu bölge viral poliproteini kodlayan tek bir açık okuma çerçevesinden (ORF) oluşmaktadır. Yapısal proteinler; kapsid kor proteini, zarf glikoproteini olan E1 ve E2 proteini olmak üzere üç tanedir. Yapısal olmayan proteinler ise yedi tanedir (NS1, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) [119] (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. HCV'nin genom organizasyonu, genom tarafından kodlanan poliprotein ve kesim bölgeleri [120].

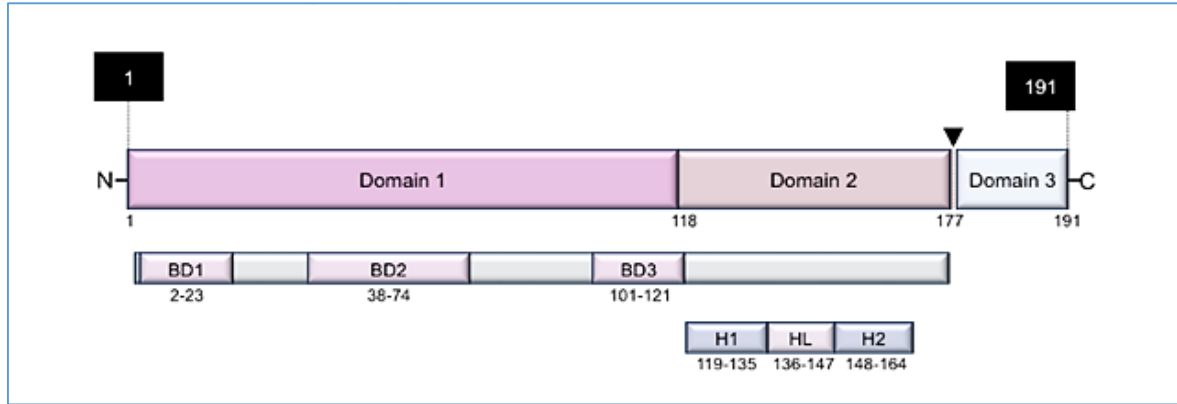
Yapısal proteinler

Hepatit C virüsünün yapısal proteinleri olan kor ve zarf glikoproteinleri (E1, E2), viral poliproteinden konağa ait hücresel sinyal peptidazları tarafından kesilerek ayrılmaktadır. Bu olay ER membranında gerçekleşmektedir.

Kor proteini

Viral nükleokapsidi oluşturan yüksek oranda korunmuş bir bazik proteindir [118]. Bu protein, viral transkripsiyon sonucu sentezlenen yaklaşık 3000 aminoasitlik öncül poliprotein, endoplazmik retikulumda işlenmesi sonucunda meydana gelir. Kor proteininin oluşmasında ilk aşama, konak sinyal peptidazı ile poliproteinin 191. aminoasidinden olgunlaşmamış kor proteinini ayırmasıdır. Ardından bu öncül form, sinyal peptid peptidaz ile tekrar kesilerek 177 amino asit uzunluğunda ve 21 kDa ağırlığında olgun çekirdek proteinini oluşturur. Olgun çekirdek proteini iki farklı alandan oluşur: D1 (N-terminal bölgesinde) ve D2 (C-terminal bölgesinde). D1 alanı yapı olarak oldukça esnektir ve üç temel alana (BD) bölünmüştür: BD1, BD2 ve BD3. D1 alanı, nükleokapsiti oluşturmak için RNA bağlama ve oligomerizasyona katılır. D2 alanı, hidrofobik bir halka ile bağlanmış ve lipid membranlarla etkileşime katkıda bulunan Helix I ve Helix II bölgelerini içerir [121] (Şekil 2.10). Kor proteini ER dışında hücre çekirdeği ve mitokondride de bulunabilmektedir. Mitokondri-kor etkileşimi reaktif oksijen ara ürünlerinin yapımında artışa, kalsiyum bağlı membran depolarizasyonuna ve apoptoza neden olmaktadır. Ayrıca, kor proteinini eksprese

eden transgenik farelerde HSK gelişmekte ve kor genindeki bazı mutasyonların kanser riskini artırdığı belirtilmektedir [122].



Şekil 2.10. HCV kor proteinin şematik şekli. Kor proteini bir sinyal peptidaz (SP) ile poliproteinden salınır. Ardından, 191 aminoasidin öncül çekirdeği, bir sinyal peptid peptidaz (SPP) tarafından işlenir ve iki alandan (D1 ve D2) oluşan yaklaşık 177 aminoasitlik olgun bir protein oluşturmaktadır. D1 alanı üç temel kümeye bölünebilir: BD1 (temel etki alanı 1), BD2 (temel etki alanı 2) ve BD3 (temel etki alanı 3). D2 alanı, bir hidrofobik halka (HL) ile ayrılmış iki amfipatik α -helis, Helix I (H1) ve Helix II (H2) içerir [121].

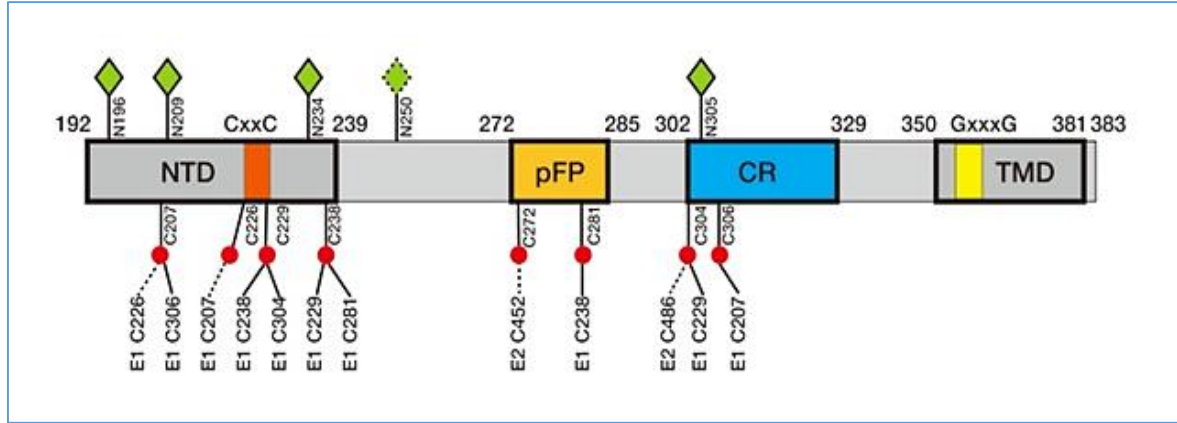
HCV zarf glikoproteinleri

Bir heterodimer olarak kovalent olmayan bir şekilde birleştirilen E1 ve E2 glikoproteinlerinden oluşur. Bu E1/E2 glikoprotein heterodimer, konakçı türevli lipid zarına gömülür ve birlikte HCV zarfını oluşturur. Zarf glikoproteinleri, E1/E2 heterodimerlerinin (üç grup heterodimer) trimerlerinden oluşan daha yüksek dereceli bir oligomerik yapı oluşturur; trimerler daha sonra pentamerlere (beş trimer grubu) monte edilebilir. Yapısal olarak, E2 proteindeki aşırı değişken bölge, E1 proteinini bağışıklık sisteminden korur. E1 (192 amino asit) ve E2 (363 amino asit) proteinleri, konakçı reseptör bağlanmasında, endozom-lipid membran füzyonunda ve montajında rol oynar [119, 123, 124].

E1 protein

E1 proteini 35 kDa'lık bir moleküler ağırlığa sahip ve 192 amino asit uzunluğundadır. E1 proteini dört ana alana sahiptir: bir N-terminal alanı (NTD), bir füzyon peptidi

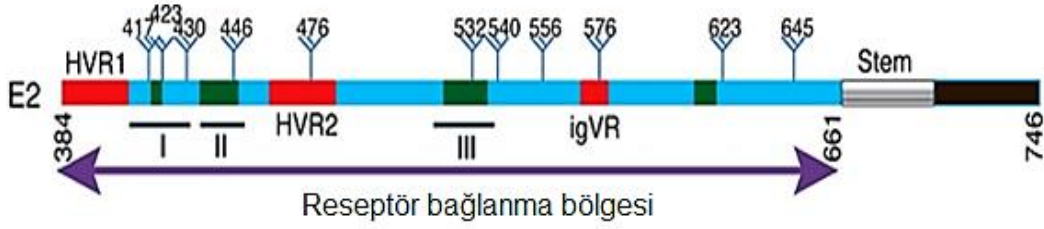
(pFP), korunmuş bir bölge (CR) ve kısa bir C-terminal transmembran alanı (TMD). TMD alanında bulunan E1 yüksek oranda korunmuş GxxxG motifi (Gly354 ve Gly358), E1 trimerinin oluşumunda önemli bir rol oynar. Ek olarak, CxxC motifinin (Cys 226 ve Cys 229) virüs girişi sırasında rol oynadığı bilinmektedir [125]. (Şekil 2.11).



Şekil 2.11. HCV E1 zarf proteininin şematik şekli. E1, N-terminal alanı (NTD, 192-239), füzyon pepetidi (pFP, 272-285), korunmuş bölge (CR, 302-329) ve C terminal transmembran alanı (TMD, 350-381) içerir. NTD'ki CxxC motifi ve TMD'deki GxxxG motifi sırasıyla turuncu ve sarı renkle işaretlenmiştir [119].

E2 protein

E2 proteini 70 kDa'lık bir moleküler ağırlığa sahiptir ve 363 amino asit uzunluğundadır. E2 proteini, hiperdeğişken bölge 1 (HVR1), HVR2, intergenotipik değişken bölge (igVR), bir N terminali ve bir transmembran (TM) alanı içerir (Şekil 2.12). E2 glikoproteininin N terminali oldukça değişken olabilir ve bir hastada bile hızla değişebilir. E2'nin, SR-BI (scavenger receptor B1) ve CD81 ile etkileştiği ve füzyon sürecine de katıldığı gösterilmiştir [125, 126].



Şekil 2.12. HCV E2 zarf proteininin şematik şekli. HVR = Hiperdeğişken bölge; NT = N terminali (gri renkli); igVR = İntergenotipik değişken bölge; E2'deki hiperdeğişken bölgelerin yeri kırmızı olarak gösterilmiştir ve epitoplar I, II ve III olarak belirtilen üç immünojenik epitopun altı çizilidir. CD81 yer alan bölgeler spesifik temas kalıntıları ile yeşil renkle, transmembran alanları ise siyah renkle gösterilmiştir [127].

Yapısal olmayan (Non-Structural; NS) proteinler

P7 protein

P7 proteini hidrofilik, pozitif yüklü, sadece 7 kDa moleküler ağırlığa sahiptir ve 63 amino asit uzunluğundadır [128]. Bu proteinin tüm yapısal ve işlevsel özellikleri aydınlatılmamıştır. Bazı çalışmalar p7 proteinin iyon kanal etkinliğine sahip bir viroporin olduğunu göstermektedir. Her ne kadar p7 hepatositlerde yapısal bir role sahip olsa da, viral partikülün bir parçası değildir. Ancak, virüsün bir araya gelme (assembly) aşamasında etkin olduğu ve enfeksiyöz virionların oluşumu için gerekli olduğu bildirilmektedir [122, 125].

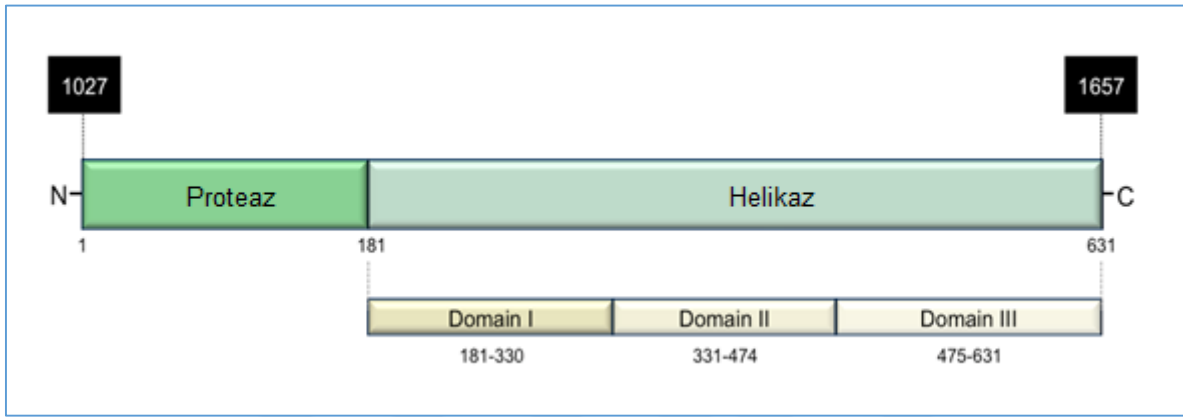
NS2 protein

NS2 proteini 21 kDa'lık bir moleküler ağırlığa sahiptir ve 217 amino asit uzunluğundadır. Hidrofobik bir transmembran proteindir. NS2, HCV yaşam döngüsünde bir sistein proteaz olarak ve virüsün bir araya gelme aşamasında bir kofaktör olarak ikili fonksiyonlara sahiptir [129].

NS3 protein

NS3 proteini serin proteaz ve RNA helikaz aktiviteleri barındıran, zara-bağlı çok işlevli bir proteindir. HCV replikasyon kompleksinin vazgeçilmez bir bileşeni ve

antiviral müdahale için ana hedeftir [130]. NS3, 70kDa'lık bir moleküler ağırlığa sahiptir ve 631 amino asit uzunluğundadır (Şekil 2.13). N terminalinde bulunan serin proteaz bölgesi, yapısal olmayan proteinleri serbest bırakan viral poliproteinin bölünmelerinin çoğundan sorumludur. Ek olarak, NS3, viral replikasyonu engelleyebilen çeşitli konak hücre faktörlerini proteolitik olarak etkisiz hale getirerek doğal immun yanıtı bozmada rol oynar. C terminalinde bulunan helikaz bölgesi muhtemelen viral RNA'yı gevşeterek viral replikasyonu destekler [125, 131].



Şekil 2.13. NS3 proteininin şematik şekli. Amino-terminal proteaz alanı yeşil renkte, karboksi-terminal helikaz alanı mavi olarak gösterilmiştir [125].

NS4A protein

NS4 proteini yapısal olmayan HCV proteinlerinin en küçüğüdür (54 aminoasitlik). NS4A proteini, NS3-4A kompleksinin endoplazmik retikulum ve mitokondriya dış zarına tutturulması, NS3A serin proteazının kofaktörü olarak görev yapmak, NS3A helikaz aktivitesinin artırılması ve NS5A fosforilasyonunun ve viral replikasyonun düzenlenmesi gibi HCV'nin yaşam döngüsünde birçok fonksiyona sahiptir [125, 129].

NS4B protein

NS4B proteini ağırlık olarak 27 kDa'dır ve uzunluğu 261 aminoasitten oluşmaktadır. Bu protein ER membranında viral RNA replikasyonunun gerçekleştiği ve membranöz ağın oluşumu için gerekli olan birkaç viral bileşenden biridir. Membranöz ağ NS4B'nin amino ucundaki alfa-helikas yapısıyla oluşmaktadır. Ayrıca NS4B'nin, GTP ve ATP'yi hidrolize edebilen bir enzimatik etkinliği de vardır [132, 133].

NS5A protein

NS5A protein bilinen bir enzimatik aktivitesi olmayan 56 KDa ağırlığında ve 447 aminoasit uzunluğunda bir hidrofilik fosfoproteindir. NS5A proteini HCV yaşam döngüsünün önemli bir düzenleyicisidir ve 3 bölgeye (Domain; D) ayrılmaktadır. İlk bölge (DI) RNA replikasyonu açısından önemlidir. Domain II, bazı hepatit C hasta popülasyonlarında mutasyonların IFN direncinden sorumlu olduğu varsayılan interferon duyarlılık belirleme bölgesi (*interferon sensitivity determining region*; ISDR) adı verilen bir bölge içerir. Domain III ise HCV partiküllerinin bir araya gelmesine katkıda bulunur [134]. NS5A ayrıca HCV patogenezi, konak hücredeki sinyal ileti yollarının kontrolü, apoptozun baskılanması, hücre büyüme ve farklılaşmasının etkilenmesi, lipid metabolizmasının hasara uğratılması gibi birçok konak hücre fonksiyonunu değiştirdiği bildirilmiştir [133].

NS5B protein

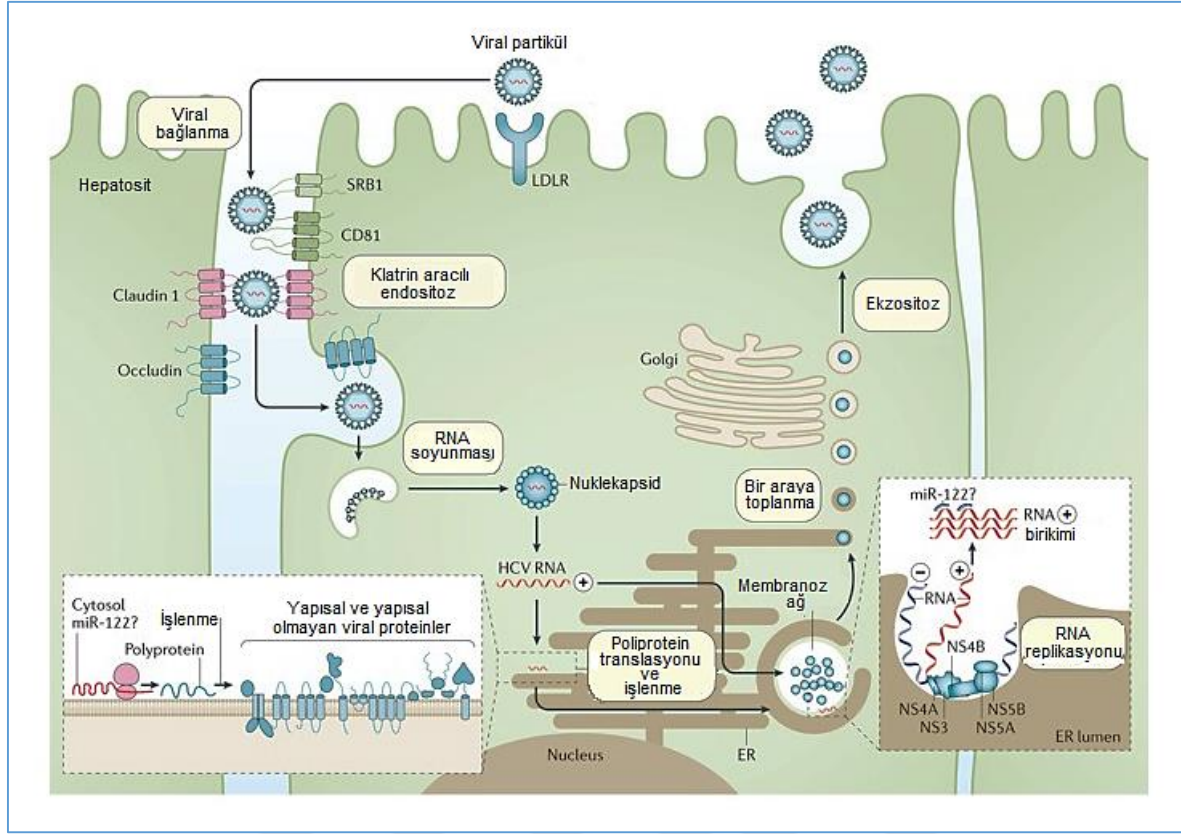
NS5B proteini 66 kDa ağırlığında ve 591 amino asit uzunluğundadır. Bu protein RNA'ya bağlı RNA polimeraz gibi davranır ve yeni RNA genomunun sentezinde önemli bir rol oynar. Bu enzimin hata düzeltme işlevinin olmaması türümsülerin (*quasispecies*) ortaya çıkmasına neden olur. NS5B viral replikasyonu düzenlemek için çok sayıda hücresel proteinle etkileşime girebilir ve bu olumlu olgular onu anti-HCV ilaç keşif programları için kesin hedef haline getirmiştir [135].

2.2.3. HCV replikasyon döngüsü

Hepatit C virüsü sadece insanları ve şempanzeleri enfekte eder. Ana hedef hücreleri hepatositlerdir, ancak B hücreleri, dendritik hücreler ve diğer hücre tiplerinin enfeksiyonu da rapor edilmiştir [136]. HCV'nin yaşam döngüsü spesifik reseptörler aracılığıyla virionların hücreye tutunması ile başlar. Hücre yüzeyindeki heparan sülfat glikosaminoglikanlar (HSPG) ve LDL reseptörler (LDL-R) aracılığıyla virüs hücre yüzeyinde yoğunlaşır ve ardından virüs ilk olarak çöpçü reseptör B1 (scavenger receptor B1; SR-B1), daha sonra CD81-claudin 1 (CLDN 1) kompleksi ve occludin (OCLN) ile etkileşir. HCV zarf glikoproteinleri ve konak hücre reseptörlerin etkileşimi virüsün klatrin aracılı endositoz ile hücre içine alınması ile sonuçlanır [133]. Endozomun asitleştirilmesi, HCV glikoprotein membran füzyonunu

indükler. Kapsit soyulması gerçekleşir ve genom sitozole salınır [136]. Ribozom 5'-NCR bölgesindeki IRES'e (Internal ribozomal entry site) bağlanır. HCV genomunun translasyonu ile önce bir poliprotein molekülü sentezlenir. Bu molekül, hücresel ve viral proteazlar tarafından kesilerek virüsün 10 adet yapısal ve yapısal olmayan proteinlerine ayrıştırılır [137]. Diğer pozitif iplikli RNA virüslerinde olduğu gibi, HCV de konak hücrenin sitoplazmik membranlarında değişikliğe neden olur. Membranlardaki bu değişiklikler membranöz ağ olarak adlandırılır. Bu yapıların oluşumu NS4B proteinine bağlıdır. Perinükleer membranlarla yakın temas içindeki membranöz ağda, yapısal olmayan proteinler ve hücresel proteinler birikerek replikasyon kompleksini oluşturur [133, 138]. Replikasyon kompleksinin organizasyonunda ve replikasyonun düzenlenmesinde NS5A proteini (replikaz faktörü) önemli bir rol oynar. Replikasyonun ilk adımı, pozitif sarmal HCV RNA replikasyonu için kalıp görevi yapan bir negatif zincirli RNA genomlarının oluşturulmasıdır. Bu işlem, NS5B RNA bağımlı RNA polimeraz tarafından katalizlenir. Negatif iplikli RNA kalıp olarak kullanılarak çok sayıda pozitif iplikli RNA üretilir [139]. Hepatit C virüsünün replikasyon döngüsü Şekil 2.14'de gösterilmiştir.

Hepatit C virüsünün bir araya gelme süreci hakkında bilinenler fazla değildir. Nükleokapsit oluşumu kapsit proteinin oligomerizasyonu ve genomik RNA'nın enkapsidasyonu ile gerçekleşmektedir. Bu süreç, kor proteinin ilk 122 aminoasitlik (özellikle de 82-102 aa) bölümünün viral RNA ile etkileşime girer. Nükleokapsit oluşuktan sonra virüs ER zarlarından tomurcuklanarak zarf yapısını kazanır ve ekzositozla hücre dışına atılır. Bu viral partiküller dolaşıma girer ya da komşu hücreleri enfekte eder [133].



Şekil 2.14. HCV replikaasyon döngüsünün şematik gösterimi. Viral bağlanma, klatrin aracılı endositoz, poliprotein translasyonu ve işlenmesi, RNA replikasyonu ve son olarak viral montaj ve salımı. ER, endoplazmik retikulum; LDLR, düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü; miR-122, mikroRNA-122; SRB1, çöpçü reseptör B1 [117].

2.2.4. Epidemiyoloji

HCV bulaş yolları ve risk faktörleri

HCV, tıbbi prosedürler veya enjeksiyonlu ilaç kullanımı için kontamine cihazları paylaşma nedeniyle esas olarak kan ve kan ürünlerine perkütan maruz kalma yoluyla bulaşır [117]. HCV 1992'den önce kan transfüzyonu ve organ nakli yoluyla yayılmıştır. Bundan sonra, kanların taramaya başlanması ile, özellikle gelişmiş ülkelerde bu yolla bulaşma hızla azalmıştır [140]. Hepatit C için en önemli risk faktörleri damar içi uyuşturucu madde kullanımı, yüksek riskli cinsel davranışlar, sağlıksız ortamlarda yapılan dövme, manikür-pedikür ve piercing, kişisel bakım aletlerinin ortak kullanımı, uzun süreli hemodiyaliz, diş tedavisi ve tıbbi girişimlerdir.

Bununla birlikte, sağlık çalışanları, kuaförler ve güzellik merkezi çalışanları gibi meslek grupları ve Hepatit C'li anneden doğan ocuklar HCV için risk altındadır [117]. Risk faktörleri coğrafi bölgelere ve çalışılan popölasyonlara göre değişiklik göstermektedir. Günümüzde Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri gibi gelişmiş ölkelerde HCV enfeksiyonu için en büyük risk, akut HCV enfeksiyonlarının %50-60'ını oluşturan güvenli olmayan intravenoz ilaç kullanımıdır [141-143]. Buna karşın, gelişmekte olan ölkelerde hala iyatrojenik nedenler ön plandadır. Ayrıca HCV enfeksiyonu olan hastaların önemli bir bölümünde (batı dünyasında %40'a kadar) hiçbir risk faktörü tanımlanamamaktadır [117].

HCV prevalansı

Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre, 2015 yılında 71 milyon kişinin Dünya çapında kronik HCV enfeksiyonu ile yaşadığını ve 399 000'in HCV enfeksiyonunun neden olduğu siroz veya hepatoselüler karsinomdan hayatını kaybettiğini tahmin ediyor. Mayıs 2016'da, 2030 yılına kadar yeni viral hepatit vakalarında %90 (teşhis edilenlerin %80'inin tedavi edilmesi) ve viral hepaitilere bağlı ölümlerde %65 azalma sağlamayı hedefleyen DSÖ Global Sağlık Stratejisi hazırlanmıştır [144].

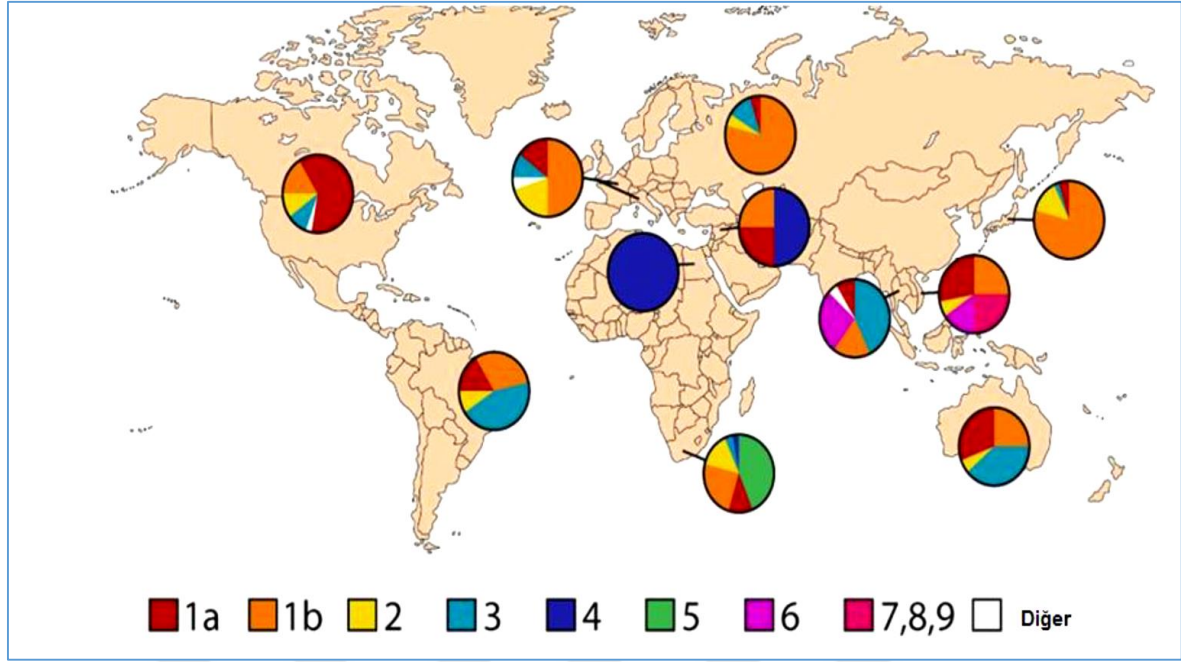
Hepatit C enfeksiyonunun global prevalansının yaklaşık %1 olduğu tahmin edilmektedir. Bununla birlikte enfeksiyon, farklı ölkelerde eşit olmayan bir şekilde dağılmıştır [145]. Batı ölkelerinde ve Avustralya'da bu oran %0,5 ila 1,5 arasındadır; Güneydoğu Asya ve Doğu Akdeniz bölgelerinde % 2,3'e [3], Orta Asya'da %2,2'ye [146], Hindistan'da %0,8'e, Pakistan'da %6,5'e ulaşmaktadır. Mısır gibi bazı ölkelerde, %15 kadar yüksektir [145, 147].

Kazakistan'da HCV prevalansı ile ilgili veriler kan merkezi ve toplum taramalarından edinilmiştir. Kazakistan genelinde HCV prevalansı genel popölasyonda %0,7-5,1 arasında değişmekte olup, ortalama %0,9'dur; orta riskli popölasyonlar arasında %2-50, ortalama %29 olarak saptanmıştır [146]. HIV/HCV koenfeksiyonlu hastalar üzerinde yapılan bir çalışmada HCV prevalansı %40,3 oranında tanımlanmıştır [148]. Hepatit C virüsü prevalansı, karaciğer ile ilgili rahatsızlıkları olan popölasyonlarda %23,8-40,4 arasında değişmekte olup, ortalama %26,6; intravenöz uyuşturucu kullananlar arasında %43,3-90,2, ortalama %60,3 olarak bildirilmiştir [146].

HCV genotiplerinin epidemiyolojik özellikleri

Diğer birçok RNA virüslerinde olduğu gibi, HCV genom düzeyinde değişkenlik göstermektedir. Genetik çeşitlilik, RNA bağımlı RNA polimeraz enziminin hata onarımı işlevinin bulunmaması ve HCV replikasyon hızının yüksek olması ile ilişkilidir [149]. Günümüzde HCV'nin 8 genotipi, 90'dan fazla alt tipi bulunmaktadır. Genotipler rakamla (1, 2, 3,...), alt tipler ise küçük harflerle (a, b, c,...) ifade edilmektedir [150]. Moleküler epidemiyolojik çalışmalar dünya çapında HCV genotipleri ve alt tiplerinin bulundukları coğrafi bölgelere göre farklılık gösterdiğini, bazı genotiplerin değişik bölgelerde daha baskın olarak görüldüğünü ortaya koymuştur [149]. Genotip 1, dünya çapında en yaygın olanı (%46) ve Avrupa, Kuzey Amerika, Avrupa ve Avustralya'da baskındır. Bunu öncelikle Güney Asya'da, özellikle Hint yarımadasında yayılan genotip 3 (%22) takip etmektedir [151, 152]. Genotip 2, 4 ve 6 vakaların yaklaşık %23'ünden sorumluyken, genotip 5 ve 7 %1'in altındadır [153]. Sadece genotip 1b tüm HCV enfeksiyonlarının %22'sinden sorumlu olduğu bilinmektedir [151]. Genotip 4, Orta Doğu ve Afrikadaki birkaç ülke ile sınırlıyken, genotip 5 Güney Afrika'da, genotip 6 ise Güney Doğu Asya ülkelerinden Laos ve Vietnam'da görülmüştür [149]. Genotip 7 enfeksiyonu 2006 yılında Demokratik Kongo Cumhuriyeti kaynaklı bir göçmenden Kanada'da izole edilmiştir [154]. Hindistan'ın Pencap kentinden Kanada'ya göç eden 4 hastadan 2018 yılında HCV'nin yeni genotipi (genotip 8) saptanmıştır [155]. Hepatit C virüsünün genotiplerinin dünyadaki dağılımı Şekil 2.15'te gösterilmiştir.

Yapılan çalışmalara göre, 1b ve 3a Kazakistan'da dolaşan baskın HCV genotipleri olduğu bildirilmiştir [156-158].



Şekil 2.15. HCV genotiplerinin dünyadaki dağılımı [62].

2.2.5. Klinik bulgular

Akut HCV enfeksiyonu

Virüs alındıktan sonra inkübasyon süresi ortalama 6-12 haftadır. Akut HCV enfeksiyonu, maruz kaldığı altı ay içerisinde ortaya çıkan belirti ve semptomları ifade eder. Hastaların %75'i asemptomatiktir, buna karşın %25 olguda, ateş, halsizlik, iştahsızlık, karın ağrısı, bulantı, kusma ve sarılık gibi semptomlar ortaya çıkar [159]. Hepatit C bulaşmış insanların yaklaşık %15-30'ı, tedavi edilmeden vücutlarından temizlenir ve kronik enfeksiyon gelişmez. Akut HCV seyri değişkendir. Alanin aminotransferaz (ALT) düzeylerinde yükseklik olması ve bu düzeylerde dalgalanmalar olması en önemli karakteristik özelliğidir. Hastaları iyileşmesiyle ALT düzeyleri normale dönebilir [160]. Akut hepatit C enfeksiyonu tanısında altın standart, daha önce negatif olan anti-HCV'nin pozitifleşmesi ve HCV RNA pozitifliği ile birlikte karaciğer enzim (özellikle ALT) yüksekliğidir [159, 160].

Kronik HCV enfeksiyonu

Hastaların %50 ila %80'inde virüs persiste kalmakta ve kronik enfeksiyon (altı ay sonra saptanabilir virüs) gelişmektedir. Kronik hastalığı olan kişilerin %20'sinde siroz, son dönem KC hastalığı ve/veya hepatoselüler karsinomaya ilerlemektedir

[161]. Kronikleşme oranı yaşa bağlıdır. Hepatit B enfeksiyonlarının aksine HCV enfeksiyonlarında yaş ilerledikçe kronikleşme riski artar. Ayrıca akut enfeksiyon sonrası yüksek oranda kronikleşme görülmesi virüsün genetik çeşitliliği, hızlı mutasyon eğilimi, yüksek viral yük, virüsün bulaş şekli ve konağa ait ileri yaş, erkek cinsiyet, siyah tenli olmak, IL28B polimorfizmi, immünsupresyon ve bozulmuş immün yanıt gibi birçok faktörlere bağlıdır. Hastalarda serum HCV RNA seviyeleri sabit; serum ALT seviyeleri semptomlardan bağımsız olarak dalgalanmalarla seyreder [162].

2.2.6. HCV tanı

Hepatit C enfeksiyonlarının virolojik/serolojik tanısında antijen testleri, antikor testleri ve nükleik asit testleri (NAT) ve HCV direnç testi yaygın olarak kullanılmaktadır.

Antijen testleri

Hepatit C virüsünün kor antijeni (HCV-cAg), viral RNA'nın pozitifleşmesinden 1-2 gün sonra, yani bulaşı izleyen 28.günde ortaya çıkmaktadır [116]. HCV-cAg testleri, özgül monoklonal antikorlar kullanılarak HCV kor antijenlerinin saptanmasına dayanır [163]. Akut veya kronik HCV enfeksiyonunu teşhis etmek için HCV RNA tespiti yerine kor antijen tespiti kullanılabilir [164]. Bu testin en önemli avantajı, moleküler yöntemlerle kıyaslandığında ucuz ve kolay uygulanabilmesidir. Ancak duyarlılığının yeni kuşak HCV RNA testlerinden daha düşük olduğu bilinmektedir [165].

Antikor testleri

Anti-HCV enfeksiyonu takiben 4-10 hafta sonra pozitifleşmektedir [163] Pozitif bir HCV antikor testi: aktif enfeksiyon, geçirilmiş olan HCV enfeksiyonu (iyileşmiş) veya yanlış pozitifliği göstermektedir [166]. Anti-HCV pozitifliği, bağışıklık göstergesi değildir bireyin herhangi bir zamanda HCV ile karşılaştığını göstermektedir. HCV tanısında en önemli sorun; anti-HCV ve HCV RNA testlerinin, hem akut, hem de kronik ve geçirilmiş hastalık sırasında pozitif olmasından dolayı ayırımın yapılmasındaki zorluktur [116]. Anti-HCV antikorlarının saptanmasında en sık

kullanılan serolojik yöntem enzim immünoessey (EIA) yöntemidir. Ancak erken akut hepatit C ve bağışıklığı baskılanmış hastalarda EIA sonuçları negatif olabilir Bu nedenle kuşkulu durumlarda HCV RNA'nın araştırılması gereklidir [164]. Günümüzde anti-HCV taraması amacıyla üçüncü kuşak EIA kullanılması önerilir. Üçüncü kuşak EIA testlerde; virüsün çekirdek ve yapısal olmayan NS3, NS4, NS5 antijenlerine bağlanan antikorları saptar ve sonuçlar, eşik değer absorbansı ile karşılaştırılarak pozitif ya da negatif (kalitatif) olarak rapor edilmektedir. Testlerin duyarlılıkları bağışıklığı normal kişilerde %98'e, özgüllükleri ise 99'a kadar ulaşmaktadır [116, 166, 167]. Anti-HCV tespitinde kullanılan kemilüminesans immünasey (CIA) yöntemleri de üçüncü kuşak EIA ile benzer duyarlılığa ve özgüllüğe sahiptir [168].

Rekombinant İmmünoblot Deneyi (RIBA) tarama sonrası pozitif bulunan sonuçların doğrulanması için kullanılmıştır; ancak artık ABD'de uygulanmamaktadır. Bu test, pozitif, negatif veya belirsiz olarak yorumlanan sonuçlar sağlar. RIBA yöntemi kullanıldığı dönemlerde, özellikle anti-HCV pozitif, HCV RNA negatif olan hastalarda geçirilmiş enfeksiyon ya da yanlış EIA sonuçlarının ayırt edilmesinde yararlı olmuştur [169].

Son yıllarda anti-HCV tespitinde hızlı İmmünokromatografik (ICT) testleri de geliştirilmiştir. Bunlardan biri olan OraQuick (OraSure Technologies) HCV Antikor Testi, ven veya parmak çubuğu ile elde edilen tam kan numunelerinin kullanıldığı, FDA onaylı bir testtir [170]. Bu test tarama amacıyla üçüncü kuşak ELISA'ya alternatif olarak kullanılabilir ve 20-40 dakikada sonuç verir [171].

Nükleik asit testleri

Nükleik asit testleri (NAT) HCV enfeksiyonunun tanısında kullanılan en duyarlı yöntemdir. HCV RNA etkenle temastan 1-2 hafta sonra pozitifleşmektedir [163]. HCV tanısında ve izleminde çeşitli viral nükleik asit tarama yöntemleri vardır. Bunlar temel olarak kalitatif, kantitatif ve genotiplemede kullanılan testler olarak üçe ayrılabilir [172].

Kalitatif NAT: Günümüzde, kalitatif testler çoğunlukla kan bankacılığında kullanılmaktadır ve özellikle pencere dönemindeki olguların yakalanması açısından

bir avantaj sağlamaktadır. Pencere dönemini, üçüncü kuşak EIA testlerine göre 35 gün kadar kısalttığı bildirilmiştir. Sonuçlar pozitif/negatif şeklinde verilmektedir.

Kantitatif NAT: Bu testler HCV viral yükünün ve tedavi süresinin belirlenmesinde kullanılır. Yöntem olarak sinyal amplifikasyon (branched DNA yöntemi (bDNA)) ya da hedef amplifikasyon (kompetitif PCR veya real-time PCR) yöntemleridir.

Genotipleme yöntemleri

Kronik hepatit C tanısı almış hastalarda tedavi seçeneklerinin ve süresinin belirlenmesi için tedavi öncesinde HCV genotip ve subtip tayını yapılmalıdır [163]. Hepatit C virüsü genotiplerinin belirlenmesinde çok sayıda yöntem kullanılmaktadır. HCV genotipinin belirlenmesi için referans metot, “in-house” teknikleri ile HCV genomunun E1 veya NS5B gibi yüksek oranda korunmuş bölgelerinin doğrudan sekanslanması, ardından prototip sekanslar ve filogenetik analiz ile dizi hizalanmasıdır. Bu teknikler, tam alt tipten gerekli olduğu moleküler epidemiyoloji çalışmalarda kullanılmalıdır. Klinik uygulamada HCV genotiplemesi 5'UTR bölgenin doğrudan dizi analizi kullanılarak veya 5' kodlamayan bölgede bulunan genotipe spesifik problemler kullanılarak ters hibridizasyon analizi kullanılarak çeşitli ticari kitler tarafından belirlenebilir [118, 173].

HCV direnç testi

İlaç direnci, HCV'deki bazı proteinlerin mutasyonları, virüsün, genellikle dirençle ilişkili varyantlar (RAV'lar) veya dirençle ilişkili polimorfizmler (RAP'lar) olarak adlandırılan doğrudan etkili antivirallere (DAA) direnç göstermesine izin verebilir [174]. RAV'lar virolojik tedavi yetmezliği ile ilişkili olabilir. Bununla birlikte, virolojik tedavi başarısızlığı tipik olarak, yalnızca diğer negatif prediktif konak veya viral faktörler aynı anda mevcutsa, antiviral ajanlara duyarlılık azalırsa veya tedavi süresi optimal değilse ortaya çıkabilir [175]. HCV direnç testi, başka bir DAA rejimi ile yeniden tedaviye başlamadan önce, daha önce DAA içeren bir rejimde başarısız olan çoğu hastada yapılır. Örneğin, genotip 3 hastalarına sofosbuvir / velpatasvir ile yeniden tedaviye başlamadan önce tedavi deneyimlendiyse ve ribavirin gerekip gerekmediğini belirlemek için RAV testi yaptırmaları önerilir. Bazen tedaviyi naif

hastalarda, rejimi veya tedavi süresini değiştirebiliyorsa HCV direnç testi yapılır [174-176].

2.2.7. Tedavi

Akut HCV’de kombinasyon tedavisi yararlı olmakla birlikte, enfeksiyonun kendiliğinden düzeliş düzelemediğini belirlemek için ertelenebilir [159]. Uzun yıllar boyunca kronik hastalarda tedavi pegile interferon (pegIFN) (enjeksiyon şeklinde) ve ribavirin (RBV) (oral hap olarak) kombinasyonunun kullanımına dayanıyordu. Bu tedavi rejimine yanıt oranı virüs genotipi ile belirlenmiştir. Genotip 1, interferon tedavisine diğer HCV genotiplerinden daha dirençlidir. IFN ve RBV tedavisinin yan etkilerinin fazla, etkinliğinin ise sınırlı olması nedeniyle yeni direkt etkili antiviral ajanlar (direct-acting antiviral; DAA) geliştirilmiştir [135, 139]. Mayıs 2018 itibarıyla, FDA veya Avrupa İlaç Ajansı (European Medicines Agency; EMA), dört sınıftan 13 direkt etkili antiviralleri onayladı (Çizelge 2.6). Bu DAA’ların birçoğu sabit dozda haplar halinde mevcuttur. HCV enfeksiyonu olan çoğu kişiyi DAA’lar ile tedavi edebilir ve sirozun yokluğuna veya varlığına bağlı olarak tedavi süresi kısadır (genellikle 12 ila 24 hafta).

Çizelge 2.6. Direkt etkili antiviraller [144]

NS3/NS4A (proteaz) inhibitörleri	NS5A inhibitörleri	NS5B polimeraz inhibitörü (nükleotid analoğu)	NS5B polimeraz inhibitörleri (non-nükleotid analoğu)
Glecaprevir	Daclatasvir	Sofosbuvir	Dasabuvir
Voxilaprevir	Velpatasvir		
Grazoprevir	Ledipasvir		
Paritaprevir	Ombitasvir		
Simeprevir	Pibrentasvir		
	Elbasvir		

2.3. Hepatit D Virüsü

2.3.1. Tarihçe

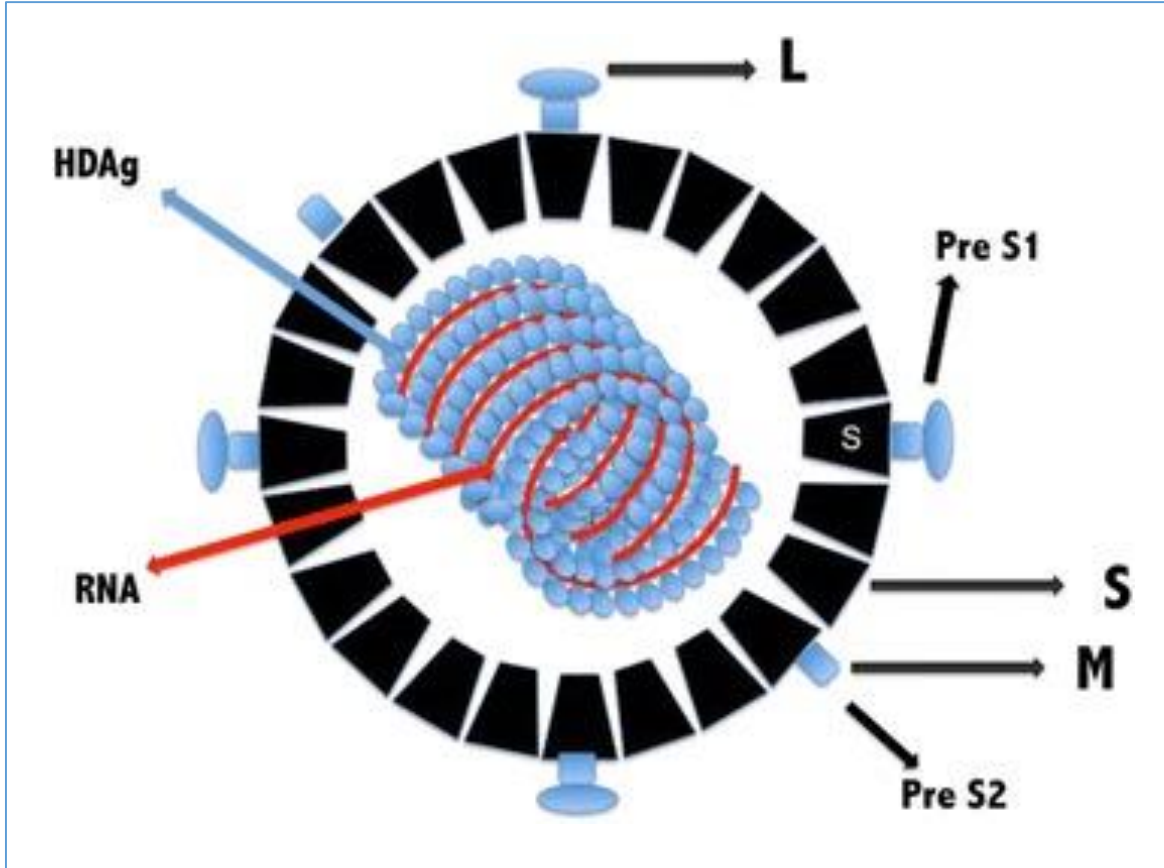
Hepatit Delta Virüsü (HDV) 1970’li yıllarda Mario Rizzetto ve diğerleri tarafından kronik hepatit B hastalarının karaciğerlerinde bir nükleer antijen olarak bulunmuştur. Bu antijen, KHB hastalarının karaciğerinden eksprese edilen hepatit B kor antijenine (HBcAg) benzediği için başlangıçta HBV’nin başka bir komponenti olduğu

düşünülmüştür [177]. Fakat daha sonra şempanzelerde yapılan aşı amaçlı çalışmalarda delta antijeninin HBV antijeni olmadığı HBV'ye bağlı RNA genomuna sahip başka bir virüse ait olduğu anlaşılmıştır. Bu nedenle yeni tanımlanan virüs hepatit delta virüsü (HDV) olarak adlandırılmıştır [178]. HDV'nin kökeni şu anda bilinmemektedir [8]. HDV bazı özellikleri açısından bitki patojenleri ve viroidlerine benzemektedir [179]. HDV, ribonükleoproteinini paketlenmesi için zarf proteinlerini kodlamaz ve tipik olarak viryon montajı, zarflama ve hücresel iletim için HBV'nin yüzey antijenlerine gereksinim duyar [8]. Alternatif olarak, HDV RNA, çok daha çeşitli hücre tiplerinde ve türlerinde kendi kendine replike olabilir [180, 181]. Ayrıca herhangi bir hepadnavirüs yokluğunda insan dışı türlerde HDV ile yakından ilişkili virüsler bulunmuştur [182, 183]. Bununla birlikte, primer Sjögren sendromlu hastaların, HBsAg veya HBV antikollarının yokluğunda tükürük bezlerinde HDV antijeni ve RNA tespit edilmiştir [184]. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada in vitro olarak, vezikülovirüs, flavivirüs ve hepakivirüs dahil olmak üzere çeşitli virüs türlerinden zarf glikoproteinleri HDV ribonükleoproteinini paketleyebildiği gösterilmiştir [8].

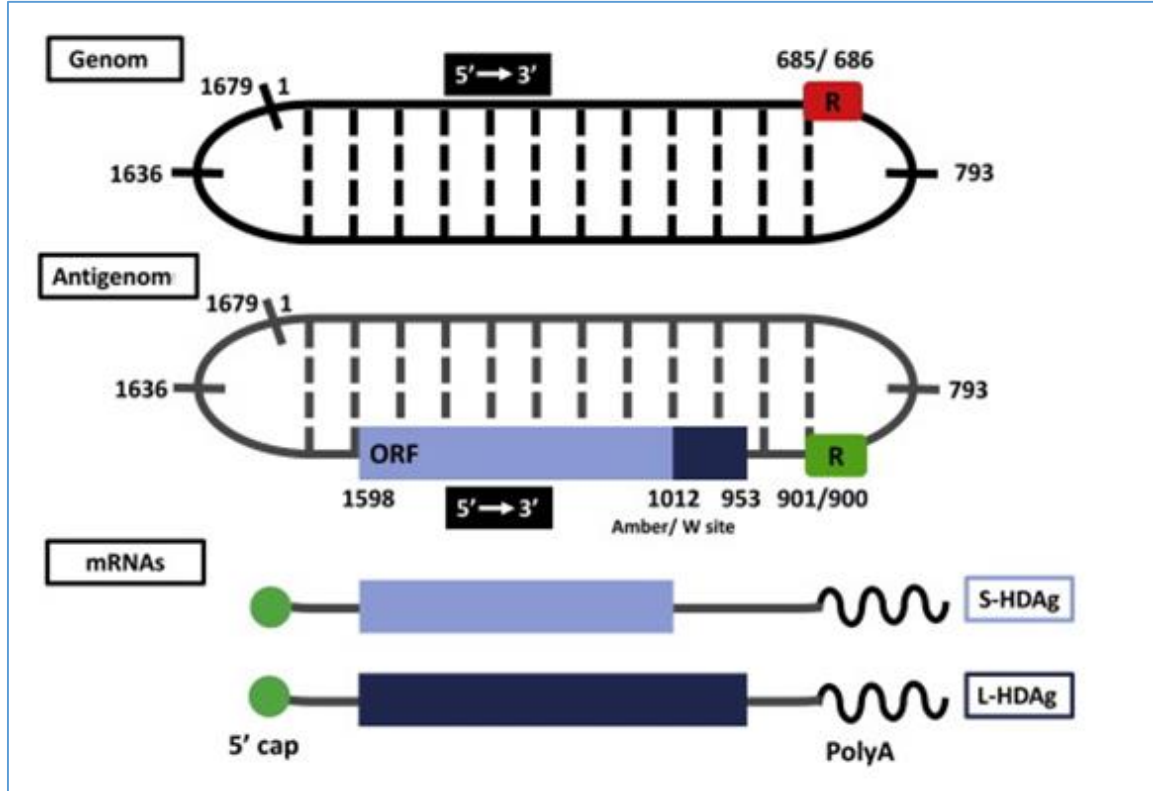
2.3.2. Sınıflandırma ve virüs yapısı

Deltavirüs cinsinin tek üyesi olarak sınıflandırılan HDV küçük ve defektif (satellit) bir RNA virüsüdür. HDV ortalama 36-43 nm çapında olup, dış tabakası HBV'ye ait üç zarf proteini (L, M ve S antijenleri) ve konak hücre lipidlerini içermektedir. Viral yapı Şekil 2.16'da gösterilmiştir. Nukleokapsid, hepatit delta antijeni (HDAg) ve yaklaşık 1700 nükleotidden oluşan tek iplikli sirküler RNA molekülünden oluşmaktadır [185]. HDV RNA bugüne kadar tanımlanan en küçük hayvan virüs genomudur. RNA dizisindeki yüksek GC oranından dolayı, %74 oranında intramoleküler baz eşleşmesi yaparak dallanmamış çomak şeklinde ikincil yapı oluşturur [186]. Antigenom olarak da adlandırılan komplementer virüs RNA'sında tek ORF (open reading frame) tanımlanmıştır. Bu ORF, S-HDAg'yi kodlayan 0,8 Kb'lık mRNA'ya transkribe edilir [179]. HDV antijeni HDV tarafından kodlanan tek proteindir. İki HDAg vardır: 214 aminoasitten oluşan 27 kDa'lık büyük formu (L-HDAg), ve 195 aminoasitten oluşan 24 kDa'lık küçük formu (S-HDAg). L-HDAg adenoazin deaminaz enzimi sayesinde 19 aminoasit daha fazla okunarak oluşturulmaktadır. S-HDAg,

RNA replikasyonunu uyarır ve ribozim aktivitesini pozitif olarak düzenler [187]. L-HDAg ise RNA sentezini baskılar ve yeni virionların oluşmasında görev alır. HDV'nin bir diğer önemli özelliği de hem genomik hem de antijenomik HDV RNA'sının (85 nukleotidden oluşan) ribozim aktivitesine sahip olmasıdır [179]. Hepatit D virüsünün genom yapısı Şekil 2.17'de gösterilmiştir.



Şekil 2.16. HDV'nin şematik gösterimi. HBV yüzey antijenine sarılmış Hepatit D virüsü. Dış HBsAg siyah renktedir. Üç yüzey proteini L (preS1 veya büyük), M (preS2 veya orta) ve S (küçük). Merkezi kısımda, HDAg (HDAg-S ve HDAg-L) mavi renkte ve tek sarmallı RNA kırmızı renkte gösterilmiştir [186].



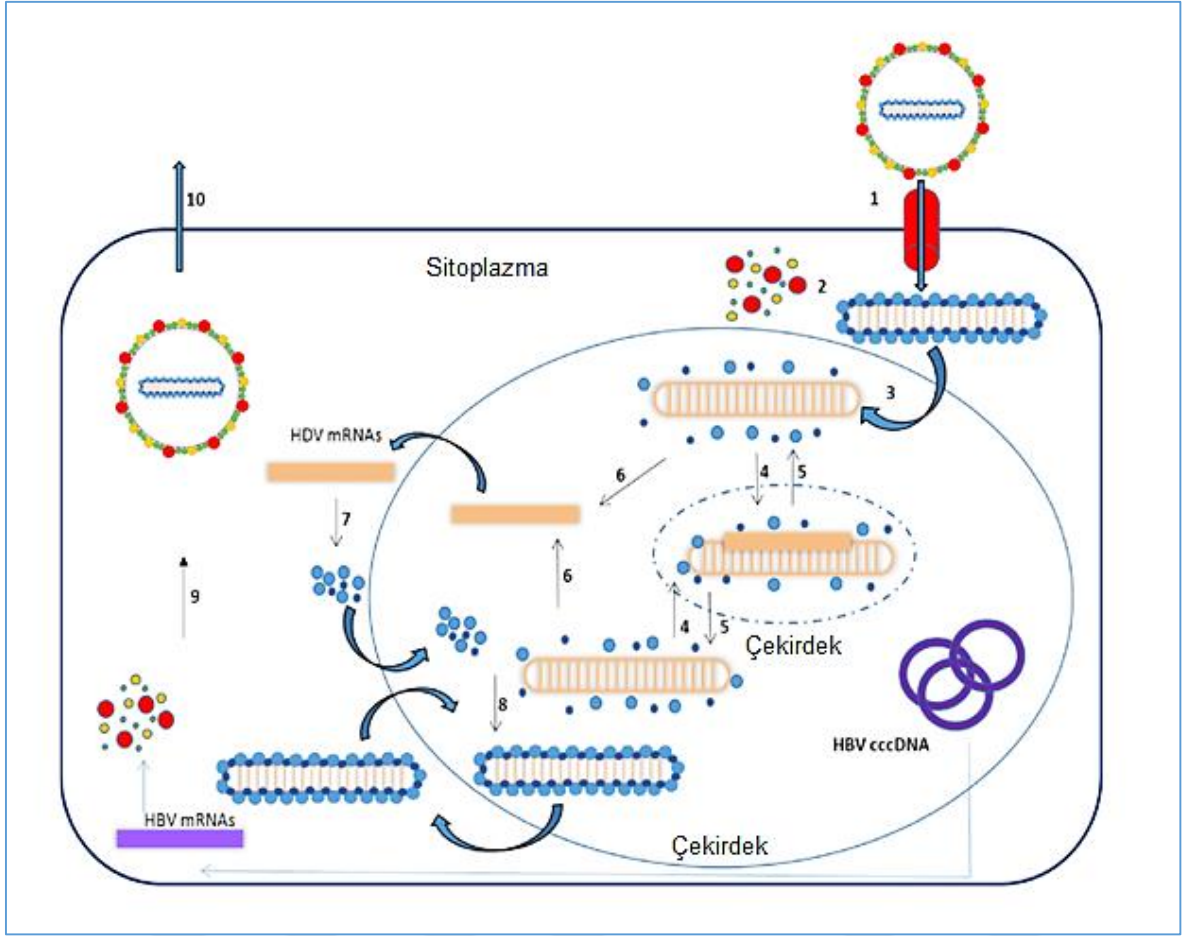
Şekil 2.17. HDV genom yapısı ve organizasyonu. Hem genom hem de antigenom, intramoleküler baz eşleşmesi nedeniyle 1700 bp dallanmamış çubuk benzeri bir yapı oluşturur ve kendi kendine parçalanabilir bir ribozim (R) içerir. Antigenomik RNA, HDAg için açık okuma çerçevesini (ORF) içermesine rağmen, antijen, 800 bp mRNA'dan çevrilir. HDV mRNA, RNA-Pol II tarafından genomdan transkripsiyonlanır ve bir mRNA 5' kapak ve 3' polyA kuyruğu içerir. S-HDAg düzenlenmemiş mRNA'lardan çevrilirken, Amber/W bölgesinin ADAR1 tarafından antigenom düzenlenmesi L-HDAg'ya yol açar [188].

2.3.3. HDV replikasyon döngüsü

Delta virüsünün zarfı HBV yüzey antijenlerini içerir ve bu nedenle HDV'nin hepatositlere HBV ile aynı mekanizmalar yoluyla girdiği düşünülmektedir [189]. Her iki virüs için de giriş önce preS1 alanının heparin sülfat proteoglikanlarının (HSPGs), ardından NTCP reseptörlerine bağlanması eşlik eder (Şekil 2.18). Giriş dışında HBV ve HDV replikasyonu tamamen bağımsız gibi görünmektedir [188]. HDV simetrik, viroidlerinkine benzer 'rolling circle' mekanizma ile çoğalır. Girişin ardından zarfı soyulan nükleokapsid, HDVAg'de yer alan sinyal yardımıyla hücre çekirdeğine taşınır. RNA replikasyonu sadece çekirdekte meydana gelir ve

HDVAg'nin polimeraz aktivitesi yoktur, viral replikasyon hücresel RNA polimerazla (muhtemelen RNA pol II) yürütülür [190]. Kalıp görevi gören genomik RNA'lardan, antigenomik polariteye sahip lineer transkriptler sentezlenir; ardından bu yapılar otokatalitik parçalanmalara uğrar (ribozim aktivitesi) ve tekrar bir araya gelerek dairesel antigenomik RNA oluşumuna neden olur. Böylece enfekte hepatositlerde 3 farklı yapıda HDV RNA ortaya çıkar: en yüksek miktarda bulunan genomik RNA, daha az sayıda antigenomik RNA ve en az miktarda 0,8 kb'lık mRNA. Değişik RNA'ların oluşması farklı subsellüler lokalizasyonda farklı polimerazlar kullanılması ile bağlıdır [24]. Antigenomik RNA oluşmasında RNA polimeraz I rol oynarken, genomik RNA'nın oluşmasında ise RNA polimeraz II görev almaktadır.

Sonra mRNA sitoplazmaya geçerek ER'de HDAg sentezi için kalıp görevi görür. Viral mRNA'ların ilk oluşturan ürünü S-HDA'dir. Ayrıca replikasyon sırasında stop kodonunda değişiklik meydana gelmesiyle L-HDAg oluşmaktadır. Yeni sentezlenen HDV antijenleri çekirdeğe döner. S-HDAg, replikasyonu uyarır ve ribozim aktivitesini pozitif yönde düzenler. Her iki HDAg de (hem S, hem L-HDAg) yeni genomik RNA'larla birleşerek ribonükleoproteinleri (RBP) oluşturmaktadır. Meydana gelen RNP'ler sitoplazmaya geçer. L-HDAg ile ER'de HBV zarf proteinleri ile birleşerek yeni virüs partikülleri oluşur. Enfeksiyöz partiküller hem L-HBsAg hem de S-HBsAg ile sarılır. Prensip olarak, HDV zarflama için sadece S-HBsAg gereklidir (ayrıca L-HBsAg gerektiren HBV'nin aksine), ancak L-HBsAg enfektivite için çok önemli olduğundan, sadece S-HBsAg ile kaplanmış parçacıklar bulaşıcı değildir ancak enfekte hastalarda viral yüke katkıda bulunabilirler. Yeni sentezlenen virionlar hücreden trans-Golgi ağı yoluyla salınır ve yeni enfeksiyon döngüsünü başlatır [191].



Şekil 2.18. HDV yaşam döngüsünün şematik gösterimi. 1.İnsan hepatositlerinde reseptörlere bağlanma; 2.Kılıfından sıyrılma; 3.Ribonükleoprotein partikülünün çekirdeğe translokasyonu; 4.Nukleusta antigenomun kopyalanması; 5.Nukleoplazmada genomik RNA üretimi; 6.mRNA'nın kopyalanması; 7.HDAg'nin translasyonu; 8.Ribonükleopartikül montajı; 9.Sitoplazmada virion oluşumunda HBsAg ile etkileşimi; 10.Virion salınımı; HBV cccDNA: HBV kovalent olarak kapalı dairesel DNA, HBV mRNA'lar: HBV haberci RNA'lar [192].

2.3.4. Epidemiyoloji

Delta virüsünün bulaşma yolu HBV ile genel olarak benzerdir. En sık parenteral yoldan bulaşır. Endemik bölgelerde bulaşma esas olarak kötü hijyen koşulları ile ilişkili olarak aile içi ve iatrojenik yayılım yoluyla gerçekleşir [193]. Kuzey yarımküredeki düşük endemik bölgelerinde, intravenöz ilaç kullanımı ana bulaşma yoludur [194]. Cinsel bulaşma, HBV veya HIV'den daha az sıklıkta görülmesine

rağmen, Tayvan gibi HBV enfeksiyonunun endemik olduğu bölgelerde önemli gibi görünmektedir [195].

Hepatit D enfeksiyonu tüm dünyada görülebilir. Ancak kliniği, insidansı, prevalansı ve epidemiyolojik özellikleri coğrafi bölgelere göre değişiklik göstermektedir [187]. Delta virüsü insidansı ve prevalansı üzerine az sayıda popülasyon temelli çalışma mevcuttur. Hepatit D enfeksiyonu olan küresel bireylerin sayısına ilişkin önceki tahminler 5 ila 20 milyon arasında rakamlar sağlamıştır (HBsAg pozitiflerin %5'i) [196, 197]. Ancak 2018 yılında yapılan bir meta-analizde, şaşırtıcı bir şekilde 62-72 milyon insanın dünya çapında HDV ile yaşayabileceğini öne sürmüştür (genel popülasyonda %0,98, HBsAg pozitif hastalarda yaklaşık %11) [194]. Çok yakın zamanda yapılan diğer bir meta-analiz çalışmasında, tahmini anti-HDV prevalansı tüm HBsAg pozitif kişilerde %4,5 ve hepatoloji kliniklerine başvuranlar arasında %16,4 olarak saptanmıştır. Dünya genelinde toplam nüfusun %0,16'sının HDV pozitif olduğu tahmin edilmektedir [198]. Bu tahminler, daha önce düşünülenlerden çok daha yüksek ve hala tartışılan bir hastalık yükü anlamına gelmektedir. Gerçekten de, heterojen ve standart olmayan tarama uygulamaları ve birçok endemik alanda tanı testlerine erişilememesi nedeniyle HDV enfeksiyonunun kesin global prevalansı bilinmemektedir [189]. Hepatit B enfeksiyonuna bağlı olarak dünya HDV açısından dört endemik bölgeye ayrılmaktadır (Çizelge..) [199]. Moğolistan'da HDV, dünya çapında bildirilen en yüksek prevalansa karşılık gelen HBsAg-pozitif bireylerin %60'ını enfekte eder [200]. Etkilenen diğer bölgeler arasında Amazon havzası (%22,37)[201], Batı Afrika (Gabon %25, Kamerun %46) [202, 203], Akdeniz havzası (%27) [204] ve Doğu Avrupa (Romanya %23,1) [205] bulunmaktadır. Kazakistan'da HDV'nin prevalansı hakkında güncel bilgi yoktur. Nersesov ve diğerleri Kazakistan'da 297 karaciğer sirozu olan hastayı analiz etmişler ve vakaların %30'unda HDV saptandığını ortaya koymuşlardır [206]. Bununla birlikte aynı araştırmacılar, Güney Kazakistan bölgesinde yaptıkları çalışmada HBsAg pozitif bireylerde HDV prevalansını %1,6 olarak saptamıştır [14] .

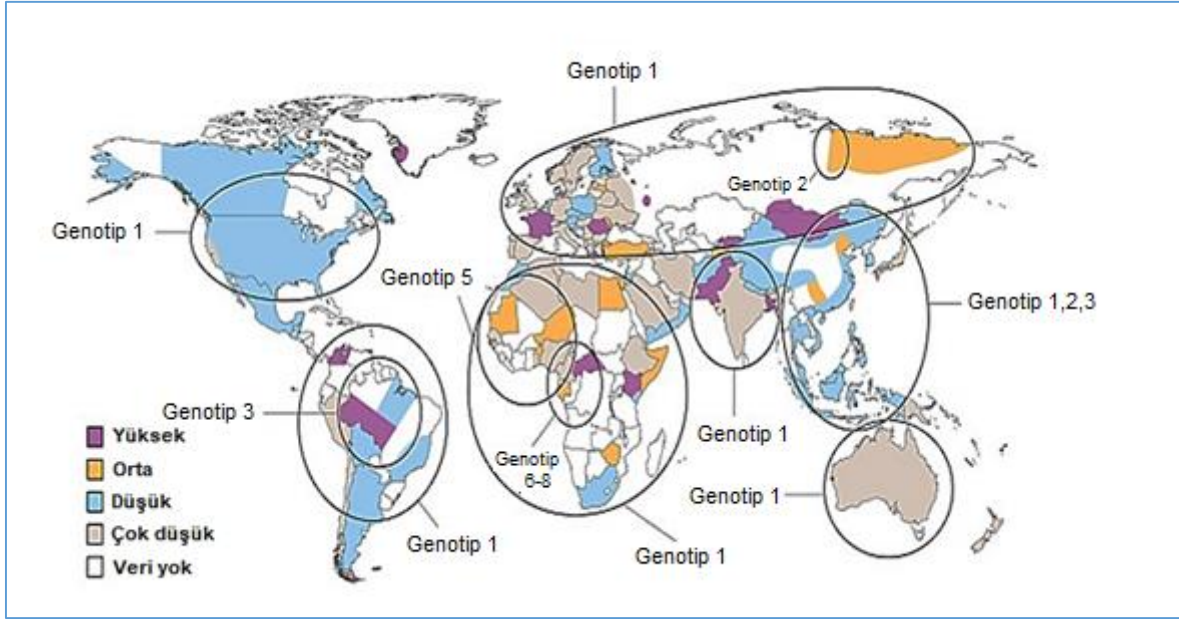
Çizelge 2.7. HDV epidemiyolojisinde endemik dağılım [199]

Endemisite	Ülkeler	Anti-Delta	
		HBsAg taşıyıcıları	Kronik Hepatit B
Yüksek	Ortadoğu, Afrika ve Amazon Havzası	>%20	>%60
Orta	Türkiye, Mısır, Kazakistan, Türkmenistan ve Özbekistan.	%10-19	%30-60
Düşük	Güney Afrika, Alaska ve Japonya.	%3-9	%10-25
Çok düşük	Güney Afrika, Alaska ve Japonya.	% 0-2	<%10

HDV genotiplerinin epidemiyolojik özellikleri

Sekiz ana HDV genotipi tanımlanmıştır (Şekil 2.19). Genotipler arasında tüm genomdaki nükleik asit dizisi açısından %40, HDAg'deki aminoasit dizisi bakımından %35 civarında farklılık vardır [207]. Genotip 1 dünya çapında yaygın bir şekilde dağılmıştır. Genotip 2 Japonya [208], Tayvan [209] ve Rusya'dan [210], genotip 3 Brazelya'dan [211], genotip 4 Japonya [212] ve Tayvan'dan [213], genotip 5, 6, 7 ve 8 ise Afrika'dan izole edilmiştir [203, 214]. Yapılan bir çalışmada Kazakistan'da yaygın HDV genotipinin HDV-1(%100) olduğu bildirilmiştir [215].

Delta virüs genotipleri hastalığın seyrini etkilemektedir. HDV genotip 1 hastalığın hem ılımlı hem de şiddetli formunda gözlemlenirken, HDV genotip 2 ile enfekte kronik HDV enfeksiyonunun seyri daha ılımlıdır [216]. Fülminan hepatitten sorumlu olan tip ise genotip 3'tür [187]. Genotip 3, özellikle Orta ve Güney Amerika'da daha sıktır [211].



Şekil 2.19.HDV prevalansı ve genotipik dağılımını gösteren dünya haritası [217].

2.3.5. HDV Patogenez

Hepatit D virüs enfeksiyonunun patogenezi hakkında çok az şey bilinmektedir [218]. HDV sadece hepatositlerde replike olur ve bu nedenle HDV enfeksiyonu ile ilişkili hücresel hasar başlıca karaciğerde oluşur [219]. Virüsün karaciğer hasarını oluşturmada, diğer viral hepatitlerde olduğu gibi burada da immün mekanizmanın rol oynadığı düşünülmektedir [199]. Hepatit B virüsü enfekte hepatositlere doğrudan sitopatik olmasa da, HDV'nin özellikle S-HDAg ile ilişkili doğrudan sitopatik etkileri olabilir [218]. L-HDAg sitotoksik değildir; HDV'nin devamlılığını (kronisite) sağlar ve böylece hepatositleri immün aracılı hasara uygun hale getirir [219]. Patogeneizde potansiyel olarak rol oynayan diğer faktörler HDV ve HBV genotipleri, fulminan hepatitte gösterilen spesifik HDAg türlerinin ortaya çıkması, HDV'nin HBV üzerinde stabil veya dalgalanan bir baskınlığı ve diğer virüslerle koenfeksiyonlardır [220].

2.3.6. Klinik

Akut HDV enfeksiyonun klinik özellikleri

Hepatit D enfeksiyonlarının kronikleşmesinde rol oynayan faktörler hala net olarak bilinmemektedir. Virüse maruz kaldıktan sonra hastalığın gelişmesi 3-7 haftalık kısa bir inkübasyon gerektirir [221]. Akut HDV enfeksiyonu, HBV koenfeksiyonu (HBV ve

HDV ile eşzamanlı enfeksiyon) veya süper enfeksiyon (önceden var ve devam etmekte olan HBV enfeksiyonundan sonra HDV enfeksiyonu) yoluyla ortaya çıkabilir. Akut koenfeksiyonun klinik seyri, akut HBV enfeksiyonunun klinik seyrine benzer ve kendi kendini sınırlayıcı bir hepatite yol açar. Bununla birlikte, koenfeksiyon, akut karaciğer yetmezliği riskinin artmasıyla daha ciddi hastalıklara neden olur [218]. Akut hepatit kendini monofazik (bir faz) ve bifazik (iki farklı faz) olarak gösterebilir; ilk faz HBV titrelerine, ikincisi HDV titrelerine bağlıdır [222]. Olguların %95'inde iyileşme görülür [186]. Akut HDV süperenfeksiyonu, akut koenfeksiyona kıyasla daha şiddetli bir klinik seyir gösterir ve akut karaciğer yetmezliği riski artar [222]. ALT, AST seviyeleri azalmış veya artmış olabilir ve klinik gidiş çok hızlıdır [219]. HDV ile süperenfeksiyonda inkübasyon süresi daha kısadır ve vakaların %70-80'ninden fazlasında kronik HDV enfeksiyonu oluşur [221].

Kronik HDV enfeksiyonun klinik özellikleri

Kronik HDV enfeksiyonu sıklıkla HDV süperenfeksiyonu, nadiren HBV/HDV koenfeksiyonu sonucu oluşur. Bu iki form klinik veya morfolojik olarak ayırt edilemez [219]. Kronik HDV, siroza doğru daha hızlı ilerleme ve daha yüksek dekompanseasyon ve mortalite riski ile en şiddetli kronik viral hepatit formu olarak kabul edilir [189]. Kronik HDV kliniği her hastada farklılık gösterir. Hastaların %10-15'inde 2 yıl içinde, %80'inde 5-10 yıl içinde siroza gidiş bildirilmiştir [223]. Sirozun bir komplikasyonu olan HSK riski, HBV monoenfeksiyonu olan hastalara göre koenfekte hastalarda 3 kat, hepatik dekompanseasyon gelişme olasılığı ise 2 kat daha fazladır [223-225]. Siroz geliştikten sonra hastalık stabil kalabilir veya siroz komplikasyonları gelişebilir, bazı hastalarda karaciğer yetmezliği oluşabilir. Bununla birlikte kronik HDV'li hastalarının büyük çoğunluğunda ALT, AST düzeyleri yüksek olabilir, splenomegali ve yüksek viremi görülebilir [219].

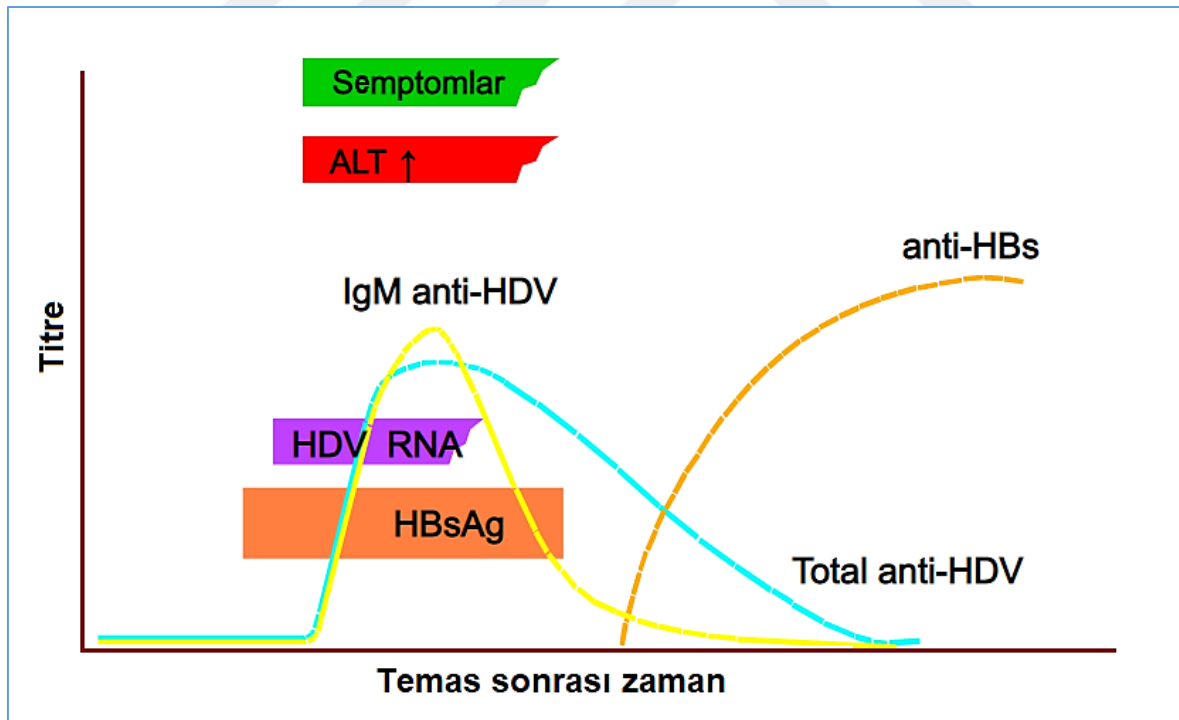
2.3.7. HDV tanı

Delta virüs tanısında ilk adım, HBsAg pozitif bireylerde HDAg'e karşı antikorların taranmasıdır (anti-HDV IgM ve IgG). Pozitif sonuç alındığında, bir sonraki adım nükleik asit testleriyle HDV replikasyonu (HDV RNA) gösterilmelidir [186]. HDV RNA, akut dönemde viral replikasyonun erken göstergesidir ve ters transkripsiyon-

PCR (RT-PCR) veya hibridizasyon yöntemleri ile araştırılır. HDVAg ve anti-HDV antikorlarının tespitinde ELISA testleri kullanılır [88]. HDV enfeksiyonunun tanısında, prognozu ve tedavisi farklı olduğundan koenfeksiyonla süperenfeksiyonu ayırt etmek çok önemlidir [88, 186].

HDV ve HBV koenfeksiyonu

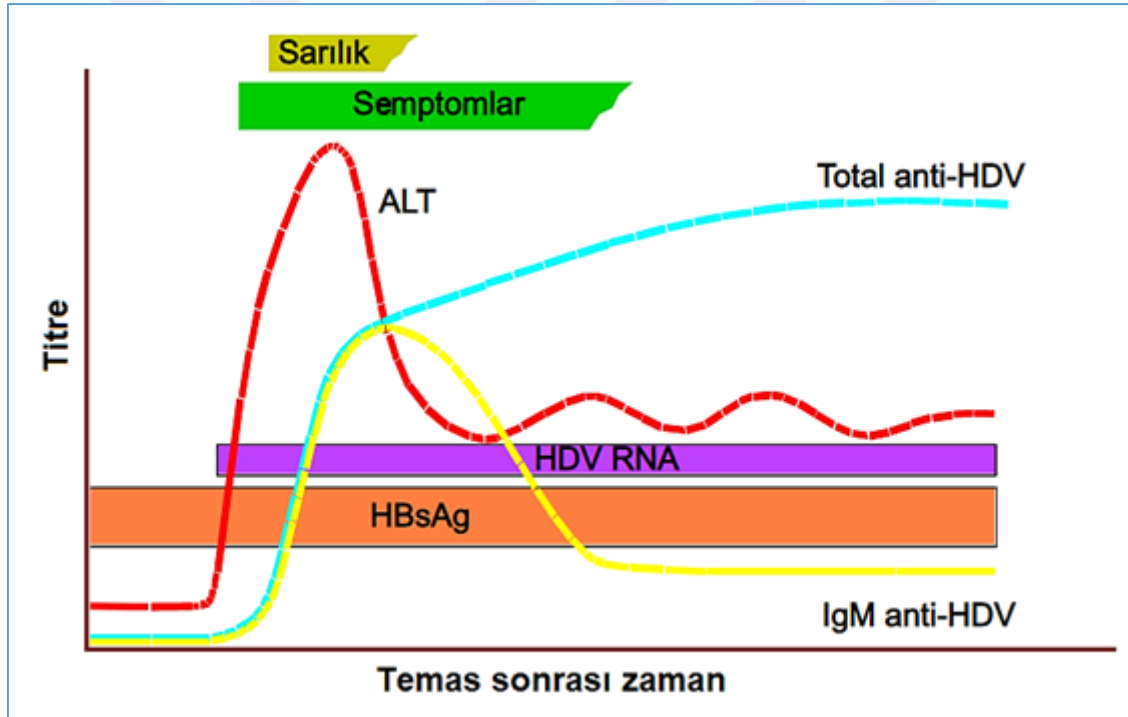
Semptomların başlanmasını izleyen 1-10 gün içerisinde serumda HDAg ve viral RNA, 14-21 gün sonra da anti-HDV IgM saptabilir. Anti-HDV IgM antikorlarının 2-4 hafta içinde kaybolmasının ardından anti-HDV IgG antikorları saptanır hale gelir. Standart testlerde anti-HDV IgM ve IgG antikorları ölçülmektedir. Koenfeksiyon sırasında HDV, HBV'nin replikasyonunu baskılayabilir ve serumdan HBsAg, HBV DNA kaybolabilir. Bu durumda tanı anti-HBc IgM gösterilmesi ile konur. Sıklıkla önce HBV'ye bağlı, ardından da HDV'ye bağlı ikinci transaminaz yükselmesi görülür (Şekil 2.20). Karaciğer dokusunda HDAg'nin immün peroksidaz boyamasıyla gösterilmesi altın standarttır [199, 226].



Şekil 2.20. Koenfeksiyonda HBV-HDV serolojisi.

HDV ve HBV süperenfeksiyonu

Koenfeksiyonda izlenen ALT'de bifazik seyir genellikle süperenfeksiyonda görülmez. Daha önce HBsAg pozitifliği bilinen (kronik hepatit B'li) hastalarda ALT üst sınırın 10 katı ve üzerindeyse anti-HDV araştırılmalı ve pozitifliği durumunda süperenfeksiyon düşünülmelidir [102]. Süperenfeksiyonda HDV RNA ve HDAg serumda saptanabilir. Ancak HDAg'nin serumda erken dönemde kaybolması nedeniyle, negatif çıkan sonuçlarda testin yinelenmesi gerekebilir. Anti-HDV pozitif saptanır. Akut HD süperenfeksiyonunda hasta inaktif HBV taşıyıcısı ise HBV DNA negatiftir (Şekil 2.21). Ayrıca kronik HBV enfeksiyonlu bazı olgularda HDV'nin etkisiyle zaman içinde HBV DNA baskılanır ve yine negatif saptanabilir [199, 226].



Şekil 2.21. Süperenfeksiyonda HBV-HDV serolojisi.

Kronik HDV enfeksiyonu

Altı aydan daha uzun süreli HBsAg, anti-HBc IgG, total anti-HDV pozitif ve anti-HBc IgM negatif bir olguda serum HDV RNA kalitatif veya kantitatif olarak pozitif bulunmasıyla kronik hepatit D düşünülmelidir [102]. Kronik HDV enfeksiyonunda tipik olarak HDV, HBV'yi baskıladığı için kanda HDV RNA pozitif, buna karşılık HBV

DNA negatiftir [227]. HDV RNA düzeyleri, tanı ve tedavinin izlenmesinde önemli bir parametre olsa da, standardizasyonunda halen sorunlar vardır [199, 226].

2.3.8. Tedavi

Kronik hepatit D'de (KHD) antiviral tedavinin amacı, HDV ve HBV'yi ortadan kaldırmak ve karaciğer ile ilgili ölüme veya karaciğer nakline yol açan uzun süreli kronik hepatit D sirozu, karaciğer dekompanseasyonu ve HSK'yı önlemektir. Bununla birlikte, bu hedeflere yaygın olarak ulaşılamamaktadır ve kronik hepatit D'nin tedavisi yetersiz kalmaktadır [222]. Günümüzde kronik hepatit D hastaları için tedavi seçenekleri interferon alfa (IFNa) ve bunun geliştirilmiş türevi pegile IFNa (pegIFNa) ile sınırlıdır [190]. İnterferonlar 1980'lerden beri KHD tedavisinde kullanılmaktadır ve tedavi sonrası 24. haftada hastaların yaklaşık %25-30'unda viral yanıtı yol açmaktadır. Optimal tedavi süresi belli değildir. Ancak en az 1 yıl süreyle ve yüksek dozlarda tedavi önerilmektedir. Bazı çalışmalarda, daha uzun tedavi süresi test edilmiştir. Sürenin 48 haftadan fazla uzatılması büyük bir kohortta ek bir fayda sağlanmadığını göstermiştir [228, 229]. Ayrıca uzun süreli tedavi yaklaşımının potansiyel yararları düşünülürken yan etkiler, maliyet ve lojistik desteklerin de göz önüne alınması önerilmiştir [226]. HDV için yeni tedavi yaklaşımları için umut vardır ve bazılarının yakın gelecekte klinik uygulamaya girmesi muhtemeldir. Faz 2 çalışmalarında şu anda 4 yeni tedavi yaklaşımı değerlendirilmektedir. Bunlar, hepatosit giriş inhibitörü myrcludex B, farnesil transferaz inhibitörü lonafarnib, nükleik asit inhibitörü REP 2139-Ca ve pegile interferon lambda'yı içermektedir. Şimdiye kadar elde edilen sonuçlar umut vericidir ve kısa bir süre içinde 3. aşama çalışmaların yapılması da beklenmektedir [189, 228].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Cihazlar

- Architect i System (Abbott, ABD) otomasyonlu cihazı.
- Spektrofotometre (Sanofi Diagnostik Pasteur PR 1100 Reader/BIORAD-France).
- EZ1 Advanced Cihazı (Qiagen, Almanya).
- ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, ABD).
- ABI PRISM 3130XL (Applied Biosystems, ABD).
- Cobas AmpliPrep/Cobas Taqman 48 real-time PCR Cihazı (Roche Diagnostics, Almanya).
- LightCycler 480 II real-time PCR Cihazı (Roche Diagnostics, Almanya).
- Thermal Cycler PCR Cihazı (PE GeneAmp PCR System 9700, ABD).
- ACT Gene NanoDrop (ASP-2680, ABD).
- Jel Elektroforezi Ekipmanı (Consort).
- Hassas Terazı (WL 6002).
- Mikrodalga (Arçelik MD 674, Türkiye).
- Steril pipet uçları: 1000 µl, 100 µl, 10 µl (HTL Lab Solutions HTL Pipette Tips).
- Otomatik pipetler: 1000 µl, 100 µl, 10 µl (HTL Lab Solutions Discovery Comfort).
- Ependorflar: 2 ml, 1,5 ml, 0,2 ml (NEST NFT1000-R-NS).
- Biyolojik güvenlik kabini (Metisafe, Ankara).
- Buzdolabı (UGUR USS 374 DTK, Türkiye).
- Derin dondurucu -80° (UGUR UDD 200 BK, Türkiye).
- Santrifüj (National Labnet Co. Mini Centrifuge).
- Vorteks (Velp ® Scientifica Rx3).

3.1.2. Reaktifler ve kimyasallar

- Steril distile su.
- Agaroz (Sigma, Almanya).

- Etidyum bromür: (Sigma, Almanya).
- Etanol (Emsure, Almanya).
- Silika (Sigma, Almanya).
- Sodyum asetat (Merck, Almanya).
- Formadid (Emsure, Almanya).
- Trehaloz (Sigma, Almanya).
- Tris-HCl (Sigma, Almanya).
- Glacial acetic acid (Merck, Almanya).
- Tween-20 (Applichem, Almanya).

3.1.3. Kullanılan kitler

- ARCHITECT Anti-HBc II Reagent Kit (Abbott Diagnostics, Almanya).
- ARCHITECT Anti-HBs Reagent Kit (Abbott Diagnostics, Almanya).
- ARCHITECT HBeAg Reagent Kit (Abbott Diagnostics, Almanya).
- ARCHITECT HBsAg Qualitative II Reagent Kit (Abbott Diagnostics, Almanya).
- ARCHITECT Anti-HBeAg Reagent Kit (Abbott Diagnostics, Almanya).
- ARCHITECT Anti-HCV Reagent Kit (Abbott Diagnostics, Almanya).
- Anti-HDV Ab DiaPro Kit (Diagnostics Bioprobes, Milano-Italya).
- EZ1 Virüs Mini Kit (Qiagen, Almanya).
- High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche Diagnostics, Almanya).
- Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics, Almanya).
- COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV Test, v 2.0 Kit (Roche Diagnostics, Almanya).
- COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HCV Quantative Test, v 2.0 Kit (Roche Diagnostics, Almanya).
- Light Cycler 480 Probes Master (Roche Diagnostics, Almanya).
- BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, ABD).

3.2. Yöntemler

3.2.1. Örneklerinin toplanması, saklanması ve ulaştırılması

Örnekler, Kazakistan'ın Türkistan bölgesindeki hepatit B C ve D virüslerinin prevalanslarının saptanması amacı ile, Eylül 2017-Kasım 2018 tarihleri arasında Türkistan bölgesinde yaşayan 881 kişiden 3-4 ml periferik kan olarak alınmıştır. Santrifüj edilip serumları çalışma zamanına kadar 2 ml.lik ependorf tüplere alınmış ve -80°C'de derin dondurucuda saklanmıştır.

Bu araştırmanın etik onayı, Hoca Ahmet Yesevi Uluslararası Türk-Kazak Üniversitesinden (etik no:001/2017) alınmıştır (EK-1). Çalışmaya dahil edilen tüm katılımcılardan bilgilendirilmiş onam formu alınmıştır. Numunelerin Birleşmiş Milletler (BM) düzenlemelerine göre taşınmasına izin vermek için hem Kazakistan hem de Türkiye Sağlık Bakanlığından gerekli tüm izinler alınmıştır (EK-2). Serumlar, Ocak 2019 yılında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarına ulaştırılmıştır.

Bu çalışmada serolojik ve moleküler tanı yöntemleri kullanılmıştır.

3.2.2. Serolojik yöntemler

Çalışmamıza dahil edilen 881 serum örneğine; HBV, HCV, HDV serolojik testleri çalışılmıştır. Serolojik olarak kemilüminesan mikropartikül immünolojik tetkik (CMIA) ve ELISA testleri kullanılarak, serumda bahsi geçen virüslere karşı oluşan antikor ve antijenler araştırılmıştır. Hepatit B ve C virüslerinin serolojik belirteçleri Architect i2000SR (Abbott, ABD) otomasyonlu cihazı ve cihaza ait kitler ile çalışılmıştır. Her tetkik için en az 150 µL serum kullanılmıştır.

Hepatit B serolojisi

HBsAg, anti-HBs (kantitatif), anti-HBc belirteçleri bakılmıştır. HBsAg pozitif çıkan örneklerde HBeAg ve anti-HBe belirteçleri çalışılmıştır.

Architect HBsAg qualitative II tetkiki

İnsan serumu ve plazmasında bulunan HBsAg'nin kalitatif belirlenmesi için CMIA teknolojisi ile Chemiflex olarak adlandırılan esnek tetkik protokoller kullanılan tek adımlı (one-step) bir immünolojik tetkiktir.

Reaktifler: mikropartiküller, konjugat, yıkama tamponu;

Diğer reaktifler: pre-trigger çözeltisi, trigger çözeltisi, yıkama tamponu (fosfat tamponlu tuz çözeltisi içermektedir);

Architect HBsAg Qualitative II tetkikinde, numune anti-HBs kaplı paramanyetik mikropartiküller ve anti-HBs akridinium etiketli konjugata tutunur. Yıkamadan sonra, reaksiyon karışımına yardımcı yıkama tamponu ilave edilir. Diğer bir yıkama dönüşümünden sonra pre-trigger ve trigger solüsyonları reaksiyon karışımına eklenir. Elde edilen reaksiyon relatif ışık üniteleri (RLU'lar) olarak ölçülür. Örnekteki HBsAg miktarı ve Architect i System optik sistemleri ile tespit edilen RLU'lar arasında doğrudan bir ilişki bulunmaktadır. Örnekte HBsAg varlığı ya da yokluğu reaksiyondaki kemilüminesan sinyalinin bir aktif kalibrasyondan elde edilen cutoff sinyaliyle karşılaştırılmasıyla tespit edilir. Örnekteki kemilüminesan sinyal, cutoff sinyalinden $\geq 1,00$ ise, örnek HBsAg için reaktif (pozitif), $< 1,00$ ise nonreaktif (negatif) olarak değerlendirilmiştir.

Architect anti-HBs tetkiki

İnsan serumu ve plazmasında bulunan anti-HBs'nin konsantrasyonunu belirler.

Reaktifler: mikropartiküller, konjugat, tetkik dilüenti;

Diğer reaktifler: pre-trigger çözeltisi, trigger çözeltisi, yıkama tamponu (fosfat tamponlu tuz çözeltisi içermektedir);

İki adımlı bir immünolojik tetkiktir. İlk adımda, numune ve rekombinant HBsAg (rHBsAg) kaplı paramanyetik mikropartiküller birleştirilir. Numunede bulunan anti-HBs, rHBsAg kaplı mikropartiküllere bağlanır. Yıkamadan sonra, akridinyum işaretli rHBsAg konjugatı ikinci adımda eklenir. Başka bir yıkama döngüsünden sonra, reaksiyon karışımına pre-trigger ve trigger çözeltileri ilave edilir. Ortaya çıkan

kemilüminesan RLU'lar olarak ölçüler. Numunede anti-HBs konsantrasyonu önceden çizilmiş Architect anti-HBs kalibrasyon eğrisi kullanılarak belirlenir.

Anti-HBs sonuç değerleri $\geq 10,00$ mIU/mL olan numuneler reaktif ve sonuç değerleri $\leq 10,00$ mIU/mL olan numuneler nonreaktif kabul edilmiştir.

Architect anti-HBc II tetkiki

Chemiflex adı verilen esnek tetkik protokolleri ile CMIA teknolojisini kullanan insan serumu ve plazmasında bulunan anti-HBc'nin kalitatif tayini amaçlı iki adımlı bir immünotetkiktir.

Reaktifler: mikropartiküller, konjugat, tetkik dilüenti;

Diğer reaktifler: pre-trigger çözeltisi, trigger çözeltisi, yıkama tamponu (fosfat tamponlu tuz çözeltisi içermektedir);

Numune, tetkik dilüenti, numune dilüenti ve rHBcAg kaplı paramanyetik mikropartiküller birleştirilir. Örnekte bulunan anti-HBc, rHBcAg kaplı mikropartiküllere bağlanır. Reaksiyon karışımı yıkanır ve anti-insan akridinyum işaretli konjugat eklenir. Başka bir yıkama işleminden sonra, reaksiyon karışımına pre-trigger ve trigger çözeltileri eklenir. Ortaya çıkan kemilüminesan RLU'lar olarak ölçüler. Örnekteki anti-HBc miktarı ile Architect i System optik sistemleri tarafından tespit edilen RLU'lar arasında doğrudan bir ilişki vardır.

Sonuçlar, cutoff RLU, anti-HBc II kalibratör 1'in ortalama RLU değeri 1,0 ile çarpılarak elde edilir (Cutoff RLU=Kalibratör 1 ortalama RLU $\times$ 1,0). Numune sinyalinin (RLU) kesme değerine (S/CO) oranı $\geq 1,00$ ise anti-HBc için reaktif, $< 1,00$ ise nonreaktif kabul edilmiştir (S/CO=Numune RLU/Cutoff RLU).

Architect HBeAg tetkiki

Chemiflex adı verilen esnek tetkik protokolleri ile CMIA teknolojisini kullanan insan serumu ve plazmasında HBeAg'nin kalitatif tayini amaçlı iki adımlı bir immünotetkiktir.

Reaktifler: mikropartiküller, konjugat, tetkik dilüenti;

Diğer reaktifler: pre-trigger çözeltisi, trigger çözeltisi, yıkama tamponu (fosfat tamponlu salin çözeltisi içermektedir);

Numune, tetkik dilüenti ve anti-HBe (fare, monoklonal) kaplı paramanyetik mikropartiküller birleştirilir. Numunede bulunan HBeAg, anti-HBe kaplı mikropartiküllere bağlanır. Yıkamadan sonra, akridinyum etiketli anti-HBe konjugatı eklenir. Tekrar yıkama işleminden sonra, reaksiyon karışımına pre-trigger ve trigger çözeltileri eklenir. Numunedeki HBeAg miktarı ile Architect i System optik sistemleri tarafından tespit edilen RLU'lar arasında doğrudan bir ilişki vardır. Numunede HBeAg yokluğu ve varlığı, reaksiyondaki kemilüminesan sinyal aktif bir kalibrasyonla belirlenen cutoff sinyaliyle kıyaslanarak saptanır. $S/CO = \text{Numune RLU} / \text{Cutoff RLU}$. Reaksiyondaki $S/CO \geq 1,000$ değerler reaktif, $<1,000$ değerler HBeAg için nonreaktif kabul edilmiştir.

Architect anti-HBeAg tetkiki

İnsan serum ve plazmasında bulunan anti-HBe antikorunun kalitatif tayininde kullanılan yarışmalı, iki adımlı bir immünotetkiktir.

Reaktifler: mikropartiküller, konjugat, nötrleştirici reaktif;

Diğer reaktifler: pre-trigger çözeltisi, trigger çözeltisi, yıkama tamponu (fosfat tamponlu salin çözeltisi içermektedir);

Numune, nötrleştirici reaktif ve anti-HBe kaplı paramanyetik mikropartiküllerle birleştirilir. Numunede bulunan anti-HBe, nötrleştirici reaktifte bulunan rekombinant HBeAg'e bağlanır. Bağlanmayan rekombinant HBeAg, anti-HBe kaplı mikropartiküllerle bağlanır. Yıkama işleminden sonra, akridinyum işaretli anti-HBe konjugatı eklenerek, bir reaksiyon karışımı elde edilir. Diğer yıkama döngüsünün ardından, karışıma pre-trigger ve trigger çözeltisi ilave edilir. Ortaya çıkan kemilüminesan reaksiyon bağlı ışık birimleri olarak ölçülür. Numunedene anti-HBe olup olmadığı, reaksiyondaki kemilüminesan sinyal aktif bir kalibrasyonla belirlenen sinyale kıyaslanarak saptanır. $S/CO = \text{Numune RLU} / \text{Cutoff RLU}$. S/CO değerleri $\leq 1,00$ olan numuneler reaktif, $>1,00$ olan numuneler nonreaktif kabul edilmiştir.

Hepatit C serolojisi

Anti-HCV total çalışılmıştır.

Architect anti-HCV tetkiki

İnsan serum ve plazmasında bulunan anti-HCV antikorunun kalitatif tayininde kullanılan bir immünotektiktir. Bu test HCV genomunun yapısal ve yapısal olmayan proteinlerini kullanmaktadır ve kor, NS3, NS4 proteinlerine karşılık gelen HCr43 ve c100-3 gibi rekombinant antijenler içermektedir. CMIA iki aşamalı bir tetkik sonunda oluşan antijen antikor kompleksi kaynaklı kimyasal reaksiyonun ürettiği ışığın ölçümü esasına dayanmaktadır.

Architect anti-HCV testi kesme değeri aşağıdaki formülle hesaplanır: kalibratör 1 ortalama RLU değeri $\times 0,074 = S/CO$ RLU. Sonuçlar, numune sinyalinin (RLU) kesme değerine (S/CO) oranı olarak $\geq 1,00$ ise anti-HCV için reaktif, $< 1,00$ ise nonreaktif kabul edilmiştir.

Hepatit Delta serolojisi

HBsAg pozitif çıkan örneklerde anti Delta Total IgG+IgM çalışılmıştır. Anti-HDV antikorları, DiaPro (Diagnostic Bioprobes, Milano-İtalya) kiti ile insan serum veya plazmasında HDV virüsüne spesifik antikorların tespitinin yapıldığı ELISA yöntemi ile çalışılmıştır. Anti-HDV Ab ELISA protokolü şu şekilde uygulanmıştır.

Çalışmadan önce bütün reagentler oda ısısına getirilmiştir.

1. Gerekli sayıda strip mikropalak tutucuya yerleştirilmiştir. A1 kuyucuğu kör olması için boş bırakılmıştır. B1'e 100 µl negatif kontrol, C1'e 100 µl kalibratör, D1 kuyucuğuna 100 µl pozitif kontrol ve ardından sırasıyla her örnekten 100 µl pipetlenmiştir. Daha sonra mikropalak + 37°C'de 60 dakika inkübe edilmiştir.
2. 5 kez yıkama işlemi yapılmıştır.
3. A1 dışındaki tüm kuyucuklara 100 µl Enzim Konjugat (Horse Radish Peroksidaz) eklenmiştir. Mikropalak + 37°C'de 60 dakika inkübe edilmiştir.

4. Yıkama işlemi tekrarlanmıştır.
5. Her bir kuyucuğa 100 µl substrat solusyonu (TMB:Tetra-Methyl-Benzidin) eklenmiştir. 25°C'de (oda ısısında) 20 dakika karanlıkta inkübe edilmiştir.
6. Renk reaksiyonunun sonlanması için her bir kuyucuğa stop solüsyonunun (2N sülfürik asit= H_2SO_4) 100 µl'si dağıtılmıştır.
7. ELISA okuyucusunda (Sanofi Diagnostik Pasteur PR 1100 Reader/BIORAD-France) 450-630 nm çift dalga boyunda okutulmuştur.

Değerlendirme: (anti-HDVAb) Cutoff=(NC+PC)/5 formülü ile Cutoff değeri hesaplanmıştır. Cutoff değeri örneğin optik dansite değerine bölündü. Sonuçlar, 0,9'dan küçük çıkan değerler negatif, 0,9-1,1 arası çıkan değerler belirsiz (equivocal), 1,1'den büyük çıkan değerler ise pozitif olarak yorumlanmıştır. Bu çalışmada belirsiz sonuç tespit edilmemiştir.

3.2.3. Moleküler yöntemler

Serolojik olarak pozitifliği saptanmış serum örnekleri viral yükleri tayin edilmek üzere real-time PCR yöntemi kullanılarak test edilmiştir.

HBV DNA ekstraksiyonu

Nükleik asit ekstraksiyonu için tam otomatik Cobas AmpliPrep (CAP) cihazı kullanılmıştır. Cobas AmpliPrep ile nükleik asit ekstraksiyonu, silika jel kaplı manyetik boncuklar teknolojisine sahip genel bir ekstraksiyon yöntemine dayanmaktadır. İlk olarak 1 ml serum örnekleri CAP cihazına özgü S-tüplerine aktarılmıştır. Manuel olarak barkod etiketleri okutulmuş ve numune raflarına yerleştirilmiştir. Cihazın diğer raflarına Çizelge 3.1'de verilen reaktifler uygun raflara yerleştirilmiştir. Cihazın çalıştırılması bilgisayarda standart olarak oluşturulmuş AMIPLIPREP versiyon 3.3 program tarafından başlatılmıştır. Yaklaşık 120 dakika süre içinde DNA ekstraksiyonu hazır olmuştur.

Çizelge 3.1. HBV DNA ekstraksiyonu reaktifleri

Reaktifler	İçerik	Hacım	Cihaz rafındaki pozisyonu
HBV2 CS1	Silika jel kaplı manyetik boncuklar	7,0 mL	A
HBV2 CS2	Lizis solüsyon	78 mL	B
HBV2 CS3	Proteinaz K içeren multi-reaktif	3,8 mL	C
HBV2 CS4	Teste özgü reaktif	3,6 mL	D
EB, v2.0	Elüsyon tampon	8,1 mL	E

HCV RNA ekstraksiyonu

Hepatit C'nin nükleik asit ekstraksiyonu için tam otomatik Cobas AmpliPrep (CAP) cihazı kullanılmıştır. Cobas AmpliPrep ile nükleik asit ekstraksiyonu, silika jel kaplı manyetik boncuklar teknolojisine sahip genel bir ekstraksiyon yöntemine dayanmaktadır. İlk olarak 1 ml serum örnekleri CAP cihazına özgü S-tüplerine aktarılmıştır. Manuel olarak barkod etiketleri okutulmuş ve numune raflarına yerleştirilmiştir. Cihazın diğer raflarına Çizelge 3.2'de verilen reaktifler uygun raflara yerleştirilmiştir. Cihazın çalıştırılması bilgisayarda standart olarak oluşturulmuş AMIPLIPREP versiyon 3.3 program tarafından başlatılmıştır. Yaklaşık 120 dakika süre içinde DNA ekstraksiyonu hazır olmuştur.

Çizelge 3.2. HCV RNA ekstraksiyonu reaktifleri

Reaktifler	İçerik	Hacım	Cihaz rafındaki pozisyonu
HCV CS1	Silika jel kaplı manyetik boncuklar	7,0 mL	A
HCV CS2	Lizis solüsyon	78 mL	B
HCV CS3	Proteinaz K içeren multi-reaktif	3,8 mL	C
HCV CS4	Teste özgü reaktif	3,6 mL	D
EB, v2.0	Elüsyon tampon	8,1 mL	E

HBV amplifikasyonu

Cobas AmpliPrep cihazı ile HBV DNA ekstraksiyonundan sonra, HBV DNA'ya özgü primer çiftleri ve problemleri içeren COBAS TaqMan HBV Test, v 2.0 kiti kullanılmıştır. Çizelge 3.2'de verilen reaktifler üretici firmanın oluşturan standart protokolüne

uygun olarak karışım hazırlanmış ve hazır olan karışım kinetik reaksiyon tüplerine (K tüpleri) pipetaj yapılarak aktarılmıştır. K tüpleri K tüp rafına yerleştirilerek Cobas Taqman 48 cihazına yüklenmiştir. COBAS TaqMan cihazı bilgisayarında standart olarak oluşturulan HBV protokolü seçilerek cihaz çalıştırılmıştır. HBV viral DNA miktarının tespiti, HBV QS (kantitasyon standardı) kullanılarak belirlenmiştir. Testin alt sınırı 20 IU/mL, lineer aralık $20-1,7 \times 10^8$ IU/mL;

Çizelge 3.3. HBV DNA amplifikasyon reaktifleri

Reaktifler	İçerik	Hacim
HBV QS, v2.0	Kantitasyon Standardı	3,6 mL
HBV MMX, v2.0	Master miks	3,4 mL
HBV Mn ²⁺	Maganez solüsyonu	19,8 mL
HBV H(+)C, v2.0	Yüksek Pozitif Kontrol	1,0 mL
HBV L(+)C, v2.0	Düşük Pozitif Kontrol	1,0 mL
CTM (-)C	Negatif Kontrol	1,0 mL

HCV amplifikasyonu

Serum örneklerinde HCV-RNA kantitatif real-time PCR ile tespit edilmiştir. Bunun için COBAS TaqMan HCV Quantative Test, v 2.0 kiti (Roche Diagnostics, Almanya) kullanılmıştır. PCR karışımları hazırlandıktan sonra tüpler Cobas Taqman 48 cihazına yerleştirilmiş ve sırasıyla ters transkripsiyon, amplifikasyon ve hibridizasyon işlemleri uygulanmıştır. Bu işlemler için HCV genomunun bütün genotipler için iyi korunmuş bir bölgesi olan 5'-UTR bölgesine özgü primerler kullanılarak, cDNA çoğatılması gerçekleştirilmiştir. PCR ürünlerinin saptanması amacıyla hidroliz problemleri kullanılmıştır. TaqMan problemleri olarak da bilinen bu problemlerin 5' ve 3' uçları florokrom maddeleri ile işaretlidir (dual labelled probe). Probun 5' ucunda FAM (6-carboxyfluorescein), 3' ucunda ise TAMRA (6-carboxytetramethyl-rhodamine) bulunur. Prob, tek sarmal hale getirilen hedef bölge üzerinde, primerlerin bağlanma bölgesinin arasında kalan yere bağlanır. Prob ile hedef bölge arasındaki hibridizasyon devam ettiği sürece FAM maddenin sinyal oluşturması, 3' ucundaki TAMRA madde tarafından engellenir. Primerlerin hedef nükleik aside bağlanmasını takiben başlatılan primer uzaması, probun bağlandığı noktaya geldiğinde, sentezin devam edebilmesi için TaqDNA polimeraz enzimi 5'-3' ekzonükleaz aktivitesini kullanarak probu 5' ucundan itibaren yıkmaya başlar.

Böylece FAM serbest hale geçer ve sinyal oluşturur. Her döngüde üretilen ürün arttıkça, floresan miktarında artma gözlenir. HCV viral RNA miktarının tespiti, HCV QS (kantitasyon standardı) kullanılarak belirlenmiştir. Testin alt sınırı 15 IU/mL, lineer aralık $15-1 \times 10^8$ IU/mL'dir.

HDV RNA ekstraksiyonu

HDV ekstraksiyonu High Pure Viral RNA Kit (Roche Diagnostics, Almanya) kullanılarak yapılmıştır. İşlemlerde santrifüj kullanılmıştır.

1. 200 µl'lik HDV pozitif serum örnekleri temiz eppendorf tüplere aktarılmıştır.
2. Üzerlerine her tüp için 400 µl bağlanma (binding) tamponu + 4 µl Poly (A) karışımı eklenmiştir.
3. Karışım iyice vortekslenerek filtreli tüplere aktarılmıştır.
4. Tüpler 8,000xg'de 15 saniye santrifüj edilmiştir ve alttaki sıvılı kısmı atılmıştır.
5. Santrifüj edilen filtreler yeni boş 2 ml'lik collection tüplere aktarılmıştır ve üzerlerine 500 µl inhibitor tamponu eklenmiştir.
6. Tüpler 8,000xg'de 1 dakika santrifüj edilmiştir ve süpernatant atılmıştır.
7. Santrifüj edilen filtreler yeni boş 2 ml'lik tüplere aktarılmıştır ve 450 µl yıkama tamponu eklenmiştir.
8. Tüpler 8,000xg'de 1 dakika santrifüj edilmiştir ve süpernatant atılmıştır.
9. Filtreler yeni boş 2 ml'lik collection tüplere aktarılmıştır ve 450 µl yıkama tamponu eklenmiştir.
10. Tüpler 8,000xg'de 1 dakika santrifüj edilmiştir ve süpernatant atılmıştır.
11. Yüksek hızda (15,000xg'de) 10 saniye santrifüj edilmiştir ve süpernatant atılmıştır.
12. Tüplere 50 µl elüsyon tamponu eklenmiştir.
13. 8000 g'de 60 saniye santrifüj edilmiştir.
14. Bu işlem sonunda 1,5 ml'lik steril eppendorf tüplerin dibinde kalan sıvı (50 µl) PCR çalışmalarında kullanmaya uygun saf RNA örneği olarak elde edilmiştir.

Komplementer DNA (cDNA) sentezi

HDV RNA'dan cDNA eldesinde Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics, Almanya) kullanılmıştır. Her bir tüp örnek için aşağıdaki basamaklar izlenmiştir:

1X Kalıp RNA - primer karışımının hazırlanması (TMP)

1. Ekstrakte edilmiş 10 µl HDV RNA (kalıp RNA) 0,2 ml'lik tüpe (normal PCR tüpü) pipetlenmiştir.
2. 2 µl random hekzamer solüsyonuna eklenmiştir (6 numaralı tüp).
3. 1 µl H₂O eklenmiştir (7 numaralı tüp).
4. 10 dakika 65°C'de inkübe edilmiştir.
5. İnkübasyon sonrası buzda bekletilmiştir.

1X Transkripsiyon reaksiyon karışımının hazırlanması (TRM):

1. Steril bir eppendorf tüpe aşağıdaki karışımı hazırlanmıştır:
 - 4 µl Transcriptor RT reaksiyon tamponu (2 numaralı tüp)
 - 0,5 µl Protector RNase İnhibitörü (3 numaralı tüp).
 - 2 µl dNTP Karışımı (4 numaralı tüp).
 - 0,5 µl Transcriptor Reverse Transcriptaz (1 numaralı kırmızı kapaklı tüp).
 - Yavaşça karıştırılmıştır ve kısaca dödürerek çöktürülmüştür.
2. TRM solüsyonundan 7 µl'yi, 13 µl TPM içeren 0,2 ml'lik PCR tüplerine toplam hacim 20 µl olacak şekilde aktarılmıştır.
3. Vortekslenmiştir ve kısaca döndürerek çöktürülmüştür.

cDNA sentezi reaksiyonunun kurulması:

TRM – TPM karışımı (20 µl) Thermal Cycler PCR cihazına yerleştirilmiştir:

- 10 dk 25° C
- 30 dk 55 °C'de.
- 5 dk 85 °C'de

HDV amplifikasyonu:

HDV real-time PCR aşaması LightCycler 480 II Real Cihazı (Roche Diagnostics, Almanya) ile yapılmıştır. cDNA basamağının bitmesinden sonra, real-time PCR reaksiyonu aşağıdaki karışım ile hazırlanmıştır. Kullanılan primer dizileri Çizelge 3.3, PCR içeriği Çizelge 3.4, termal döngü Çizelge 3.5'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.4. HDV RNA real-time PCR'da kullanılan primer ve prob dizileri

Primer/Prob	Nukleotit dizileri
HDV-ERS-F	5'-TCGGGTCGGCATGGCATCT-3'
HDV-ERS-Rev	5'-TCGCTCCTGGAAGATGGTG-3'
*TaqMan-ERS	FAM-TCCTCCTWCGGATGCCAGGTCGGA-TAMRA
*TaqMan prob (5'label=Fam, 3' quencher=Tamra, W=T ya da A)	

Çizelge 3.5. HDV real-time PCR içeriği

Kullanılan kimyasallar	Kullanılan miktar
HDV Prob (5 pmol)	0,6 µl
*HDV FWD Primer (10 pmol)	0,6 µl
*HDV REV Primer (10 pmol)	0,6 µl
LightCycler 480 Probe Master	10 µl
H ₂ O	3,2 µl
Toplam Hacim	15 µl

*Kullanılan primerler Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Hazırlanan karışımdan her bir örnek için 15 µl olacak şekilde plate kuyucuklarına pipetlenmiştir. Ardından kuyucuklar üzerine sentezlenmiş cDNA veya standart 5 µl'şer yükleme yapılmıştır. Her çalışmada bir kuyucuğa pozitif örnek yerine su konulmuştur ve bu kuyucuk negatif kontrol olarak değerlendirilmiştir.

HDV DNA ve standartları tespiti için FAM filtresi (465-510 nm) ve internal kontrolün tespiti için VIC/Hex/Yellow 555 (533-580 nm) filtresi kullanılmıştır.

Çizelge 3.6. HDV real-time PCR döngüleri

	Denatürasyon	Amplifikasyon	Soğutma
Devir (Cycle)	1	40	1
Hedef Sıcaklık (°C)	95	94	60
Süre	5 dk	20 sn	1 dk
			30 sn

3.2.4. HBV, HCV ve HDV örneklerinin dizi analizleri

Real-time PCR yöntemiyle viral yükleri saptanmış olan HBV, HCV ve HDV örneklerinin her üçünde dizi analizleri Sanger dizileme yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Dizi analizi reaksiyonunun basamakları aşağıdaki gibidir:

1. Serum örneklerinden HBV DNA, HCV RNA ve HDV RNA ekstraksiyonu
2. Komplementer DNA (cDNA) sentezi (RNA virüsleri için)
3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)
4. Agaroz jel elektroforezi (PCR ürünlerinin analizi)
5. PCR ürünlerinin saflastırılması (saf ürün eldesi)
6. Nanodropla DNA miktarının ölçülmesi
7. Dizi analizi reaksiyonu
8. Dizileme çöktürme/saflastırma
9. Otomatik dizi analizi cihazına yükleme (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer)

HBV DNA, HCV RNA ve HDV RNA ekstraksiyonu

HBV ve HCV nükleik asit ekstraksiyonu

Çalışılacak serum örnekleri oda ısısına getirilerek çalıştırılmaya hazır hale getirilmiştir.

HBV DNA ve HCV RNA ekstraksiyonu EZ1 Virüs Mini Kit v2.0 (Qiagen, Almanya) kullanılarak yapılmıştır.

EZ1 virüs mini kit içeriği

- Reaktif kartuşları (Virüs Mini v2.0)
- Tek kullanımlık uç tutucular
- Tek kullanımlık filtreli pipet uçları
- Numune tüpleri (2 ml)
- Elüsyon tüpleri (1,5 ml)
- Taşıyıcı RNA
- Tampon AVE
- Q-Kart

Çalışma düzeneği

- İlk sıra: EZ1 Virüs protokolde, 1,5 ml'lik elüsyon tüpleri boş yüklenmiştir.
- İkinci sıra: EZ1 Virüs protokolde, filtreli pipet uçları konulmuştur.
- Üçüncü sıra: EZ1 Virüs protokolde, 1,5 ml'lik tüpler taşıyıcı RNA+iç kontrol (IC) (kullanılıyorsa)+tampon AVE içeren karışım burada yüklenmiştir.
- Dördüncü sıra: EZ1 Virüs protokolde, 2 ml'lik örnek tüpleri (serum) yüklenmiştir.
- Hazırlanan kartuş rakı ve çalışma rakı cihaz içerisindeki uygun pozisyonlarda yerleştirilerek, çalışma alanının kapağı kapatılmıştır.

Her numune için 3,8 µl çözünmüş taşıyıcı RNA içeren 60 µl çözelti hazırlayarak 1,5 ml tüp içerisine konulduktan sonra makinada üçüncü sıraya yerleştirilmiştir, oda ısısına gelen numuneler 400 µl 2 ml'lik örnek tüpleri içine konulmuştur ve makinada dördüncü sıraya yerleştirildikten sonra makine çalıştırılmıştır. İşlem bittikten sonra elüsyon tüplerinde HBV DNA ve HCV RNA ekstraksiyonu gerçekleşmiş oldu. Sonuçta saflaştırılmış, yüksek kaliteli viral nükleik asit elde edilmiştir.

HDV RNA ekstraksiyon

Ekstraksiyon aşamaları; High Pure Viral RNA Kit (Roche Diagnostics, Almanya) kullanılarak, bölüm 3.2.3'de belirtilen protokollere uyarak gerçekleştirilmiştir.

HCV ve HDV komplementer DNA (cDNA) sentezi

HCV ve HDV örneklerinin ekstraksiyonu sonrası Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics, Almanya) ile cDNA elde edilmiştir. Bölüm 3.2.3'de açıklandığı gibi kit protokolünün basamakları izlenerek gerçekleştirilmiştir.

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

Hepatit B, C ve D virüslerinin amplifikasyon işlemlerinde özellikle duyarlılıklarını arttırmak amacıyla Nested PCR yöntemi kullanılmıştır. Nested PCR için iki takım amplifikasyon primerleri kullanılmış ve iki tur amplifikasyon uygulanmıştır. İlk tur amplifikasyondan elde edilen ürün ikinci tur PCR için kalıp olarak kullanılmıştır. Kullanılan ikinci primer takımı diziye özgüdür.

HBV polimeraz zincir reaksiyonu

HBV DNA PCR'i için örneklerin ekstraksiyonu sonrası aşağıda belirtilen miktarlara göre PCR gerçekleştirilmiştir. HBV polimeraz bölgesini hedefleyen primerler kullanılmıştır (Çizelge 3.6). PCR içeriği ve PCR koşulları sırasıyla Çizelge 3.7 ile 3.8'da verilmiştir.

Çizelge 3.7. HBV 1. ve 2. tur PCR'de kullanılan primer dizileri

Primer		Nukleotit dizileri
Primer FWD (188)	1.tur	5'-AAACCCAAAAGACCCACA-3'
Primer REV (887)	1.tur	3'-TCCCCAACCTCCAATCAC-5'
Primer FWD (440)	2.tur	5'-GTACCAAACCTTCGGACGGA-3'
Primer REV (890)	2.tur	3'-AGCAAAACCCAAAAGACCCA-5'

Çizelge 3.8. HBV 1. ve 2. tur PCR içeriği

Kullanılan kimyasal	Kullanılan miktar
HBV DNA	5 µl
*Primer FWD (10 pmol)	1,5 µl
*Primer REV (10 pmol)	1,5 µl
Tampon (10X)	5 µl
MgCl ₂ (25 Mm)	2 µl
dNTP mix (2 mM)	5 µl
Taq DNA polimeraz (Roche Diagnostics, Almanya)	1 µl
ddH ₂ O	29 µl
Toplam Hacim	50 µl

* Kullanılan primerler Çizelge 3.6'da belirtildiği gibidir.

Çizelge 3.9. HBV 1. ve 2. tur PCR döngüleri

Primerler		Reaksiyon döngüleri	Döngü sayısı
Primer FWD (887)	1.tur	95°C'de 5 dk	30
Primer REV (189)	1.tur	95°C'de 1 dk	
		54°C'de 1 dk	
		72°C'de 1 dk	
		72°C'de 7 dk	
Primer FWD (440)	2.tur	94°C'de 5 dk	30
Primer REV (891)	2.tur	94°C'de 30 sn	
		56°C'de 30 sn	
		72°C'de 1 dk	
		72°C'de 7 dk	

HCV polimeraz zincir reaksiyonu

HCV NS5B bölgesini hedefleyen primerler kullanılmıştır (Çizelge 3.9). PCR'lerin içeriği ve döngüleri Çizelge 3.10 ve 3.11'de gösterildiği gibidir.

Çizelge 3.10. HCV 1. ve 2.tur PCR'de kullanılan primer dizileri

Primer	Nukleotit dizileri
NS5B 1 FWD 8008-8032	5'-CTACCATCATGGCTAARAAYGAGGT-3'
NS5B 1 REV 8673-8697	3'-ATGATGTTATGAGCTCCARGTCRTA-5'
NS5B 2 FWD 8256-8276	5'-TATGAYACCCGCTGYTTTGAC-3'
NS5B 2 REV 8616-8636	3'-CCTGGTCATAGCCTCCGTGAA-5'

Çizelge 3.11. HCV 1. ve 2.tur PCR içeriği

Kullanılan Kimyasal	Kullanılan Miktar
HCV cDNA	5 µl
*Primer FWD (10 pmol)	2 µl
*Primer REV (10 pmol)	2 µl
Tampon (10X)	5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	3 µl
dNTPmix (2 mM)	5 µl
Taq DNA Polimeraz (Roche Diagnostics, Almanya)	0,5 µl
ddH ₂ O	27,5 µl
Toplam Hacim	50 µl

*Kullanılan primerler Çizelge 3.9'da belirtildiği gibidir.

Çizelge 3.12. HCV 1 ve 2.tur PCR döngüleri

Primerler	Reaksiyon döngüleri	Döngü sayısı
1FWD/1REV (1.tur PCR)	95°C'de 5 dk 94°C'de 30 sn 50°C'de 30 sn 72°C'de 2 dk 72°C'de 7 dk	40
2FWD/2REV (2.tur PCR)	95°C'de 5 dk 95°C'de 30 sn 55°C'de 30 sn 72°C'de 1.30 dk 72°C'de 7 dk	40

Genotipleri saptanan HCV örneklerinde NS3, NS5A ve NS5B bölgeleri hedeflenerek PCR yapılmıştır. Bu bölgelerde, ilaç direnci ile ilgili olarak belirlenmiş aminoasit noktalarındaki nükleotit ve aminoasit değişiklikleri incelenmiştir. Her bölge için farklı primerlerin kullanıldığı 2 tur PCR yapılmıştır (Çizelge 3.12). PCR'lerin içeriği Çizelge 3.10, döngüleri Çizelge 3.13'de gösterildiği gibidir.

Çizelge 3.13. HCV parçalı genom PCR'de kullanılan primer dizileri

Bölge	Primer	Nükleotit dizileri
1b NS3	NS3ALLF2 (M13F)	5'-ATGGARAYYAAGVTYATYACXTGGG-3'
	NS3ALLR1 (M13R)	3'-CTYTTXCCRCTXCCXGTGXXGXCRTG-5'
	2nd NS3ALLF3 (M13F)	5'-ATCTTXCTXGGXCCXGCYGA-3'
	2nd NS3ALLR2 (M13R)	3'-GCXACYTGRTAXGTXTGXGG-5'
1b NS5A	EF1B	5'-TGGATGAACCGGCTGATAG-3'
	ER1B	3'-CCACARGAGGTTGGCCTC-5'
	IF1B	5'-TCCCCACGCACTACGTG-3'
	IR1B	3'-CTAGCYGARGAGCTGGCC-5'
1b NS5B	5B FWD	5'-GGAGCCKGGRGATCCRGATCTYAGC-3'
	5B REV	3'-GTTGGGGAGGAGGTAGATGCCTA-5'
	5B 4FWD	5'-GAYGTCGTGTGCTGCTCRATGTC-3'
	5B 4REV	3'-GAGACACGCTGTGATAAATGTCTCCC-5'
3a ve 2 c NS3	NS3 1FWD	5'-ATCACSTGGGGRGCRGCRGCRGAYAC-3'
	NS3 1REV	3'-AAYTTGCCRTAKGTGGAGTAYGT-5'
	NS3 2FWD	5'-ACSGCRGCRTGYGGGGACAT-3'
	NS3 2REV	3'-GTGCTCTTRCCGCTRCCRG-5'

Çizelge 3.14. HCV 1. ve 2.tur PCR döngüleri

Bölge	1.tur PCR	2.tur PCR
NS3	94° C'de 3dk 94° C'de 15sn 53° C'de 1dk 72° C'de 1dk 45 döngü	94° C'de 5dk 94° C'de 30sn 53° C'de 1dk 72° C'de 1dk 5 döngü
		94° C'de 15sn 67° C'de 30sn 72° C'de 30sn 35 döngü
NS5A	94° C'de 3dk 94° C'de 35sn 54° C'de 35sn 72° C'de 1,30dk 72° C'de 10dk 45 döngü	94° C'de 3dk 94° C'de 35sn 54° C'de 35sn 72° C'de 1,30dk 72° C'de 10dk 45 döngü
NS5B	95° C'de 5dk 95° C'de 30sn 60° C'de 1dk 68° C'de 2dk 68° C'de 10dk 40 döngü	95° C'de 5dk 95° C'de 30sn 60° C'de 1dk 72° C'de 2dk 72° C'de 10dk 40 döngü

HDV polimeraz zincir reaksiyonu

Elde edilen cDNA örnekleri ile PCR yapılmıştır. HDV tüm genom PCR için 2 ayrı bölge seçilmiştir ve 2 primer seti (HDV(D3)F-HDV(E4)R, 1FWD-2REV) kullanılmıştır (Çizelge 3.14). Kullanılan PCR içerikleri ve döngüleri sırasıyla çizelge 3.14 ve 3.15'te verilmiştir.

Çizelge 3.15. HDV RNA tüm genom PCR'de kullanılan primer dizileri

Primerler	Nukleotit dizileri
HDV(300)F	5'-ACC TCC AGA GGA CCC CTT CAG CGA A-3'
HDV (1400)R	3'-GAG GGA GCT CCC CCG GCG AAG AG-5'
HDV(D3)F	5'-ACG AGT GAG GCT TAT CCC GG-3'
HDV(E4)R	3'-GAA GGA AGG CCC TCA AGA ACA AGA-5'
1FWD	5'-TCG TCC CCA CAT AGC AGA-3'
2REV	3'-AGG CCC TCG AGA ACA AGA-5'

Çizelge 3.16. HDV PCR içerikleri

Kullanılan kimyasallar	Kullanılan miktar
HDV(300)F/HDV (1400)R (1.tur PCR)	2,5 /2,5 µl
*HDV(D3)F/HDV(E4)R (2.tur PCR)	2,5 /2,5 µl
*1FWD/2REV (2.tur PCR)	2,5 /2,5 µl
Tampon (10X)	5 µl
MgCl ₂ (25 Mm)	3 µl
dNTP mix (2 mM)	5 µl
Taq DNA polimeraz (Roche Diagnostik, Almanya)	0,5 µl
ddH ₂ O	26,5 µl
HDV cDNA (1.tur PCR için)	5 µl
Kalıp DNA (1.tur PCR ürünü)	5 µl

*İki ayrı hedef bölge için seçilen primerler

Çizelge 3.17. HDV PCR döngüleri

Primerler		Reaksiyon döngüleri	Döngü sayısı
HDV(300)F-HDV (1400)R	1.tur PCR	94°C'de 5 dk 94°C'de 40 sn 65°C'de 1,5 dk 68°C'de 3 dk 72°C'de 7 dk	35
*HDV(D3)F-HDV(E4)R	2.tur PCR	95°C'de 5 dk 95°C'de 30 sn 65°C'de 45 sn	35
*1FWD-2REV	2.tur PCR	72° C'de 2 dk 72°C'de 7 dk	

*İki ayrı hedef bölge için seçilen primerler

Amplifikasyon ürünlerinin agaroz elektroforezinde görüntülenmesi

Amplifikasyon ürünlerinin dizi analizi için yeterli olup olmadığını belirlemek amaçlı agaroz jel elektroforezi kullanılmıştır.

Öncelikle 10X TAE (Tris-Acetate-EDTA) çözeltisi dH₂O ile IX'e indirgenmiştir.

- Trisbase 48,4 gr
- Glacial acetic acid 11,42 ml
- EDTA 20 ml
- dH₂O ile 1000 ml'e tamamlanmıştır

Agaroz jel hazırlanması

1. Agaroz 1 gr tartılmıştır, erlene koyulmuştur.
2. Üzerine TAE 50 ml eklenmiştir.
3. Hafifçe çalkalanıp mikrodalga fırına koyulmuştur.
4. Mikrodalga fırın karışım kaynamaya başlayana kadar yüksek ayarda çalıştırılmıştır.
5. Aralıklarla erlen mikrodalgadan çıkarılıp çalkalanmıştır.
6. Kaynama başladıktan sonra mikrodalganın ayarı düşürülmüştür. Tamamen eriyene kadar çalkalanarak ısıtılmıştır.
7. Çözelti muslukta biraz soğutulmuştur.
8. Etidiyum bromidden 0,5 µl eklenmiştir ve çalkalayarak tüm çözeltiye dağılması sağlanmıştır.
9. Jel tepsisine yavaşça dökülmüştür ve katılaşması için en az 15-20 dakika bekletilmiştir.

Örneklerin yürütülmesi

1. Jel tanka yerleştirilmiştir.
2. Tank jelin üstünü kapatacak kadar TAE ile doldurulmuştur.
3. Küçük bir parça parafilm alınmıştır ve yüklenecek örnek sayısı kadar yükleme tamponu (yaklaşık 1'er µl) üstüne koyulmuştur.
4. 5 µl örnek yükleme tamponu ile karıştırılıp jele yüklenmiştir.
5. Jelin ilk kuyucuğuna 3 µl 100 bp'lik markerdan yüklenmiştir.
6. 80 V da 35 dakika yürütülmüştür.

7. Jeldeki bantların görüntülenmesi için “UV jel dökümantasyon sistemleri” kullanılmıştır.

PCR ürünlerinin temizlenerek DNA dizi analizine hazırlanması

1. HBV, HCV ve HDV pozitif PCR örneklerine 50’şer µl silika eklenmiştir.
2. Örnek içeren silikalı tüpler 4600 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
3. Üst kısım alttaki silikalı peletin bozulmamasına dikkat edilerek pipetle alınmıştır.
4. Altta kalan peletin üzerine %70’lik alkoldan 50 µl eklenmiştir.
5. 4600 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
6. Üst kısım alttaki silikalı peletin bozulmamasına dikkat edilerek pipetle alınmıştır.
7. Altta kalan peletin üzerine 50 µl su eklenmiştir ve karışması için vorteks yapılmıştır.
8. Tüpler kapakları açık olacak şekilde 72 °C’de 10 dakika bekletilmiştir.
9. 4600 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmiştir.

Nanodropla DNA miktarının ölçülmesi

Silika ile temizlenen ürünlerin DNA dizi analizi PCR’lerinin yapılabilmesi için en az 10 ng DNA elde edilmesi gerekmektedir. PCR’a konan total DNA miktarı 20-25 ng olacak şekilde 2-2,5 µl DNA konur.

Dizi analizi polimeraz zincir reaksiyonu

HBV, HCV ve HDV dizi analizi PCR’ları BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystem, ABD) kullanılarak, kit içerisinden çıkan kullanım kılavuzunun talimatlarına göre yapılmıştır. Dizi analizinin PCR içerikleri Çizelge 3.17, termal döngü programı Çizelge 3.18’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.18. Dizi analizi PCR içerikleri

Reaksiyon maddesi	Konsantrasyon	Kullanılan hacim
Dizi analiz tamponu	5x	1,75 µl
Primer	3.2 pmol/µl	1 µl (3,2 pmol)
BigDye	-	0,5 µl
ddH ₂ O	-	4,75 µl
PCR ürünleri (DNA)	10ng/µl	2 µl
Toplam Hacim		10 µl

Çizelge 3.19. Termal döngü programı

Sıcaklık Derecesi	Döngü Süresi	Döngü Sayısı
94° C	1 dk	1
94° C	10 sn	25
50° C	5 sn	
60° C	4 dk	
4° C	∞	

DNA'ların temizlenmesi ve cihaza yüklenmesi

1. Formadid, -20° C'den erimesi için dışarı çıkarılmıştır.
2. Tüp başına 1 µl NaOAc çözeltisinden ve 25 µl %100'lük etanolden hazırladığımız karışımdan tüplere 26 µl olarak dağıtılmıştır.
3. Tüp kapakları kapatılıp el ile çalkalama yapılmıştır.
4. Tüpler oda sıcaklığında 10 dakika bekletilmiştir.
5. 4500 rpm'de 10 dakika santrifüj yapılmıştır.
6. İçindeki sıvı pipetle atılmıştır.
7. Pelletin üzerine 35 µl %70'lik etanol eklenir ve 4500 rpm'de 5 dakika santrifüj yapılmıştır.
8. Tüpün içindeki sıvı pipetle boşaltılmıştır.
9. Her bir tüpe 20 µl formamid eklenmiştir ve vorteks yapılmıştır.
10. Kısa bir santrifüj yapıldıktan sonra PCR ürünleri dizi analizi cihazına (ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer, PE Applied Biosystems, Foster City, CA) yüklenmiştir.

3.2.5. Filogenetik analiz

Hepatit B, C ve D virüsleri pozitif serumlardan elde edilen tüm dizileri GenBank'dan indirilen referans dizilerle ClustalW algoritması ve MUSCLE programı ile karşılaştırılarak dizilerin başlangıç ve sonundaki muhtemel yanlış okunan bölgeler çıkarılmıştır. Sıralanan ve düzenlenen dizilerle Molecular Evolutionary Genetics Analysis versiyon 10.0.5 (MEGA) programında Neighbor-Joining metodu (Kimura 2-parametresi) bootstrap testleri (1000 tekrar) kullanılarak genetik uzaklığa bağlı bir ağaç çizilmiştir. Filogenetik ağaç oluşturulurken kullanılan referans dizileri GenBank'tan (www.ncbi.nlm.nih.gov) sağlanmıştır.

Ayrıca HBV ve HCV genotiplemesi için sırasıyla Hepatit B Virüs veri tabanı genotiplendirme aracını ve Geno2pheno-HCV veritabanından da faydalanılmıştır.

3.2.6. İstatistiksel analiz

İstatistiksel değerlendirmeler için veriler Statistica 12 (StatSoft, ABD) ve OpenEpi version 3.01 (<http://www.openepi.com>) paket programı kullanılarak yapılmıştır. İstatistiksel analizlerde frekans, yüzde, ortalama±standart sapmalar hesaplanmıştır. Serolojik belirteçlerin cinsiyet ve yaşa bağlı farkların karşılaştırılmasında Ki-kare testi kullanılmıştır. Tüm analizler %95 güven aralığı (CI) ile yapılmıştır ve istatistiksel anlamlılık düzeyi $p<0,05$ olarak kabul edilmektedir.



4. BULGULAR

4.1. HBV, HCV ve HDV Serolojik Belirteçlerin Dağılımı

Çalışmaya alınan 881 katılımcıların 515'i (%58,4) kadın ve 366'sı (%41,6) erkek olup, yaşları 5-75 (yaş ortalaması: 34.2 ± 17) yıl arasında değişmektedir. İki cinsiyet arasında yaş ortalamaları açısından istatistiksel anlamlı fark yoktu ($p=0,07$) (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Çalışmaya dahil edilen katılımcıların yaş ve cinsiyetlerine göre dağılımı

Hasta sayısı	Cinsiyet Erkek (%) / Kadın n (%)	Yaş			p
		Ortalama yaş	Std. sapma	Aralığı	
881	366 (41,5) / 515 (58,5)	32,3	17,7	5-75	0,07
		35,4	16,4	5-75	

HBsAg genel çalışma popülasyonu için pozitiflik oranı %3,6 iken, kadınlarda ve erkeklerde sırasıyla %3,9 ve %3,3 olarak saptanmıştır. HBsAg pozitif olan örneklerde çalışılan HBeAg hepsinde negatif ve %95,7 anti-HBe pozitifliği şeklinde saptanmıştır. Örneklerin 419'unda (%47,5) anti-HBs pozitifliği tespit edilmiştir. Bunlardan 257 (49,9%) kadın ve 162 (44,2%) erkekti (Çizelge 4.2). Sadece anti-HBs pozitif olan 196 (%46,8), aynı anda anti-HBc ve anti-HBs pozitif olan 223 (%53,2) idi. Genel anti-HBc pozitifliği 294 (%33,4) iken, kadın ve erkeklerde sırasıyla 181 (%35,1) ve 113 (%30,8) olarak bulunmuştur. Test edilen 881 örneğin 42'sinde (%4,8) izole anti-HBc pozitifliği saptanmıştır. İzole anti-HBc'li örneklerin birinde (%2,4) HCV koenfeksiyonu bulunmuştur. Ayrıca izole anti-HBc pozitif saptanan 42 örneğin HBV-DNA sonuçlarının da negatif olduğu gözlenmiştir. HBsAg ve anti-HBs'nin birlikte pozitifliği %0,1 olarak saptanmıştır (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.2. HBV, HCV ve HDV serolojik belirteçlerinin dağılımı

	Kadın (n=515)			Erkek (n=366)			Toplam (n=881)			X ²	p
	Pozitif	%	%95 CI	Pozitif	%	%95 CI	Pozitif	%	%95 CI		
HBsAg	20	3,9	2,5-6,0	12	3,3	1,8-5,7	32	3,6	2,6-5,1	0,22	0,63
Anti-HBs	257	49,9	45,6-54,2	162	44,3	39,3-49,4	419	47,6	44,3-50,9	2,72	0,09
Anti-HBc	181	35,2	31,1-39,4	113	30,9	26,4-35,8	294	33,4	30,3-36,6	1,75	0,18
HBeAg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Anti-HBe	1	0,19	0,01-0,95	-	-	-	-	0,1	0,003-0,63	-	-
Anti-HCV	18	3,5	2,2-5,5	8	2,2	1,0-4,3	26	3,0	2,0-4,3	1,28	0,26
Anti-HDV*	2	10	1,6-31,3	2	16,7	3,5-46,0	4	12,5	4,4-28,7	0,30	0,58

* Sadece HBsAg pozitif hastalarda (n=32) incelenmiştir

Genel olarak, çalışma grubunun 389 (%44,1) örneği, çalışılan tüm HBV belirteçleri için negatif saptanmış olup, duyarlı popülasyon olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.3).

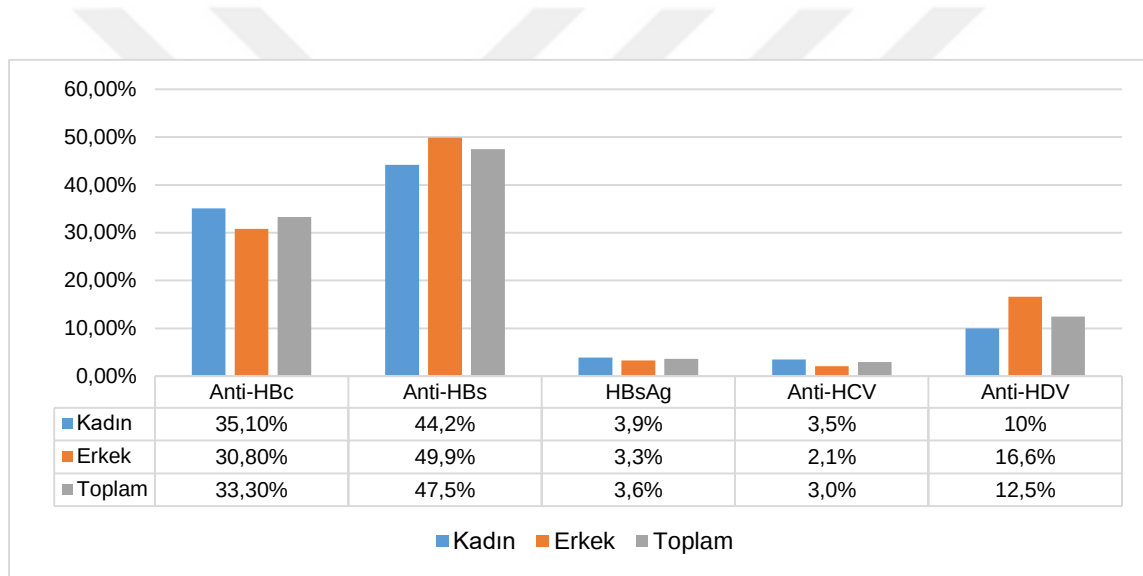
Çizelge 4.3. Çalışma popülasyonunun HBV serolojik yorumlama grupları

Grup	Durum	Sayı	Oran %	Yorum
Anti-HBc Anti-HBs HBsAg	Negatif Negatif Negatif	389	%44,1	HBV'ye karşı duyarlı Aşılama önerilir
Anti-HBc Anti-HBs HBsAg HBeAg Anti-HBe	Pozitif Pozitif Negatif Negatif Pozitif	107	%12,1	Enfeksiyon geçirilerek oluşan bağışıklık
Anti-HBc Anti-HBs HBsAg	Negatif Pozitif Negatif	196	%22,2	Aşılamaya karşı bağışıklık
Anti-HBc Anti-HBs HBsAg	Pozitif Negatif Negatif	42	%4,8	Yoruma açık; Yanlış pozitiflik Kronik olarak enfekte olabilir Humoral yanıtta bozukluk var, immünite tam gelişmemektedir Akut HBV enfeksiyonunun düzelmesini gösterebilir Diğer hepatovirüslerle koenfeksiyon olabilir
Anti-HBc Anti-HBs HBsAg	Pozitif Negatif Pozitif	30	%3,4	Aktif HBV enfeksiyonu (genellikle kronik) Anti-HBc IgM varsa, akut enfeksiyonu gösterir
Anti-HBc Anti-HBs HBsAg	Negatif Negatif Pozitif	2	%0,2	Erken akut enfeksiyon
Anti-HBc Anti-HBs HBsAg	Negatif Pozitif Pozitif	1	%0,1	Akut HBV enfeksiyonunun iyileşme dönemi S geninde kaçış (escape) mutasyon Farklı HBsAg subtipleriyle karşılaşmış taşıyıcılar İmmünsüprese hastalarda Yalancı pozitiflik
HBsAg HBeAg Anti-HBe HBV DNA	Pozitif Negatif Pozitif ≤2,000 IU/mL	1	%3,1	HBeAg negatif kronik hepatit B enfeksiyonu

Anti-HCV 26 (%3) örnekte pozitif, kadınlar ve erkeklerde sırasıyla 18 (%3,5), 8 (%2,1) olarak saptanmıştır. Cinsiyet açısından, kadın ve erkekler arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($\chi^2=1,28$; $p=0,26$).

Çalışma popülasyonumuzda anti-HDV pozitifliği kadın ve erkeklerde eşit, toplam 4 bireyde (HBsAg pozitif olanların %12,5'i) saptanmıştır. İstatiksel olarak cinsiyete göre anlamlı fark bulunmamıştır ($\chi^2=0,30$; $p=0,58$) (Bkz. Çizelge 4.2).

Genel olarak çalışılan tüm serolojik belirteçlerin pozitifliği açısından cinsiyetler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p>0,05$) (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. HBV, HCV ve HDV serolojik belirteçlerinin cinsiyete göre dağılımı.

Katılımcılar yaşlarına göre 5 gruba ayrılmıştır (5-18, 19-32, 33-46, 47-60, 61-75 yaş grupları). Seropozitiflik oranlarının cinsiyet ve yaşa göre dağılımı Çizelge 4.4'de gösterilmiştir. Anti-HBc ve anti-HBs prevalansı yaş grupları arasında anlamlı bir farklılık göstermektedir ve her iki cinste pozitiflik oranları yaşla birlikte artmaktadır. HBsAg oranı ile yaş arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. HBsAg çocuk yaş grubunda (5-18 yaş) negatif olmakla birlikte, 33-46 yaş grubunda, her iki cinste (kadın %7,8; erkek %8,9) diğer yaş gruplarına göre daha yüksek bulunmuştur.

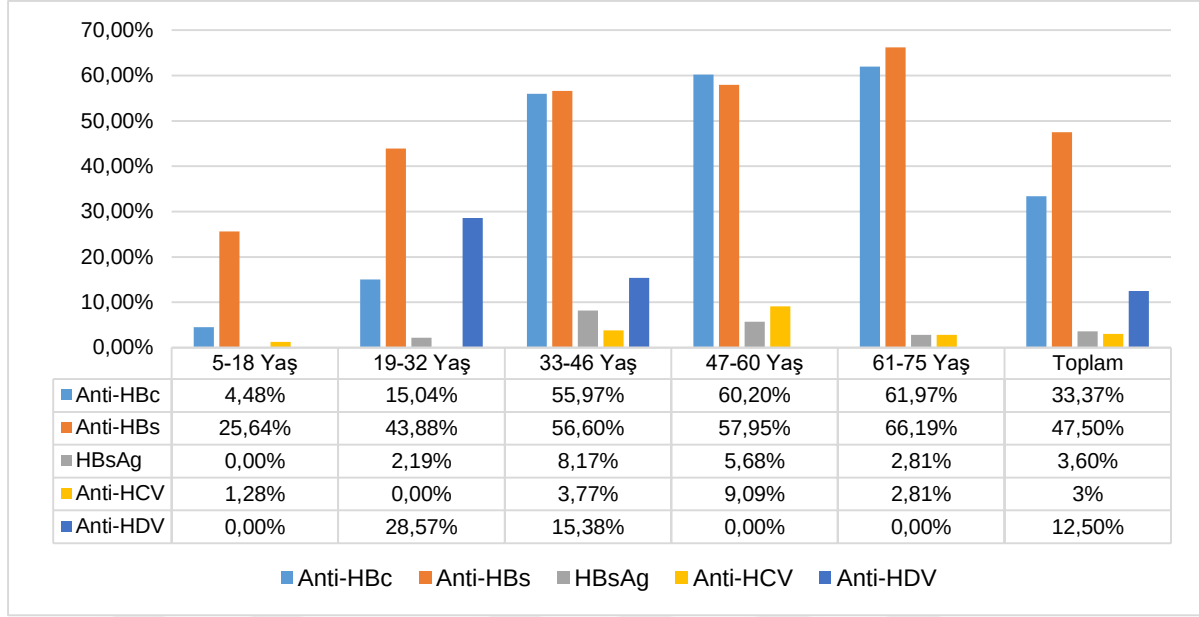
Çizelge 4.4. Cinsiyet ve yaş gruplarına göre HBV, HCV ve HDV prevalansı

Yaş grupları (yıl)	Cinsiyet	Anti-HBc		Anti-HBs		HBsAg		Anti-HCV		Anti-HDV			
										Genel		HBsAg pozitiflerde	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
5-18	Kadın (n=64)	4	6,25	14	21,9	0	0,0	1	1,56	0	0,0	0	0,0
	Erkek (n=92)	3	3,27	26	28,2	0	0,0	1	1,08	0	0,0	0	0,0
	Toplam(n=156)	7	4,49	40	25,6	0	0,0	2	1,28	0	0,0	0	0,0
19-32	Kadın (n=195)	25	12,9	86	44,1	4	2,05	0	0,0	1	0,51	1	25
	Erkek (n=124)	23	18,5	54	43,5	3	2,42	0	0,0	1	0,80	1	33,3
	Toplam(n=319)	48	15	140	43,9	7	2,2	0	0,0	2	0,62	2	28,5
33-46	Kadın (n=103)	61	59,2	58	56,3	8	7,76	5	4,85	1	0,97	1	12,5
	Erkek (n=56)	28	50	21	37,5	5	8,92	1	1,8	1	1,78	1	20
	Toplam(n=159)	89	56	79	50,6	13	8,17	6	3,77	2	1,26	2	15,4
47-60	Kadın (n=111)	66	59,4	72	64,0	6	5,4	10	9,0	0	0,0	0	0,0
	Erkek (n=65)	40	61,5	41	63,0	3	4,61	6	9,23	0	0,0	0	0,0
	Toplam(n=176)	106	60,2	113	64,2	9	5,11	16	9,09	0	0,0	0	0,0
61-75	Kadın (n=42)	25	59,6	27	64,3	2	4,76	2	4,76	0	0,0	0	0,0
	Erkek (n=29)	19	65,5	20	69	1	3,45	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	Toplam(n=71)	44	62	47	66,2	3	4,22	2	2,81	0	0,0	0	0,0
Genel	Kadın (n=515)	181	35,1	257	49,9	20	3,9	18	3,5	2	0,39	2	10,0
	Erkek (n=366)	113	30,9	162	44,3	12	3,27	8	2,18	2	0,54	2	16,6
	Toplam(n=881)	294	33,3	419	47,5	32	3,63	26	2,96	4	0,46	4	12,5

HCV prevalansı kadın ve erkeklerde en yüksek 47-60 yaş grubunda (%9,1) saptanmıştır. Anti-HCV 19-32 yaş grubunda her iki cinsten negatif, 61-75 yaş grubunda ise erkeklerde negatif bulunmuştur.

Anti-HDV seropozitifliği her iki cinsten, 33-46 yaş (%15,4) grubuna göre 19-32 (%28,5) yaş grubunda daha yüksek olmakla birlikte, diğer yaş gruplarında negatiftir (Bkz. Çizelge 4.4).

Çalışma grubunda HVB, HCV ve HDV belirteçlerinin yaş grubuna göre dağılımı Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. HBV, HCV ve HDV belirteçlerinin yaşa göre dağılımı.

4.2. HBV, HCV ve HDV Moleküler Epidemiyolojisi Sonuçları

Serolojik belirteçleri pozitif çıkan HBV, HCV ve HDV örneklerine real-time PCR testleri yapılmıştır. Seroloji ve real-time PCR sonuçları Çizelge 4.5'te verilmiştir.

HBsAg pozitif örneklerin tümüne HBV DNA kantitasyonu yapılmıştır. Toplam 32 HBsAg pozitif katılımcı arasında (20 kadın, 12 erkek; yaş ortalaması: 43,4±11,6 yıl) 25 bireyde HBV DNA saptanmıştır.

Çizelge 4.5. HBV, HCV ve HDV'nin serolojik ve moleküler yöntemlere göre pozitifliği

	Seroloji (n=881)		Real-time PCR ^a	
	N	Enfeksiyon oranı (%95 CI)	N	Enfeksiyon oranı (%95 CI)
HBV	32	3,63 (2,54-5,02)	25	2,84 (1,88-4,1)
HCV	26	2,95 (1,98-4,23)	10	1,14 (0,57-2,01)
HDV	4	0,45 (0,14-1,09)	3	0,34 (0,08-0,92)
HDV ^b	4	12,5 (4,10-27,45)	3	9,38 (2,44-23,43)

^a Real-time PCR serolojisi pozitif bulunan hasta örneklerine yapılmıştır

^b HBsAg pozitif hastalarda

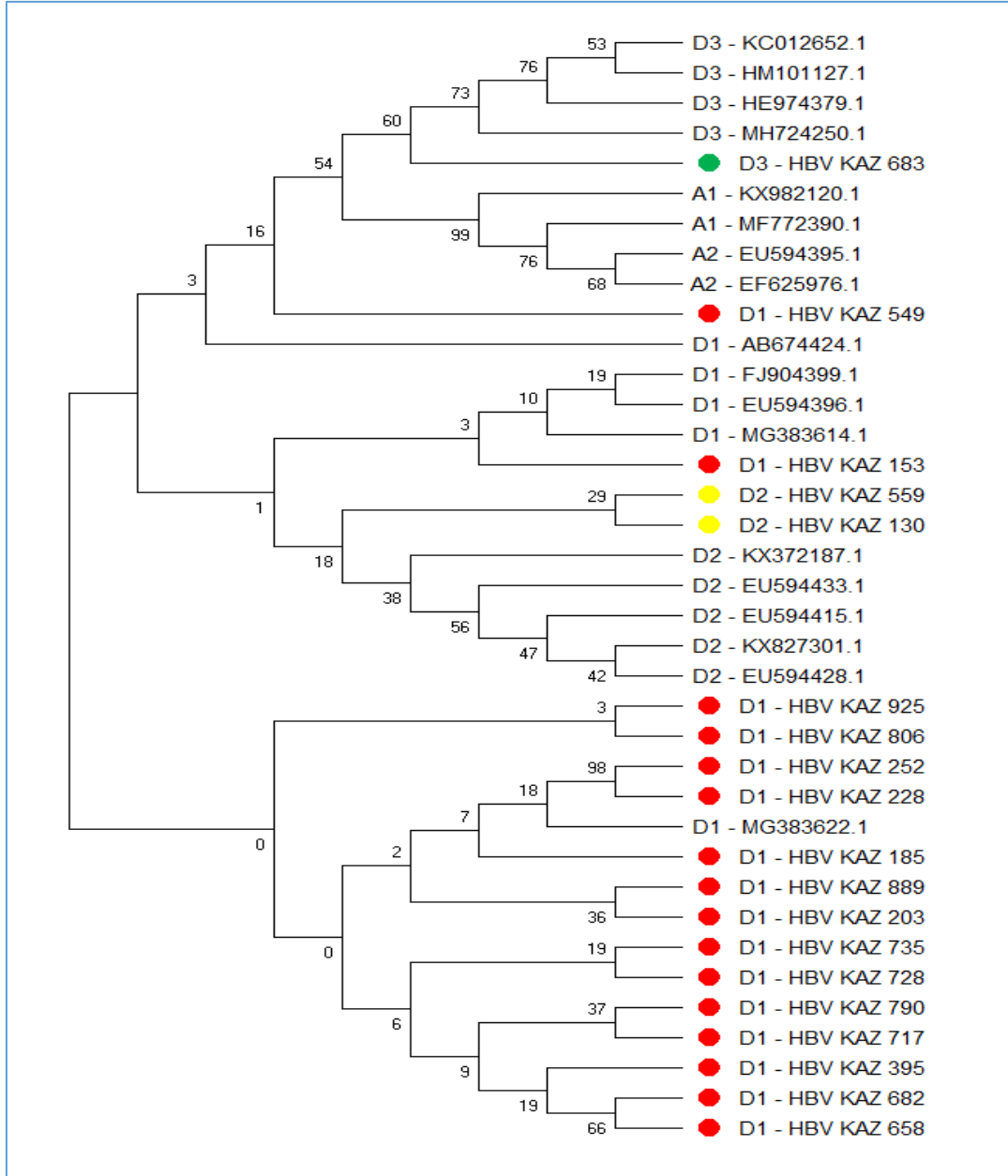
HBV DNA pozitif örnekler arasında düşük viral yük ($\leq 2,000$ IU/mL) ve orta viral yük (2,000 -10,000 IU/mL) oranları sırasıyla %92 ve %8 iken, yüksek viral yük ($\geq 10,000$ IU/mL) ise hiçbir örnekte tespit edilmemiştir (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. Çalışma grubunda HBV, HCV ve HDV viral yük dağılımı

Virüs	Viral yük	Erkek	Kadın	Genel (%)	YO $\pm$ SS
HBV	$\leq 2,000$ IU/mL	9	14	23 (%92)	44,6 $\pm$ 12,3
	2,000 -10,000 IU/mL	1	1	2 (%8)	33,5 $\pm$ 16,3
	$\geq 10,000$ IU/mL	0	0	0	00,0 $\pm$ 0,0
	Toplam	10	15	25 (%100)	43,7 $\pm$ 12,7
HCV	< 800,000 IU/mL	2	4	6 (%60)	53,7 $\pm$ 9,1
	> 800,000 IU/mL	0	4	4 (%40)	54,3 $\pm$ 13,8
	Toplam	2	8	10 (%100)	53,9 $\pm$ 10,5
HDV	<10000 IU/mL	1	0	1 (%33,3)	43 $\pm$ 0,0
	≥ 100000 IU /mL	1	1	2 (%66,7)	30 $\pm$ 0,0
	Toplam	2	1	3 (%100)	34,3 $\pm$ 7,5

Real-time PCR ile HBV DNA'sı pozitif saptanmış örnekler, HBV genotiplendirmesi için geleneksel PCR ile tüm genomunu amplifiye edilmesi planlanmıştır. Ancak çoğu örneklerde HBV DNA konsantrasyonu düşük olduğu için çoğunda amplifikasyon başarısız olmuştur. Sonuç olarak 19 HBV pozitif örneğinde polimeraz bölgesinin amplifikasyonu ve sekanslaması sonrasında HBV DNA genotiplendirmesi yapılmıştır. Ayrıca HBV serotipleri de incelenmiştir.

Kazak hastalarının sekansları daha önce GenBank'da yayınlanmış HBV referans suşları ile karşılaştırılarak sıralanmış ve evrimsel uzaklıkları belirlenmiştir. Sonrasında da <https://hbvdb.lyon.inserm.fr/HBVdb/HBVdbIndex> adresinden Hepatit B virüs veritabanı genotiplendirme aracını kullanarak, genotip D (%100) olarak sınıflandırılmıştır. Filogenetik analizinde, Kazak izolatları genotip D dalında: alt genotipi D1 olarak belirlenen toplam 16 örnek Genbank'da kayıtlı D1 referans dizileri ile aynı dalda, D2 olarak belirlenen 2 örnek D2 dizileri ile aynı dalda, D3 olarak belirlenen tek örnek D3 referansları ile aynı dallarda yer almıştır. (HBV'nin polimeraz bölgesinden Neighbor-Joining metodu ile (1000 bootstrap değeri) elde edilen filogenetik ağaç Şekil 4.3'te verilmiştir).



Şekil 4.3. Çalışmamızda elde edilen HBV gen dizilerinin kısmi filogenetik analizi.

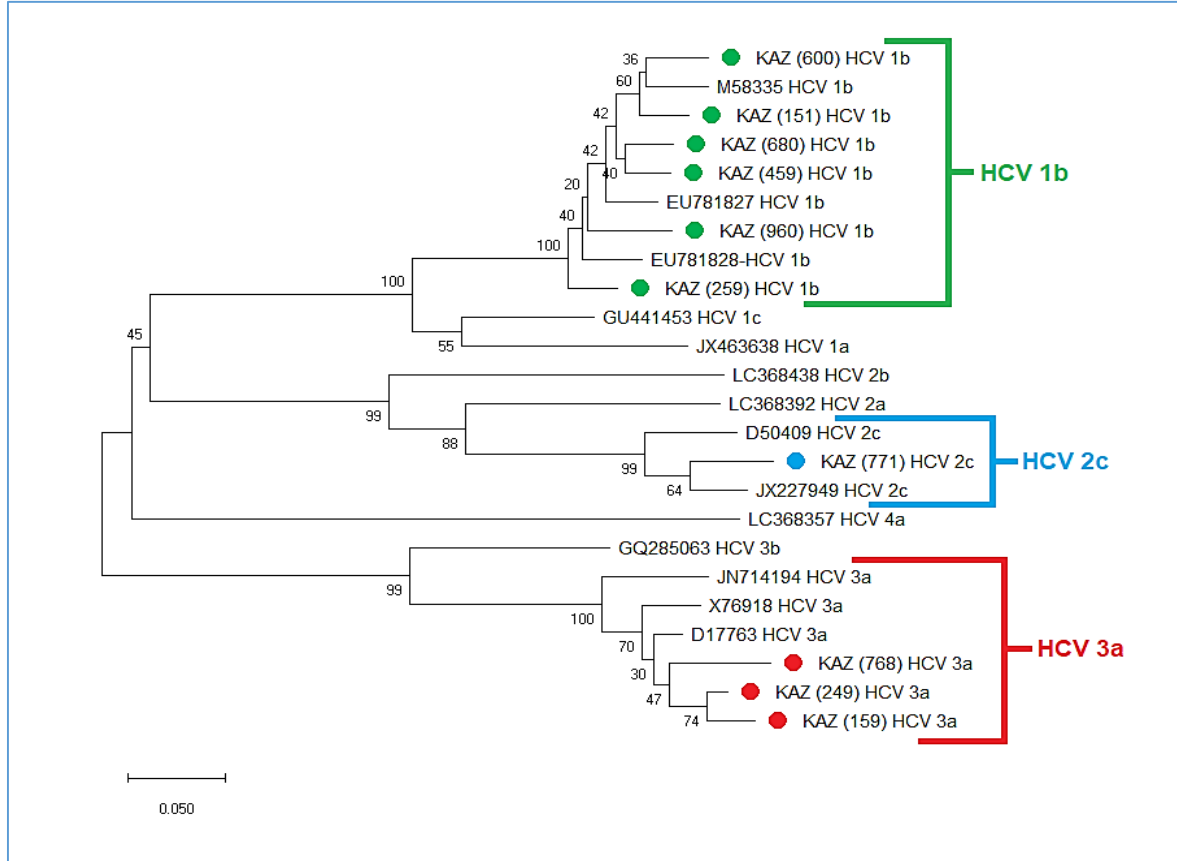
Hepsi genotip D olarak saptanan örneklerin on beşi ayw2 (%78,8), ikisi ayw3 (%10,6) ve kalan iki örnek ayw4 (%10,6) HBsAg serotipleri olarak tanımlanmıştır (Çizelge 4.8).

Anti-HCV pozitif 26 katılımcılar (18 kadın, 8 erkek; yaş ortalaması $49,6 \pm 12,6$ yıl) arasında real-time PCR ile yapılan viral yük tayininde 10 kişide viral yükü $4,1 \times 10^4$ ile $9,8 \times 10^6$ IU / mL aralığında olan HCV RNA saptanmıştır.

Viral yükü pozitif olan örneklerde HCV genomun NS5B bölgesi amplifiye edilmiş ve daha sonra DNA dizi analizi yapılmıştır. Filogenetik analiz sonucunda, HCV-1b olarak belirlenen 6 örnek (%60) GenBank'da yayınlanmış 1b referans dizileri ile aynı dalda, HCV-3a olarak belirlenen 3 örnek (%30) 3a dizileri ile aynı dalda ve HCV-2c olarak belirlenen 1 örnek (%10) 2c referans dizileri ile aynı dallarda yer almıştır. HCV'nin NS5B bölgesinden Neighbor-Joining metodu ile (1000 bootstrap değeri) elde edilen filogenetik ağaç Şekil 4.4'de gösterilmiştir.

Ek olarak, <https://hcv.geno2pheno.org/index.php> adresinden Geno2pheno-HCV veritabanını kullanarak ekstra genotipleme analizi yapılmış ve filogenetik analizi ile elde edilen sonuçları doğrulanmıştır.

Ayrıca genotipleri saptanan (1b, 3a, 2c) HCV örneklerinde NS3, NS5A ve NS5B bölgelerinde ilaç direnciyle ilgili olarak belirlenmiş aminoasit noktalarındaki nükleotit ve aminosit dizi analizi incelenmiştir. Yapılan dizi analizi sonucunda genotip 1 b suşlarında NS3 bölgesinde I132V, M175L; 2c suşlarında A39V, Q80G, S122G, M175L; 3a suşlarında ise M175L aminoasit değişikliği tespit edilmiştir. NS5A bölgesinde Q30R/H, H58P; NS5B'de C316N aminoasit değişikliği tanımlanmıştır. Genotip 1b suşlarında 1/6 (%16.6) hastada velpatasvir, elbasvir, ledipasvir, daclatasvir direnç ile ilişkili NS5A bölgesinde Y93C/H mutasyonu, NS5B bölgesinde L159F mutasyonu ile ilişkili sofosbuvir azalmış duyarlılık gözlenmiştir. Saptanan tüm aminoasit değişiklikleri ve direnç mutasyonları Çizelge 4.7'de gösterilmiştir.



Şekil 4.4. Çalışmamızda elde edilen HCV gen dizilerinin kısmi filogenetik analizi.

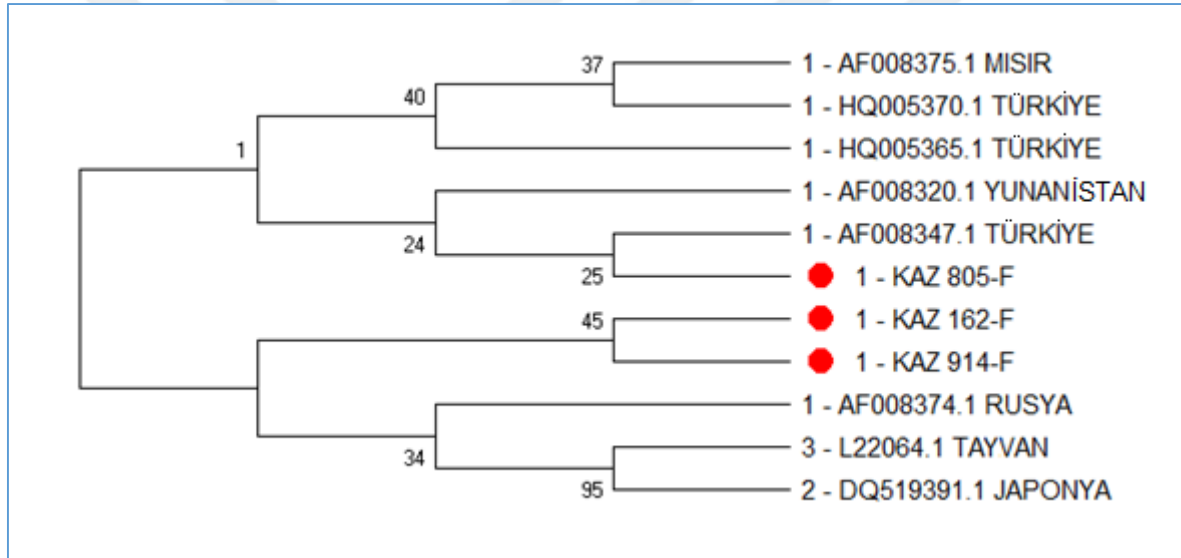
Çizelge 4.7. Kazak izolatları arasında HCV NS3, NS5A ve NS5B bölgelerinde aminoasit değişiklikleri ve direnç mutasyonları

İlgili gen	Genotip	Mutasyon paterni	Hasta n (%)	Direnç paterni	Direnç durumu
NS3	1b	I132V	5/6 (%83,3)	Aminoasit değişikliği	-
		M175L	1/6 (%16,7)	Aminoasit değişikliği	-
	2c	A39V	1/1 (%100)	Aminoasit değişikliği	-
		Q80G	1/1(%100)	Aminoasit değişikliği	-
		S122G	1/1(%100)	Aminoasit değişikliği	-
		M175L	1/1(%100)	Aminoasit değişikliği	-
	3a	M175L	3/3(%100)	Aminoasit değişikliği	-
NS5A	1b	Q30R/H	5/6 (%83,3)	Aminoasit değişikliği	-
		H58P	6/6 (%100)	Aminoasit değişikliği	-
		Y93C/H	1/6 (%16,7)	Velpatasvir, elbasvir, ledipasvir, daclatasvir	Dirençli
NS5B	1b	L159F	1/6 (%16,7)	Sofosbuvir	Azalmış duyarlılık
		C316N	4/6 (%66,7)	Aminoasit değişikliği	-

Anti-HDV pozitif 4 örneğin tümüne (2 kadın, 2 erkek; yaş ortalaması $36,3 \pm 7,2$ yıl) HDV RNA kantitasyonu yapılmıştır. Toplam 3 örnekte HDV RNA tespit edilmiştir (viral yük aralığı $6,6 \times 10^3$ ile $2,3 \times 10^6$ IU / mL). HDV RNA pozitif bulunan 3 örneğin ikisinde HBV DNA pozitif, bir örnekte ise negatif bulunmuştur.

Viral yükü pozitif olan HDV örnekleri amplifiye edilmiş ve daha sonra DNA dizi analizi yapılmıştır. Filogenetik analizi sonucunda, Kazak HDV izolatlarının HDV-1'e (%100) ait olduğunu göstermiştir (Şekil 4.5).

Ayrıca çalışma grubunda HBV, HCV ve HDV genotip ve alt tiplerinin sıklığı Çizelge 4.8'de gösterilmiştir.



Şekil 4.5. Çalışmamızda elde edilen HDV gen dizilerinin filogenetik analizi.

Çizelge 4.8. Çalışma grubunda HBV, HCV ve HDV genotip/alt genotiplerinin sıklığı

Sekans		Genotip	%	Alt genotip	%(n)	Serotip	%(n)
N	%						
HBV	19 (76)	D	100	D1	84,2 (16)	ayw2	78,8 (15)
						ayw3	5,3 (1)
				D2	10,5 (2)	ayw3	5,3 (1)
						ayw4	5,3 (1)
HCV	10 (100)	1	60	D3	5,3 (1)	ayw4	5,3 (1)
		2	10	1b	60 (6)		
		3	30	2c	10 (1)		
HDV	3 (75)	1	100	3a	30 (3)		
				-	-		

5. TARTIŞMA

Araştırmalar viral hepatitlerin dağılımının coğrafi bölgelere göre farklılıklar gösterdiğini bildirmektedir. HBV ve HCV, Kazakistan'da endemiktir. Kazakistan'da HBV ve HCV ilgili birkaç çalışma uyuşturucu kullanıcıları, seks işçileri, mahpuslar gibi yüksek gruplar arasında yapılmıştır [230, 231] ve bu virüslerin prevalansı ile ilgili veriler çoğunlukla kan merkezlerinden edinilmiştir [11, 13, 232, 233]. Ancak genel popülasyon çalışmaları çok daha az dikkate alınmıştır. HDV prevalansı hakkında ise güncellenmiş bir veri bulunmamaktadır. Bunun yanı sıra, genel popülasyonda viral hepatitlerin moleküler epidemiyolojisi ile ilgili veriler çok yetersizdir.

Bir popülasyonda viral hepatitlerin epidemiyolojisinin araştırılması önemlidir, çünkü bu araştırma teşhis ve tedavi stratejileri ile ilgili politika belirleme kararlarını etkileyebilir. Bu nedenle, çalışmamızda HBV, HCV ve HDV'nin serolojik ve moleküler epidemiyolojilerini daha iyi değerlendirebilmesi için genel popülasyonda anti-HBc, anti-HBs, HBsAg, HBeAg, anti-HBe, anti-HCV ve anti-HDV incelenmesi yanı sıra Türkistan bölgesinde dolaşan viral genotipler, alt genotipler ve alt tipler de araştırılmıştır. Ayrıca, HCV örneklerinde NS3, NS5A ve NS5B bölgelerinde ilaç direnciyle ilgili olarak belirlenmiş aminoasit noktalarındaki nükleotit ve aminosit dizi analizi incelenmiştir.

Viral hepatitler tüm dünya için olduğu gibi, Kazakistan için de önemli bir halk sağlığı sorunu olmayı sürdürmektedir. Hepatotropik virüsler arasında, hepatit B, C ve D virüsleri kronik hepatit, siroz ve hepatoselüler karsinomaya neden olabilir ve hepatite bağlı mortalitenin %96'sını oluşturduğu bilinmektedir [3].

Viral hepatitlerin tanısında rutin olarak serolojik, biyokimyasal ve moleküler biyolojik testler uygulanmaktadır. Bu amaçla, enfeksiyon sırasında her bir virüse özgül kanda oluşan belirteçler (antikor ve/veya antijen), en yaygın olarak ELISA temelli yöntemler ile araştırılmaktadır. Bu serolojik belirteçlerin tespiti gerek tanı, gerek hastalığın gidişi ve izlemi için büyük önem taşımaktadır [88].

Bu araştırma, Türkistan bölgesinin genel popülasyonunda kan yoluyla bulaşan viral hepatitlerin ilk epidemiyolojik değerlendirmelerini içermektedir. Çalışma, bölgenin

yaşları 5-75 yıl arasında değişen, toplam 881 bireyin test edilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Genel popülasyonda viral hepatitlerin durumunu araştırmak için, serolojik belirteçler hepatit B virüsü, hepatit C virüsü ve hepatit delta virüsü enfeksiyonları açısından test edilmiştir.

Araştırma sonuçlarımıza göre katılımcıların çoğunluğu kadındır (kadın-%58,4; erkek-%41,6). Araştırma yapılan (kan alma) saatlerin gündüz saatleri olması ile birlikte erkeklerin genellikle işte bulunduğu ve çoğunun şehir dışı, yurt dışında çalıştıkları için evde bulunamaması sonucu bu araştırmada kadınlara erkeklerden daha fazla ulaşılmıştır. Nurgaliyeva ve diğerlerinin Almatı eyaletinde 290 gönüllü ile yaptıkları bir araştırmaya katılan kadınların sayısı erkeklerden fazla olmuştur [12]. Nersesov ve diğerlerinin Güney Kazakistan'da [14], Berkinbayev ve diğerlerinin Pavlodar [17] ve Aktobe bölgelerinde yaptıkları çalışmaları da bu durumu destekler niteliktedir [15].

HBV enfeksiyonunun görülme sıklığı ve taşıyıcılık oranları; yüksek, orta ve düşük endemisite bölgelerine göre farklılık göstermekte olup, Kazakistan'da da bölgelere ve incelenen kişilerin yaş, meslek grupları ve sosyoekonomik durumlarına göre de değişmekle birlikte, %1,5 - 6,8 arasında oranlar bildirilmektedir [11-17].

Bu çalışmada, HBsAg'i çalışılmış 881 kişide seropozitiflik %3,6 olarak saptanmıştır. Bu oran Nersesov ve diğerlerinin Güney Kazakistan'da genel popülasyonda %3,4 [14], Nurgaliyeva ve diğerlerinin Almatı eyaletinde %3,8 oranda HBsAg pozitifliğini gösteren çalışmalarıyla uyumludur [12];

Kazakistan'da, HBsAg taramalarının yapıldığı çalışmalar içinde en çok yer alan gruplardan biri kan donörleridir. Donörlerde HBsAg pozitifliği, Skorikova ve diğerleri Nursultan'da 28248 kan bağışçısında %1,5 [13]; İgissinov ve diğerleri Kazakistan kan donörlerinde yıllık HBV prevalansı %2,1 oranında seropozitiflik bildirilmişlerdir [11].

Botova'nın Karaganda eyaletinde yaptığı araştırmada sağlık çalışanlarında %2,1, hastaneye başvuran hastalarda ise %5,6 oranda HBsAg pozitifliği bulunmuştur [234].

Berkinbayev ve diğerkleri Almatı eyaletinde %4 [16], Pavlodar eyaletinde %4,9 [17], Aktobe eyaletinde ise %6,8 oranda HBsAg pozitifliğini tespit etmişlerdir [15].

Hepatit B ile doğal enfeksiyona maruz kalan kişilerde bulunan ve anti-HBs'lerin kaybolmasından sonra uzun süre devam edebilen anti-HBc, sıklıkla geçmiş HBV enfeksiyonunun kanıtı olarak bilinmektedir [235]. Anti-HBc pozitif bireylerin çoğunluğu sağlıklı görünse de, bazılarında saptanabilir HBV DNA varlığı sebebiyle potansiyel olarak bulaştırıcıdır [236]. Kazakistan'da anti-HBc'nin yaygınlığına ilişkin bilgi eksikliği vardır. İncelenen çalışma popülasyonunun %33,4'ünün, Kazakistan'ın Almatı şehrinde gönüllüler üzerine yapılan çalışma sonuçlarına benzer şekilde mevcut ya da geçmiş HBV enfeksiyonu olduğuna dair kanıtları vardır, bu da sağlıklı popülasyonun yaklaşık %30'unun saptanabilir anti-HBc antikorlarının olduğunu göstermektedir [12]. Kazakistan'da anti-HBc seropozitifliğinin prevalansı, Özbekistan ve Tacikistan'dan (eski Sovyetler Birliği) İsrail'e göç eden 110 Buhara Yahudisinde bildirilenlerden önemli ölçüde daha düşüktür, bunların %66'sının HBV'ye maruz kalma kanıtı vardır [237]. Bununla birlikte, geçmişte veya şu andaki hepatit B enfeksiyonunun yaygınlığı, İran (%9,98) [238], Pakistan (%17,28) [239], İspanya (%10) [240] ve Kuzey Kıbrıs'tan (%13,2) daha yüksektir. Bu nedenle, Kazakistan'da kan donörlerinde anti-HBc taranması tartışılabilir durumdadır.

Hepatit B enfeksiyonunda diğerk serolojik belirteçler olmaksızın anti-HBc'nin tek başına saptanması izole anti-HBc pozitifliği olarak tanımlanmaktadır [241, 242]. İzole anti-HBc pozitifliği durumu endemik bölgelerde oldukça sık rastlanan bir serolojik profildir. Bu durumda: tanısal testlerden kaynaklanan yalancı pozitiflik; pencere döneminde akut enfeksiyonun göstergesi; bağışıklığa rağmen düşük anti-HBs seviyeleri; düşük HBV seviyesine sahip kronik taşıyıcı; diğerk hepatovirüslerle koenfeksiyon; immünsüprese hastaların sıklıkla anti-HBs oluşturamaması gibi çeşitli olasılıklar izole HBc antikorlarının ortaya çıkmasına neden olabilir [242]. HBV enfeksiyon prevalansının yüksek olduğu ülkelerde saptanan izole anti-HBc IgG pozitifliğinin virüsle karşılaşma nedeniyle mi ya da çapraz reaksiyona mı bağlı olduğunun ayırt edilmesi önem taşımaktadır [243]. İzole anti-HBc sıklığı coğrafi bölgelere göre farklılık göstermekte olup, Kazakistan'da bu konuyla ilgili çalışma bulunmamaktadır. Bizim çalışmamızda izole anti-HBc pozitifliği %4,8 olarak

saptanmıştır. Hepatit B virüsü enfeksiyonunun diğer virüs enfeksiyonlarıyla (HIV, HCV, HDV koenfeksiyon/süperenfeksiyon vs.) bir arada görülmesi HBV replikasyonunu baskılayabilir ve izole anti-HBc pozitifliğine yol açabilir [242]. Bizim çalışmamızda izole anti-HBc IgG pozitifliği saptanan örneklerin birinde eşlik eden anti-HCV (%2,4) pozitifliği bulunmuştur. İzole anti-HBc pozitifliği saptanan hastalarda HBV DNA pozitiflik oranları farklı çalışmalarda kullanılan farklı yöntemlere göre değiştiği rapor edilmiştir [244, 245]. Knöll ve diğerleri izole anti-HBc pozitif hastaların %8,1'inde HBV-DNA pozitifliği saptamış ve bu vakaların %20,4'ünde HCV koenfeksiyonu olduğunu bildirmişlerdir [246]. Ramezeni ve diğerleri izole anti-HBc pozitifliğini yüksek riskli hastalarda (HIV ile enfekte ve hemodiyaliz hastaları) %10,17, kan donörlerinde ise %2,07 olarak saptamışlardır. İzole anti-HBc pozitif yüksek riskli hastaların %30'unda HBV DNA varlığını, ancak izole anti-HBc'li kan donörlerin hiçbirinde HBV DNA'nın bulunmadığını ifade etmişlerdir [247]. Çetinkol ve diğerleri izole anti-HBc IgG pozitif saptanan 136 kişinin HBV-DNA sonuçlarının negatif olduğunu bildirmişlerdir [243]. Bizim çalışmamızda da izole anti-HBc pozitif tespit edilen örneklerin hiçbirinde HBV-DNA pozitifliğine rastlanmamıştır.

Genelde anti-HBs pozitifliği doğal enfeksiyon sonucu veya başarılı aşılama ile elde edilmektedir ve HBV enfeksiyonuna karşı bağışıklık olarak yorumlanmaktadır [88]. Dünya Sağlık Örgütü'nün tavsiyelerine göre, ≥ 10 mIU/mL'lik anti-HBs konsantrasyonunun HBV enfeksiyonuna karşı koruyucu olduğu düşünülmektedir [248]. Çalışmamızda anti-HBs sonuç değerleri $\geq 10,00$ mIU/mL olan numuneler reaktif ve sonuç değerleri $\leq 10,00$ mIU/mL olan numuneler nonreaktif olarak kabul edilmiştir. Bulgularımız genel popülasyonun %12,1'i doğal enfeksiyona maruz kaldığını, %22,2'si ise aşılama sonucu bağışıklık kazandığını göstermektedir.

Kan dolaşımındaki viral yük virüs replikasyonunun önemli bir göstergesidir [249]. Serumda HBsAg'nin 6 aydan fazla pozitif olması, düşük seviyelerde HBV DNA ($\leq 2,000$ IU/mL), HBeAg negatif, anti-HBe pozitif, sürekli normal AL/AST seviyeleri, hafif fibroz ve karaciğer biyopsisinde minimal hasar ya da hiç hasar olmayan hastalar inaktif HBsAg taşıyıcıları (HBeAg negatif kronik HBV enfeksiyonu) olarak tanımlanmaktadır [102]. İnaktif taşıyıcılar, kronik HBV ile enfekte hastalarda en büyük grubu oluşturur. Dünyada yaklaşık 300 milyon kişi inaktif taşıyıcılardır [250]. Çalışmamızda HBsAg'i pozitif olarak bulunan 32 hastanın birinde (%3,1) HBeAg negatif kronik HBV enfeksiyonu olduğu bilinmektedir.

Taşıyıcılarda bulaştırıcılığın düzeyini saptamada klasik belirleyici olan HBeAg ve anti-HBe değerleri çalışmada araştırılmış, bu değerler, HBsAg pozitiflerin tümünde HBeAg negatif ve %3,1 anti-HBe pozitifliği şeklinde saptanmıştır. Anti-HBe'nin düşük oranda bulunması bölgemizde taşıyıcıların bulaştırıcılığının yüksek düzeylerde olduğunu göstermektedir.

Hepatit B virüsünün yüzey antijeni ve anti-HBs'nin birlikte pozitifliğine, S gen bölgesinde ortaya çıkan ve nötralizan antikorların hedefi olan 'a' determinantının yapısını değiştirerek majör antijenik farklılıklara neden olan immün kaçış (escape) mutasyonları yol açabilmektedir. Bu durum HBsAg pozitifliği bilinmeden aşı yapılanlarda ve poliklonal hepatit B immünglobulini (HBIG) ile profilaksi uygulanan bazı olgularda görülebilmektedir [251, 252]. Ayrıca KHB'li hastalarda HBsAg ve anti-HBs birlikte pozitifliği, farklı HBsAg subtipleriyle karşılaşma, gizli hepatit B enfeksiyonunda HBV reaktivasyonu, anti-HBs'nin immün baskısı ile HBV kaçak mutantların seçilmesi ve yanlış anti-HBs pozitifliği gibi durumlarda tespit edilebilmektedir [252, 253]. Yapılan çalışmalarda HBsAg ile anti-HBs birlikte pozitifliği %3,6 ile %30 arasında değişen oranlarda bildirilmiştir [251, 252, 254, 255]. Bizim çalışmamızda hastaların %0,1'inde (1/811) HBsAg ve anti-HBs bir arada saptanmıştır. Bu hastalarda HBV DNA negatif bulunmuştur.

Genel olarak, çalışma popülasyonunun 389 (%44,1) örneği, çalışılan tüm HBV belirteçleri için negatif saptanmış olup, duyarlı popülasyon olarak değerlendirilmiştir. Duyarlı popülasyonun, özellikle yüksek risk gruplarının hepatit B enfeksiyonuna karşı aşılınması önerilmektedir. Böylece hem HBV, hem HDV açısından korunmuş oluyorlar.

Dünya Sağlık Örgütü; dünya nüfusunun yaklaşık %1'inin kronik HCV taşıyıcısı olduğunu bildirmektedir. Akut HCV enfeksiyonları %80 gibi yüksek kronikleşme eğilimindedir. Bu nedenle hepatit C, dünyada önemli bir halk sağlığı sorunu olmaya devam etmektedir [3].

Gower ve diğerlerinin, anti-HCV prevalansı ve genotip dağılımını belirlemek için yaptıkları kapsamlı literatur araştırmasında, dünyadaki anti-HCV prevalansı %1,6 (%1,3-2,1), bu oran Kazakistan için %3,3 olarak tahmin edilmiştir [151].

Yakın zamanda yapılan, Orta Asya ülkelerini kapsayan bir meta-analiz çalışmasında, Kazakistan genelinde HCV prevalansı genel popülasyonda %0,7-5,1 arasında değiştiğini, ortalama %0,9; orta riskli gruplar arasında ise %2-50, ortalama %29 olduğunu ortaya koymuşlardır [146].

Çalışmamızda anti-HCV seropozitiflik oranı %3 olarak belirlenmiştir. Sonuçlarımız Almatı genel nüfusünde 2005 yılında yapılan bir araştırmada tespit edilen % 3,2'lik [12] ve 2017 yılında yapılan diğer bir çalışmada bildirilen %3,3'lük anti-HCV prevalansı ile uyumlu bulunmuştur [16].

Omarova ve diğerleri yaptıkları çalışmada, sağlıklı bireyler arasında anti-HCV seropozitifliğini ilçelere göre %3,4-6,6 (Almalı, Jetisu, Turkisip ilçeleri) olarak tespit etmişlerdir [256].

Kazakistan Cumhuriyeti'nde 2008-2015 yılında 12 hastalığı kapsayan ulusal bir tarama programı gerçekleştirilmiştir. Hepatit C taraması, bu programın bir parçası olarak 2011-2015 yılları kapsamıştır ve 2013 yılında taranan 154 019 kişiden 1288'ine HCV (%1,6) bulaşmıştır [257].

Daha sonraki yıllarda Nersesov ve diğerlerinin yaptığı çalışmalar Güney Kazakistan bölgesinde %4,6 [14], Berkinbayev ve diğerleri Pavlodar bölgesinde %6,1 [17], Aktobe bölgesinde ise %6 oranında hepatit C epidemiyolojisinin yüksek serolojik prevalansını göstermişlerdir [15].

Hepatit delta virüsü tüm dünyada görülebilir ve yaklaşık 62-72 milyon insanın HDV ile enfekte olduğu tahmin edilmektedir [194]. Delta virüs enfeksiyonunun epidemiyolojisi kısmen HBV epidemiyolojisine benzemekle birlikte bazı bölgelerde oldukça farklı bir seyir gösterebilmektedir. Dünyada HDV epidemiyolojisini gösteren haritaya göre Kazakistan orta endemik bölgeler arasında yer almaktadır (HBsAg taşıyıcıların %10-19'ı, kronik hepatit B'lilerin %30-60'ı) [9, 199].

Bulgularımız 32 HBsAg'i pozitif bireylerde %12,5 oranında anti-HDV pozitif olduğunu göstermektedir. Bu oran, Güney Kazakistan bölgesinde gözlenen %1,6'lık [14], Aktobe bölgesinde bilinen %4'lük [15], Almaty bölgesinde saptanan %6'lık anti-HDV antikorlarının prevalansından daha yüksektir (HBsAg pozitiflerde) [16].

Berkinbayev ve diğerlerinin Pavlodar bölgesinde yaptıkları çalışmada HBsAg'i pozitif 71 hastanın 11'inde (%15,5) anti-HDV pozitifliği saptanmıştır [17].

Kazakistan'da 297 karaciğer sirozu olan hastalar üzerinde yapılan araştırmada vakaların %30'unda HDV etiyolojisi saptandığı rapor edilmiştir [206].

En önemlisi, sonuçlarımız HDV açısından orta endemik olan diğer ülkelerden bildirilen tahminlerle uyumludur. Nijeriya'da anti-HDV, HBsAg pozitif 96 hastanın %12,5'inde [258], Tacikistan'da HBsAg sirozu ve hepatosellüler karsinomda % 15'lik bir anti-HD oranı [259], Mısır'da HbsAg pozitif 216 hastanın 32'sinde (%14,8) anti-HDV bildirilmiştir [260].

Genel olarak baktığımızda, viral hepatitlerin görülme sıklığı bölgelere, incelenen kişilerin yaş, meslek grupları ve sosyoekonomik durumlarına göre değişmektedir. Çizelge 5.1'de Kazakistan ve Türkiye'deki hepatit B, C ve D virüslerinin prevalansı karşılaştırılmıştır.

Çizelge 5.1. Hepatit B, C ve D virüslerinin Kazakistan, Türkiye ve çalışmamızdaki prevalansı

Serolojik belirteçler	Kazakistan	Bu çalışmada	Türkiye
HBsAg	%1,5 – 6,8	%3,6	%4
Anti-HBs	-	%47,6	%32,0
Anti-HBc	%30	%33,4	%30,6
Anti-HCV	%0,7 – 6,6	%3	%0,4-1,5
Anti-HDV	%1,6-15,5	%12,5	Ortalama %20

Araştırmaya alınan katılımcıların çocuk yaş grubunda (5-18) HBsAg pozitifliği saptanmamıştır. Kazakistan'da 1998 yıldan itibaren hepatit B aşısının rutin aşı takvimine girmiş olması bu durumu izah edebilmektedir [112]. Diğer yaş gruplarında HBsAg; 19-32 yaş %2,2, 33-46 yaş %8,2, 47-60 yaş %5,1, 61-75 yaş %4,2 olarak tespit edilmiştir. Anti-HBc ve anti-HBs prevalansı yaş grupları arasında anlamlı bir farklılık göstermekte olup, pozitiflik oranları yaşla birlikte artmaktadır. Hepatit C hastalarının ise, 5-18 yaş %1,3, 33-46 yaş %3,8, 47-60 yaş %9,1, 61-75 yaş %2,8 olarak bulunmuştur. Anti-HCV 19-32 yaş grubunda negatif saptanmıştır. Anti-HDV

ise 33-46 yaş grubuna göre 19-32 yaş grubunda daha yüksek olmakla birlikte, diğer yaş gruplarında negatif bulunmuştur.

Nurgaliyeva ve diğerlerinin Almatı'da yaptıkları bir çalışmada HBsAg dağılımını, 10-29 yaş grubunda %2,5, 30-49 yaş grubunda %6,3, 50 yaş ve üzerinde %1,7 olarak tespit etmişlerdir. Anti-HBc prevalansı yaş grupları yükseldikçe artış gösterdiğini belirtmişlerdir. Anti-HCV pozitifliğini >50 yaş grubunda yüksek (%5,2), 30-49 yaş grubunda (%0,9) düşük olduğunu bildirmişlerdir [12].

Nersesov ve diğerlerinin Güney Kazakistan'da yaptıkları bir çalışmada ise HBsAg ve Anti-HCV oranı ile yaş arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. HBsAg pozitifliğini en düşük (%2,3) 40-49 yaş grubunda, en yüksek (%4,4) 50-59 yaş grubunda, diğer 18-24, 25-39, 60-69 yaş gruplarında ise yaklaşık %3 oranında tespit etmişlerdir. Anti-HCV pozitifliğini en düşük (%3,1) 60-69 yaş grubunda, en yüksek (%5,3) 40-49 yaş gruplarında bulmuşlardır [14].

Bizim çalışmamızda hepatit belirteçlerinin pozitifliği genellikle yaş grupları yükseldikçe artış göstermektedir. Bu durum muhtemelen, yaşın ilerlemesi ile kişilerin cerrahi operasyon geçirme, hastaneye yatma, diş çektirme, doğum, cinsel ilişki gibi hepatit açısından riskli davranışlarının sayısı ile kan ve kan ürünleriyle karşılaşma olasılıklarının artmasıyla olabilir [261].

Çalışmamızın moleküler verileri, Türkistan bölgesinde genotip D'nin (%100) HBsAg pozitif olan Kazak hastalarında bulunan tek genotip olduğunu göstermektedir. HBV alt genotip çeşitliliğine bakıldığında D genotipi için D1'in (%84,2) baskın olduğu, ancak D2 (%10,5) ve D3 (%5,3) alt genotiplerinin de bulunduğu anlaşılmaktadır.

Günümüzde HBV'nin 10 genotipi (A'dan J'ye kadar) tanımlanmıştır [262]. Kanıtlar Orta Asya ülkelerinde genotip D'nin (%88'e kadar) dominant HBV enfeksiyonu olduğunu bildirmektedir [263]. Elde ettiğimiz verilerde Türkistan bölgesinde genotip D'nin baskın oluşu, Orta Asya ülkeleri ile uyumlu görülmekte olup, filogenetik olarak daha homolojik bir dağılım göstermektedir.

Ayrıca, HBV'nin A-D, F ve I genotipleri en az 48 alt genotipe ayrılmıştır. Genotip D için D1 ila D12 alt genotipleri bugüne kadar bildirilmiştir ve D1, D2 ve D3 gibi alt genotipler dünya çapında yaygındır [262, 264].

Eski Sovyetler Birliği (SSBC) topraklarının çoğunda ve Baltık bölgesi ülkelerinde HBV alt genotip D2'nin hakim olduğu, A2 ve D3 alt genotiplerinin de dağıldığı, Orta Asya ülkeleri için HBV alt genotiplerinin dağılımı D1'e doğru kaydığı görülmektedir [265]. Özbekistan ve Kırgızistan gibi komşu ülkelerde HBV alt genotip D1 sırasıyla %84,38 ve %73,34 oranlarında baskın olarak saptanmakta, alt genotip D2 (%3,12 ve %3,33) ve D3 (%12,5 ve %23,33) bunu takip etmektedir [266, 267]. Bulgularımıza göre bölgemizdeki HBV alt genotip dağılımı komşu ülkeler ile benzerlik göstermektedir.

Kazakistan'da HBV'nin moleküler epidemiyolojisi ile ilgili yeterli düzeyde bilgi mevcut değildir. Ostankova ve diğerlerinin Nursultan şehrinde kan donörlerinde yaptığı bir çalışmada D1-%46,8, D2-%17,05, D3-%31,9, A2-%4,25 olarak bulunmuştur [232]. Aynı araştırmacıların yaptığı diğer bir çalışmada D1-85,2%, D2-%3,7, D3-%7,4, A1-%3,7 olduğunu ortaya koymuşlardır [268].

Shevcov ve diğerleri 106 hepatit B hastasında %92,5 oranında D genotip (D1-%74,5; D2-%5,1; D3-%20,4), A2-%4,7, C2-%2,8 olarak bulmuşlardır [269].

Yukarıda bahsedilen çalışmalara göre Kazakistan'da genotip D'nin baskın olduğu, ancak ülkenin bazı bölgelerinde genotip A ve C'nin de dağıldığı anlaşılmaktadır. Bulgularımız Kazakistan'daki diğer çalışmalarla uyumlu olarak, HBV alt genotipi açısından D1'in daha sık rastlandığını doğrulamaktadır.

Kazakistan'da hepatit B virüsü üzerinde yapılan moleküler çalışmalarda HBsAg'nin serotipleri bakılmamıştır. Bizim çalışmamızda hepsi genotip D olarak saptanan on dokuz HBV örneğinin, on beşi ayw2, ikisi ayw3 ve diğer kalan iki örnek te ayw4 HBsAg serotipleri olarak tespit edilmiştir. Verilerimiz ayw2'nin bölgemizdeki baskın HBsAg serotipi olduğunu göstermektedir.

Genotip D'nin dominant olarak dağıldığı ülkelere ayw2 baskın HBsAg serotipi olduğunu bildiren çalışmalar vardır [270, 271]. Bizim çalışmamızda bu sonuçlarla benzerlik göstermektedir.

Hepatit C, global olarak önemli morbidite ve mortaliteye neden olan en yaygın kan kaynaklı hastalıklardan biridir [272]. Mevcut enfeksiyonu tanımlamak için doğru

testler önemlidir [176]. Hepatit C enfeksiyonunda ilk tarama için HCV antikor (Ab) testi kullanılır. HCV Ab varlığı, enfeksiyonun akut, kronik veya çözülmüş olup olmadığını göstermez. Pozitif bir antikor test sonucu vireminin var olduğunu doğrulamak için bir HCV RNA testi ile takip edilmelidir [174]. HCV RNA'nın tespiti için nükleik asit testi (NAT) oldukça hassas ve aktif HCV enfeksiyonlarının tespisi için altın standart olmaya devam etmektedir [273].

Akkuzu ve diğerleri, anti-HCV saptanan 381 örneğin 238'inde (% 62,4) HCV RNA pozitif ve 143'ünde (% 37,5) HCV RNA negatif olduğunu göstermişlerdir [274]. Fidan ve diğerleri seropozitif olguların %37'sinde [275], Kirişçi ve diğerleri ise %38,2'sinde viremi saptamışlardır [276]. Reddy ve diğerleri 115 anti-HCV pozitif serumun %60,8'inde RT-PCR ile HCV RNA'nın pozitif olduğunu bulmuşlardır [272].

Bizim çalışmada ise anti-HCV pozitif 26 hastanın 10'unda (%38,5) pozitif ve 16'sında (%61,5) HCV RNA negatif olarak belirlenmiştir. Anti-HCV pozitif, HCV RNA'nın negatif olduğu olgularda aktif HCV enfeksiyonu yok, hasta iyileşmiş veya intermittant viremi olasılığı düşünülmelidir.

Günümüzde HCV'nin 8 genotipi, 90'dan fazla alt tipi bulunmaktadır ve dünya genelinde genotip dağılımlarında farklılıklar görülebilmektedir [150]. Genotip 1, dünya çapında en yaygın olanıdır (%46) ve bunu genotip 3 (%22) takip etmektedir [151, 152]. Genotip 2, 4 ve 6 vakaların yaklaşık %23'ünden sorumluyken, genotip 5, 7 ve 8 %1'in altındadır [153, 155]. Genotip 1b tüm HCV enfeksiyonlarının en az %22'sinden sorumlu olduğu bilinmektedir [151].

Yapılan çalışmalarda genellikle 1b ve 3a'nın Kazakistan'da dolaşan baskın HCV genotipleri olduğu rapor edilmiştir. Nersesov ve diğerlerini yaptıkları çalışmada, HCV-1b %59 oranda predominant genotip olarak saptanmıştır [158].

Shopayeva'nın Kazakistan'da yeni teşhis edilen akciğer tüberkülozu olan hastalarda yaptığı çalışmada, 3a (%44,8) ve 1b (%36,2) baskın HCV genotipleri olarak tespit edilmiştir. Geriye kalan hastalarda %19 oranında, genotip 2'nin yanı sıra 1b ve 3a genotipleri ile kombinasyonu bulunmuştur [156].

Omarova ve diğerleri bazı bulaşıcı hastalıkları olmayan hasta gruplarında yaptıkları çalışmada en yaygın alt genotipler 1b (%33-58) ve 3a (%25-42) olarak bulmuşlardır [256].

Sarsekeyeva ve diğerleri farklı etnik gruplarda HIV/HCV koenfeksiyonu olan hastalarda genotip 1, 2 ve 3 sırasıyla %42,9, %6,1, %51 olarak saptamıştır [157].

Oradova ve diğerleri Almatı şehrinde Hepatoloji Merkezine başvuran, HCV RNA'sı pozitif olan 50 hastada HCV genotip yaygınlığını araştırmışlardır. Çalışma sonucunda, HCV-1 %58, HCV-2 %14, HCV-3 ise %28 olarak tespit edilmiştir [277]. Aynı araştırmacıların diğer bir çalışmalarında, genotip 1, 2 ve 3 sırasıyla %50, %25, %25 olarak bulunmuştur [278].

Bu araştırmada ise; anti-HCV ve HCV RNA'sı pozitif 10 hastanın, 6'sında (%60) genotip 1b, 3'ünde (%30) genotip 3a, sadece 1 hastada (%10) ise genotip 2c saptanmıştır. Bulgularımız Türkistan bölgesinde 1b ve 3a'nın baskın HCV genotipi olduğunu göstermektedir. Kazakistan'daki diğer çalışmalar ile karşılaştırıldığında uyumlu bulunmuştur.

Viral yük, genotip ve spesifik viral mutasyonlar dahil olmak üzere birçok viral faktör hastalığın seyri ve tedaviye yanıtla ilişkili olduğu bildirilmiştir [65]. HCV replikasyonu için gerekli yapısal olmayan proteinlerden NS3, NS5A ve NS5B antiviral ilaçların ana hedef bölgeleridir [279].

İlaç direncinin ortaya çıkması modern tıpta en umut verici tedavi yöntemlerini sınırlayan önemli bir engeldir. Viral substratları kodlayan genlerdeki mutasyonlar moleküler değişikliklere yol açarak ilacın bağlanma kuvvetini değiştirebilmektedir [280].

Geçmişte, standart anti-HCV tedavisi pegile interferon ve ribavirin olmuştur, ancak kalıcı virolojik yanıt düşüktür. Direkt etkili antiviral (DAA)'lerin gelişmesiyle, HCV enfeksiyonu için tedaviler hızla gelişmektedir. Telaprevir ve boceprevir (N3 / 4A proteaz inhibitörleri), kronik HCV genotip 1 enfeksiyonunun tedavisi için pegile interferon-α ve ribavirin ile kombinasyon halinde kullanılacak en erken DAA'lardır [281]. İlaç direncinin oluşması için, mutasyonlar, doğal biyolojik fonksiyonları

değiştirmeden inhibitörlerin hedef bölgeye olan afinitesini azaltmalıdırlar. Substrat zarfının dışında oluşan mutasyonlar bu etkiyi daha hızlı göstermektedirler. Bu yüzden, substrat zarfına sığacak şekilde tasarlanmış ilaçların dirence daha az duyarlı olabileceği düşünülmektedir [280].

Bu çalışmada HCV NS3, NS5A ve NS5B bölgelerinde aminoasit değişimlerinin, NS5B RNA bağımlı RNA polimeraz inhibitörü sofosbuvir ve NS5A inhibitörleri velpatasvir, elbasvir, ledipasvir, daclatasvirin etkisi üzerine değişimlerini değerlendirilmiştir. Yapılan dizi analizi sonucunda genotip 1b suşlarında NS3 bölgesinde I132V, M175L; 2c suşlarında A39V, Q80G, S122G, M175L; 3a suşlarında ise M175L aminoasit değişikliği tespit edilmiştir. NS5A bölgesinde Q30R/H, H58P; NS5B'de C316N aminoasit değişikliği tanımlanmıştır. Genotip 1b suşlarında 1/6 (%16,6) hastada velpatasvir, elbasvir, ledipasvir, daclatasvire direnç ile ilişkili NS5A bölgesinde Y93C/H mutasyonu, NS5B bölgesinde L159F mutasyonu ile ilişkili sofosbuvire azalmış duyarlılık gözlenmiştir. Çalışmamız ilaç direnç mutasyon oranlarının çeşitli HCV genotiplerinde farklı olduğunu göstermiştir.

Kazakistan'da HCV NS3 ve NS5A/NS5B inhibitörleri ilaç direnci ile ilgili veri bulunmamaktadır. Bu bakımdan çalışmamız HCV ilaç direnciyle ilgili mutasyonları değerlendirme açısından Kazakistan'da ilktir.

Dünyada yapılan çalışmalara bakacak olursak, HCV tedavisi için geliştirilen NS3/4A proteaz inhibitörlerinden danoprevir ile ilgili yapılan bazı çalışmalarda NS3 bölgesindeki F43S, Q41R, S138T, R155K, A156S/V/T ve D168A/V/I/E mutasyonlarının danoprevir duyarlılığını etkilediği gösterilmiştir. Özellikle R155, A156, D168 anahtar pozisyonundaki mutasyonların inhibisyon aktivitesini 63-447 kat azalttığı tespit edilmiştir [280, 282]. Bu mutasyonların danoprevirin inhibisyon özelliğini etkileme mekanizması bilinmemektedir. Bizim çalışmamızda NS3 bölgesinde GT1b, GT2c, GT3a'ya ait I132V, M175L, A39V, Q80G, S122G mutasyonları tespit edilmiş, fakat velpatasvir, elbasvir, ledipasvir, daclatasvir, sofosbuvir direnci ile ilişkisi bulunmamıştır.

Bazı çalışmalar direnç mutasyonlarının çoğunun birincil direnç varyasyonları olarak işlev gören M28T/V, Q30H/E/R/K, L31M/V, P32L ve Y93C/H/N pozisyonlarında olduğunu açıklamıştır. Genotip 1b için, L31F/M/V, P32L ve Y93C/H/N varyantları

birincil direnç yer değişimleri olarak işlev görürken; L23F, R30Q ve P58S ikincil direnç mutasyonları olarak karşımıza çıkmaktadır [283-287]. Bizim çalışmamızda genotip 1b'de görülen Y93C/H ve Q30R/H mutasyonları bu çalışmaları desteklemektedir. Ek olarak I132V, M175L, H58P aminoasit değişimleri görülmüştür.

Suzuki ve diğerlerinin yaptıkları çalışmada M28T, Q30E/H/R ve L31M/V mutasyonları yüksek dirence sebep olmaktadır ve bu mutasyonlar daclatasvir direnciyle ilişkili NS5A bölgesindedir [288]. Çalışmamızda NS5A bölgesine ait Q30R/H, H58P, Y93C/H mutasyonları belirlenmiş olup sadece Y93C/H mutasyonu velpatasvir, elbasvir, ledipasvir ve daclatasvir direnci ile ilişkili bulunmuştur.

Sun ve diğerlerinin çalışmalarında Q30 mutasyonunun iki türü olduğunu belirtmişlerdir ve Q30L mutasyonunun Q30R'den daha yüksek oranda olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca NS5A direnç mutasyonlarının GT1a hastalarında GT1b hastalarından daha fazla görüldüğünü ifade etmişlerdir [281]. Çalışmamızda GT1a suşlarına rastlanmamıştır. GT1b suşlarında ise Q30R/H mutasyonu %83,3 oranında tespit edilmiştir.

Sun ve diğerlerinin yaptıkları çalışmada NS5A genotip 1b suşlarında tespit edilen Y93H mutasyonu, daclatasvir, ledipasvir ve samatasvire karşı yüksek seviyede direnç sağlamaktaydı. Y93N/C mutasyonu ise gözlenmemiştir. Ayrıca 1 hasta örneğinde Y93M ve Y93T mutasyonları belirlenmiştir. Ayrıca, Y93H mutasyonunun toplam frekansının % 8,65 olduğunu, bunun genotip 1b mutasyon oranının % 15,51 olduğunu ve genotip 1a ve genotip 2a'daki mutasyon oranlarının düşük olduğunu tespit etmişlerdir [281]. Çalışmamız bu verileri destekler nitelikte olup GT1b hastalardan birinde belirlenen Y93C/H mutasyonu velpatasvir, elbasvir, ledipasvir ve daclatasvire direnç sağlamıştır.

Suzuki ve diğerleri, NS5A inhibitörlerine dirence neden olan L31M/V ve Y93H mutasyonlarının, Japonya'da HCV genotip 1b ile enfekte olmuş tedavi-naif bireylerde %1,2'ye ulaştığını göstermiştir [288].

Önceki çalışmalar, doğrudan sekanslama ve derin sekanslama kullanarak NS5B bölgesinde C316N'nin yüksek prevalansını doğrulamıştır. Bu mutasyon özellikle

tedaviye yanıt vermeyen GT1b ve relaps gözlenen GT1a suşlarında tespit edilmiştir [289]. Ancak sofosbuvire duyarlılığıyla ilgili daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Sun ve diğerleri ise yaptıkları çalışmada GT1b suşların %98'inde, GT1a suşların ise %100'ünde C316N mutasyonunu tespit etmişlerdir. Çalışmamızda ise 6 GT1b suşunun 4'ünde (%66,7) C316N mutasyonu tespit edilmiştir ancak bu mutasyonun sofosbuvir duyarlılığını etkilediği tespit edilmemiştir. Bir suşa ait NS5B bölgesinde tespit edilen L159F mutasyonu ise sofosbuvire azalmış duyarlılık ile ilişkili bulunmuştur. Asya toplumları üzerindeki Los Alamos veritabanı, C316N frekansının %91,6'ya ulaştığını ve bunun global mutasyon oranından fazla olduğunu göstermiştir [290]. Bu, bir popülasyondaki mutasyon prevalansının etnisite ile yakından ilişkili olduğunu düşündürebilir. Bulgularımız bununla uyumludur.

In vitro çalışmalar S282T mutasyonunun sofosbuvir direnci ile ilişkili olduğunu göstermiştir [281]. Ayrıca M414T, NS5B nükleosid olmayan polimeraz inhibitörlerine karşı daha az duyarlılıkla ilişkili bulunmuştur [291]. Çalışmamızda bu mutasyonlarla ilgili veri elde edilmemiştir. L159F mutasyonu tespit edilen 1 suş sofosbuvire azalmış duyarlılıkla ilişkili bulunmuştur.

İlgili ilaç direnci bölgelerinin değişimi DAA'ların antiviral etkisini doğrudan azaltacaktır. Çalışmamızda farklı HCV bölgeleri ile ilgili birden fazla mutasyon tespit edilmiştir. HCV enfeksiyonlu hastalarda özellikle DAA tedavisine rağmen kalıcı virolojik yanıt elde edilememişse, antiviral tedaviye başlamadan önce direnç düzeyinin belirlenmesi oldukça önemlidir. Bu nedenle, DAA'ları terapötik olarak uygulamadan önce gen sekanslama yapılması önerilmektedir. Ayrıca, Avrupa Karaciğer Araştırmaları Derneği (The European Association for the Study of the Liver; EASL 2017), mutasyona bağlı direnci başlangıç seviyesinde değerlendirmenin tedavi rejiminin optimize edilmesine yardımcı olabileceğini vurgulamaktadır [281]. Bu nedenle, ilaç direnç bölgelerinin saptanması, bireyselleştirilmiş antiviral tedavinin optimize edilmesi için özellikle önemlidir. Kazakistan'da bu konuyla ilgili daha fazla örnekle, daha kapsamlı çalışma yapılmaya ihtiyaç vardır.

Dünyada HDV'nin 8 adet genotipi bulunmaktadır ve bu genotiplerin dağılımı farklı coğrafi bölgelerde değişkenlik göstermektedir. Genotip 1 dünyada yaygındır, Avrupa ve Akdeniz ülkelerinde, İran, Türkiye, Kuzey Amerika'da hakimdir. Asya'da

ağırlıklı olarak 2 ve 4, Amazon Havzasında 3, Japonya, Tayvan ve Çin'de genotip 4, Afrika kıtasında ise 5-8 HDV genotipleri sıklıkla bildirilmiştir [217].

Çalışmamızda genotip tayını yaptığımız HDV örneklerin tümünde genotip 1 saptanmıştır.

Kazakistan'da yapılan çalışmalarda yaygın HDV genotipinin HDV-1 olduğu bildirilmiştir. İlyasova ve diğerlerinin kronik hepatit D tanısı almış Kazak hastalarında yaptığı çalışmada HDV-1 genotipi bulunmuştur [292].

Kazakistan'ın 9 bölgesinden toplanan örneklerde HDV genotiplerinin yaygınlığı üzerine yapılan diğer bir çalışmada, vakaların %100'ünde yaygın HDV genotipinin HDV-1 olduğu rapor edilmiştir [215].

Türkiye'de yapılmış çalışmalarda %100 oranında genotip 1 saptanmıştır [293, 294]. Yurtdışında yapılan diğer çalışmalarda; Pakistan'ın Doğu ve Kuzeybatı bölgelerindeki bir araştırmaya göre genotip 1 ülkede HDV'nin tek dolaşan genotipi olduğu bildirilmiştir [295]. Dünyada delta hepatiti açısından en yüksek prevalansa sahip olan Mongoliya'da HDV izolatlarının tamamı (%100) genotip 1 olarak sınıflandırılmıştır [296, 297]. Filogenetik analizler, HDV 1 genotipinin %91'lik oran ile Vietnam'daki baskın genotip olduğunu [298], ayrıca Nijeriya için genotip 1 prevalansı %90'a ulaştığını göstermektedir [299].

HDV-1, dünyada en yaygın genotip olması sebebiyle, bölgemiz HDV genotipi açısından hem dünyadaki, hem Kazakistan'daki diğer çalışmalara uyumlu olarak bulunmuştur. Böylece, genotip 1 Türkistan bölgesinde bulunan tek HDV genotipidir.

Bu çalışmada, HBsAg'i pozitif olan 32 hastanın 4'ünde (%12,5) anti-HDV pozitif bulunmuştur. Bu hastaların %75'inde HDV RNA saptanmıştır. Bu bulgu hastaların çoğunda delta virüsü ile aktif bir enfeksiyon olduğunu göstermektedir.

Romanya'da yapılan bir çalışmada, kronik hepatit B enfeksiyonu olan 1094 hastanın 223'ünde (%20,4) anti-HDV pozitifliği bildirilmiştir. Bu hastaların %67,7'sinde HDV RNA saptanmıştır [300]. Romanya'da 2761 HBsAg pozitif hasta üzerinde yapılan diğer bir çalışmada ise, anti-HDV IgG seroprevalansı %23,1 olup, bu hastaların

%16,4'ünde hepatit D viremi tespit edilmiştir [301]. Pakistanda 63 HBsAg pozitif hamile kadının 13'ünde (%20,6) anti-HDV saptanmıştır. Hepatit delta antikorları için pozitif bulunan kadınların %30,8'inde HDV RNA bulunmuştur [302]. Türkiye, İstanbulda yapılan retrospektif bir çalışmada, 2089 HBsAg pozitif hasta anti-HDV açısından araştırılmış olup, pozitifliği %4,1 (85/2089) olarak saptanmıştır. Anti-HDV pozitif hastaların %60'ında (51/85) HDV viremi tespit edilmiştir [303]. Serumda HDV RNA, gerçek HDV prevalansını belirlemek için önemli bir parametredir. Çünkü anti-HDV, enfeksiyondan sonra uzun yıllar boyunca pozitif kalabilir veya pencere döneminde HDV enfeksiyonuna karşı antikorlar tespit edilemeyebilir [226].

Kronik hepatit D'li hastalarda, HDV RNA, anti-HDV IgM ve total anti-HDV'nin uzun süreli, bazen yaşam boyu pozitifliği devam eder. Hasta kronik hepatit D ise, tipik olarak HDV zaman içerisinde HBV'yi baskılar. Böylece bazı hastalarda kanda HDV RNA pozitif, buna karşılık HBV DNA negatif saptanır [227]. Çalışmamızda HDV RNA'sı pozitif olan 3 hastanın ikisinde aynı anda HBV DNA pozitif, bir hastada ise HBV DNA negatif bulunmuştur. Literatürlerde kronik bir delta ajanının hepatit B virüsü replikasyonunu inhibe etme kapasitesine sahip olabileceğini ve aktif viral replikasyon süresinin sona ermesine yol açabileceğini gösteren çalışmalar vardır [304, 305]

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu araştırma, Kazakistan'ın Türkistan bölgesinin genel popülasyonunda kan yoluyla bulaşan viral hepatitlerin (HBV, HCV, HDV) ilk epidemiyolojik değerlendirmelerini içermektedir. Çalışma, bölgenin yaşları 5-75 yıl arasında değişen, toplam 881 bireyin test edilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Tüm serum örnekleri serolojik ve real-time PCR yöntemleriyle değerlendirilmiştir. Ayrıca viral genotipler, alt genotipler ve HCV DAA'ya dirençli varyantların sıklığını belirlemek için Sanger dizileme yöntemi kullanılmıştır.

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar, Dünya ve Kazakistan verileri ile genellikle uyum içindedir. Bulgularımız Türkistan bölgesinin HBV, HCV ve HDV enfeksiyonları için orta endemik bölge olduğunu göstermektedir.

Genel popülasyon için HBsAg pozitifliği %3,6 (%95 CI, 2,6-5,1), anti-HBs %47,4 (%95 CI, 44,3-50,9), ve anti-HBc %33,4 (%95 CI, 30,3-36,6) olarak tespit edilmiştir.

Çalışma popülasyonunun %22,2'si aşılama sonucu, %12,1'i ise geçirilmiş doğal enfeksiyon sonucu hepatit B virüsüne karşı bağışıklık kazanmıştır.

HBsAg pozitiflerin tümünde HBeAg negatif ve %3,1 anti-HBe pozitifliği şeklinde saptanmıştır.

Genel olarak nüfusun %44,2'si (%95 CI, 40,9-47,5), çalışılan tüm HBV belirteçleri için negatif saptanmış olup, duyarlı popülasyon olarak değerlendirilmiştir. Duyarlı insanların, özellikle yüksek riskli grupların hepatit B enfeksiyonuna karşı aşılama önerilmektedir.

Anti-HCV pozitifliği genel popülasyonda %3 iken (%95 CI, 2,0-4,3), kadınlar ve erkeklerde sırasıyla %3,5 (%95 CI, 2,2-5,5) ve %2,1 (%95 CI, 1,0-4,3) olarak saptanmıştır.

Hepatit B yüzey antijeni pozitif saptananlarda anti-HDV prevalansı %12,5 (%95 CI, 4,4-28,7), kadınlarda %10 (%95 CI, 1,6-31,3), erkeklerde %16,6 (%95 CI, 3,5-46,0) olarak belirlenmiştir.

Genel olarak çalışılan tüm serolojik belirteçlerin pozitifliği açısından cinsiyetler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$)

Çalışmamızda DNA dizi analiz sistemi kullanılarak HBV, HCV ve HDV örneklerine genotiplendirme yapılmıştır.

Moleküler veriler, Türkistan bölgesinde genotip D'nin (%100) HBsAg pozitif olan Kazak hastalarında bulunan tek genotip olduğunu göstermektedir. HBV alt genotip çeşitliliğine bakıldığında D genotipi için D1'in (%84,2) baskın olduğu, ancak D2 (%10,5) ve D3 (%5,3) alt genotiplerinin de bulunduğu anlaşılmaktadır.

Hepsi genotip D olarak saptanan örneklerin on beşi ayw2 (%78,8), ikisi ayw3 (%10,6) ve kalan iki örnek ayw4 (%10,6) HBsAg serotipleri olarak tanımlanmıştır. Bulgularımız ayw2'nin Türkistan bölgesindeki baskın HBsAg serotipi olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda genotip tayını yaptığımız HDV örneklerin tümünde genotip 1 saptanmıştır.

Çalışmaya dahil edilen, anti-HCV ve HCV RNA'sı pozitif 10 hastanın, 6'sında (%60) genotip 1b, 3'nde (%30) genotip 3a, sadece 1 hastada (%10) ise genotip 2c saptanmıştır. Bulgularımız Türkistan bölgesinde 1b ve 3a'nın baskın HCV genotipi olduğunu göstermektedir. Aynı hastalarda yapılan mutasyonel analiz ve ilaç direnci araştırmalarında, 1b subtipi saptanan bir hastada velpatasvir, elbasvir, ledipasvir, daclatasvire direnç ile ilişkili NS5A bölgesinde Y93C/H mutasyonu, yine bir hastada NS5B bölgesinde L159F mutasyonu ile ilişkili sofosbuvire azalmış duyarlılık gözlenmiştir. Bu sonuçlar bize primer direnç açısından, tedavi almamış hastalarda tedavi öncesinde mutasyonlarının belirlenmesinin tedavi seçimine olumlu katkı sağlayacağını düşündürtmektedir. Ayrıca, I132V, M175L; A39V, Q80G, S122G, Q30R/H, H58P ve C316N aminoasit değişikliği tanımlanmıştır. Ancak saptanan bu aminoasit değişikliklerinin ilaç direnciyle ilgili olmadığı görülmüştür. Çalışmamız mutasyon oranlarının çeşitli HCV genotiplerinde farklı olduğunu göstermiştir. Bu alışma, HCV ilaç direnciyle ilgili mutasyonları değerlendirme açısında Kazakistan'da ilk olduğu için önemli görünmektedir.

Mevcut tezde serolojik ve moleküler yaklaşımlar kullanılarak bölgemizde görülen hepatit B, C ve D virüslerinin tespiti ile birlikte, genotipinin de belirlenmesi başarı ile gerçekleştirilmiştir.

Kazakistan'da viral hepatitler ile ilgili çalışma sayısı halen sınırlıdır. İleride bu virüslerin serolojik ve moleküler incelenmesini içeren daha geniş kapsamlı epidemiyolojik çalışma yapılması gerekmektedir.





KAYNAKLAR

1. Irmak, H., Yardım, N., Keklik, K. and Temel, F. (2018). *Türkiye Viral Hepatit Önleme ve Kontrol Programı 2018-2023*, ANKARA: TGV Ltd. Şti., 47.
2. Blum, H. E. (2016). History and global burden of viral hepatitis. *Digestive Diseases*, 34(4), 293-302.
3. İnternet: World Health Organization (2017). *Global hepatitis report 2017*: World Health Organization. Web: <https://www.who.int> 24 Eylül 2019'de alınmıştır.
4. İnternet: World Health Organization. (2017). "World Hepatitis Day 2017: Eliminate hepatitis." Web: <https://www.who.int/campaigns/hepatitis-day/2017/event/en/> 30 Eylül 2019'de alınmıştır.
5. Easterbrook, P. J., Roberts, T., Sands, A. and Peeling, R. (2017). Diagnosis of viral hepatitis. *Current Opinion in HIV and AIDS*, 12(3), 302-314.
6. World Health Organization (2017). *Regional action plan for the implementation of the global health sector strategy on viral hepatitis 2017–2021*, Cairo: World Health Organization. Regional Office for the Eastern Mediterranean, 30.
7. Wang SH., Yeh SH., Chen PJ. (2016) *Hepatocellular Carcinoma and Hepatitis C Virus*. In: Miyamura T., Lemon S., Walker C., Wakita T. Hepatitis C Virus II. Tokyo, Springer, 109-136.
8. Perez-Vargas, J., Amirache, F., Boson, B., Mialon, C., Freitas, N., Sureau, C. (2019). Enveloped viruses distinct from HBV induce dissemination of hepatitis D virus in vivo. *Nature Communications*, 10(1), 2098.
9. Rizzetto, M. (2015). Hepatitis D virus: Introduction and epidemiology. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(7), a021576.
10. Wranke, A., Pinheiro Borzacov, L. M., Parana, R., Lobato, C., Hamid, S., Ceausu, E. (2018). Clinical and virological heterogeneity of hepatitis delta in different regions world-wide: The Hepatitis Delta International Network (HDIN). *Liver International*, 38(5), 842-850.
11. Igissinov, N., Kulmirzayeva, D., Sibinga, C. T. S. and Turgambayeva, A. (2014). Epidemiological aspects of hepatitis B and C markers in blood donors in Kazakhstan; 2000-2011. *Iranian Journal of Public Health*, 43(2), 156.
12. Nurgalieva, Z. Z., Hollinger, F. B., Graham, D. Y., Zhangabylova, S. and Zhangabylov, A. (2007). Epidemiology and transmission of hepatitis B and C viruses in Kazakhstan. *World Journal of Gastroenterology*, 13(8), 1204.
13. Skorikova, S., Burkitbaev, Z., Savchuk, T. and Zhiburt, E. (2015). Prevalence and incidence of infections among blood donors in Astana. *Voprosy Virusologii*, 60(1), 34-36.

14. Nersesov, A., SF, J. G., Jumabayeva, A., Novitskaya, M. and Kyanysh, N. (2016). Prevalence of viral hepatitis among residents of South Kazakhstan region. *Medicine*, 9, 30-33.
15. Berkinbayev, S. F., Dzhunusbekova, G. A., Nersesov, A. V., Dzhumabayeva, A. E., Kaibullayeva, D. A., Raisova, A. M. (2017). Prevalence of viral hepatitis among residents of Aktobe region *Medicine*, 5, 17-21.
16. Berkinbayev, S. F., Dzhunusbekova, G. A., Nersesov, A. V., Dzhumabayeva, A. E., Kaibullayeva, D. A., Raisova, A. M. (2017). Prevalence of viral hepatitis among residents of Almaty city and Almaty region *Medicine*, 8, 41-46.
17. Berkinbayev, S. F., Dzhunusbekova, G. A., Nersesov, A. V., Dzhumabayeva, A. E., Kaibullayeva, D. A., Raisova, A. M. (2017). Prevalence of viral hepatitis among residents of Pavlodar region *Medicine*, 9, 100-104.
18. Patlak, M., Blumberg, B., Hilleman, M. and Rutter, W. (2000). The hepatitis B story. *National Academy of Sciences*, 1-8.
19. Değertekin, H. and Ak, O. (2010). Akut ve kronik HBV infeksiyonunda doğal seyir. *Güncel Gastroenteroloji*, 14(2), 54-8.
20. Block, T. M., Alter, H. J., London, W. T. and Bray, M. (2016). A historical perspective on the discovery and elucidation of the hepatitis B virus. *Antiviral Research*, 131, 109-123.
21. Altındış, M. (2015). *Hepatit B Virüs Biyolojisi. Hepatit Mikrobiyolojisi*. İnan, N. İstanbul, İstanbul Tıp Kitabevi, 1, 52-65.
22. Badur, S. (2012). *Hepatit B Aşısı. Aşı Kitabı*. Selim Badur, M. B. İstanbul, Akademi Yayınevi, 608.
23. Dane, D., Cameron, C. and Briggs, M. (1970). Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *The lancet*, 295(7649), 695-698.
24. Badur, S. (2012). *Hepatit A, B ve D virusları. Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji*. Dürdal Us, K. E. Ankara, Bilimsel Tıp Yayınevi, 296-331.
25. Dandri, M. and Petersen, J. (2020). *HBV virology. Hepatology*. Mauss, S., Berg, T., et al. Bayern, Schafkopf, 87-104.
26. İnan, N. and Tabak, F. (2015). Hepatitis B virus: Biology and life cycle. *Viral Hepatitis Journal*, 21(1), 1-7.
27. Gerlich, W. H. (2013). Medical virology of hepatitis B: how it began and where we are now. *Virology journal*, 10(1), 239.
28. Mushahwar, I. K. (2004). *Viral Hepatitis Molecular Biology Diagnosis and Control*: Gulf Professional Publishing, 31-99.
29. Tütüncü, E. (2015). *Hepatit B Virusunun Moleküler Virolojisi. Hepatit B den D ye Hep Güncel Klinik El Kitabı*. Kandemir, Ö. and Danalıoğlu, A. İstanbul, Content Ed Net Türkiye, 313.

30. Locarnini, S., McMillan, J. and Bartholomeusz, A. (2003). *The hepatitis B virus and common mutants. Seminars in Liver Disease*. New York, Thieme Medical Publishers, Inc. 23, 005-020.
31. McNaughton, A. L., D'Arienzo, V., Ansari, M. A., Lumley, S. F., Littlejohn, M., Revill, P. (2019). Insights from deep sequencing of the HBV genome—unique, tiny, and misunderstood. *Gastroenterology*, 156(2), 384-399.
32. Wong, D. J. and Locarnini, S. A. (2018). *Molecular Virology and Life Cycle. Hepatitis B Virus and Liver Disease*. Kao, J.-H. and Chen, D.-S. London, Springer, 1-23.
33. Slagle, B. L. and Bouchard, M. J. (2018). Role of HBx in hepatitis B virus persistence and its therapeutic implications. *Current opinion in virology*, 30, 32-38.
34. Fako, V. and Wang, X. (2018). *Molecular Carcinogenesis of HBV-Related HCC. Hepatitis B Virus and Liver Disease*. Kao, J.-H. and Chen, D.-S. London, Springer, 143-162.
35. Valaydon, Z. S. and Locarnini, S. A. (2017). The virological aspects of hepatitis B. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 31(3), 257-264.
36. Baumert, T. F., Köck, J. and Blum, H. E. (2005). A novel target of hepatitis B virus mutations: Splicing of surface RNA. *Hepatology*, 42(1), 21-23.
37. Al-Sadeq, D. W., Taleb, S. A., Zaied, R. E., Fahad, S. M., Smatti, M. K., Rizeq, B. R. (2019). Hepatitis B Virus molecular epidemiology, host-virus interaction, coinfection, and laboratory diagnosis in the MENA region: An update. *Pathogens*, 8(2).
38. Lamontagne, R. J., Bagga, S. and Bouchard, M. J. (2016). Hepatitis B virus molecular biology and pathogenesis. *Hepatoma Research*, 2, 163-186.
39. Morikawa, K., Suda, G. and Sakamoto, N. (2016). Viral life cycle of hepatitis B virus: Host factors and druggable targets. *Hepatology Research*, 46(9), 871-877.
40. Urban, S., Schulze, A., Dandri, M. and Petersen, J. (2010). The replication cycle of hepatitis B virus. *Journal of Hepatology*, 52(2), 282-4.
41. Jeong, J. K., Yoon, G. S. and Ryu, W. S. (2000). Evidence that the 5'-end cap structure is essential for encapsidation of hepatitis B virus pregenomic RNA. *Journal of Virology*, 74(12), 5502-8.
42. Mitra, B., Thapa, R. J., Guo, H. and Block, T. M. (2018). Host functions used by hepatitis B virus to complete its life cycle: Implications for developing host-targeting agents to treat chronic hepatitis B. *Antiviral Research*, 158, 185-198.
43. Murray, P. R., Rosenthal, K. S. and Pfaller, M. A. (2015). *Hepatitis Viruses. Medical Microbiology*. London, Elsevier, 546-560.

44. Baumert, T. F., Thimme, R. and von Weizsacker, F. (2007). Pathogenesis of hepatitis B virus infection. *World Journal of Gastroenterology*, 13(1), 82-90.
45. İnternet: Mark A. Feitelson. (2018). "Pathogenesis of Hepatitis B Virus Associated Chronic Liver Disease." Web: <https://www.intechopen.com/books/liver-cancer/pathogenesis-of-hepatitis-b-virus-associated-chronic-liver-disease> 02 Ekim 2019'da alınmıştır.
46. Kim, J. H., Park, Y. K., Park, E.-S. and Kim, K.-H. (2014). Molecular diagnosis and treatment of drug-resistant hepatitis B virus. *World Journal of Gastroenterology*, 20(19), 5708.
47. Lin, C.-L. and Kao, J.-H. (2015). Hepatitis B virus genotypes and variants. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(5), a021436.
48. Akarca, U. S. (2010). Hepatit B virusu yapısı ve moleküler biyolojisi, doğal mutant ve varyantları. *Türkiye Klinikleri Gastroenterohepatology-Special Topics*, 3(1), 16-23.
49. Gao, S., Duan, Z.-P. and Coffin, C. S. (2015). Clinical relevance of hepatitis B virus variants. *World Journal of Hepatology*, 7(8), 1086-1096.
50. Kırdar, S., Yaşa, M., Sayan, M. and Aydın, N. (2019). HBV pol/S gene mutations in chronic hepatitis B patients receiving nucleoside/nucleotide analogues treatment. *Mikrobiyoloji Bulteni*, 53(2), 144-155.
51. Kay, A. and Zoulim, F. (2007). Hepatitis B virus genetic variability and evolution. *Virus Research*, 127(2), 164-176.
52. Lai, C. L., Leung, N., Teo, E. K., Tong, M., Wong, F., Hann, H. W. (2005). A 1-year trial of telbivudine, lamivudine, and the combination in patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *Gastroenterology*, 129(2), 528-36.
53. Sheldon, J., Camino, N., Rodes, B., Bartholomeusz, A., Kuiper, M., Tacke, F. (2005). Selection of hepatitis B virus polymerase mutations in HIV-coinfected patients treated with tenofovir. *Antiviral Therapy*, 10(6), 727-34.
54. Locarnini, S. (2017). *The hepatitis B virus and antiviral drug resistance: causes, patterns, and mechanisms. Antimicrobial Drug Resistance*. Douglas, L. M., Jack, D. S., Marc, O., Keith, S. K., Dror, M., Springer, 565-577.
55. Zhong, Y. W., Di, F. L., Liu, C., Zhang, X. C., Bi, J. F., Li, Y. L. (2016). Hepatitis B virus basal core promoter/precore mutants and association with liver cirrhosis in children with chronic hepatitis B virus infection. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(4), 379 e1-379 e8.
56. Kim, H., Lee, S. A. and Kim, B. J. (2016). X region mutations of hepatitis B virus related to clinical severity. *World Journal of Gastroenterology*, 22(24), 5467-78.
57. Ali, A., Abdel-Hafiz, H., Suhail, M., Al-Mars, A., Zakaria, M. K., Fatima, K. (2014). Hepatitis B virus, HBx mutants and their role in hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, 20(30), 10238-48.

58. Ceren, S. and Karataylı, Ö. (2014). *Hepatit B, Hepatit C ve Delta Virüslerinin Klinik Uygulama Bakımından Moleküler Biyolojisi*, Ankara: TGV Sağlık Malz. Ltd. Şti., 328.
59. An, P., Xu, J., Yu, Y. and Winkler, C. A. (2018). Host and viral genetic variation in HBV-related hepatocellular carcinoma. *Frontiers in Genetics*, 9, 261.
60. Shi, Y., Wang, J., Wang, Y., Wang, A., Guo, H., Wei, F. (2016). A novel mutant 10Ala/Arg together with mutant 144Ser/Arg of hepatitis B virus X protein involved in hepatitis B virus-related hepatocarcinogenesis in HepG2 cell lines. *Cancer Letters*, 371(2), 285-91.
61. Yamazhan, T. (2015). *HBV Enfeksiyonunun Epidemiyolojisi. Hepatit B den D ye Hep Güncel Klinik El Kitabı*. Kandemir, Ö. and Danalıoğlu, A. İstanbul, Content Ed Net Türkiye, 313.
62. Yim, S. Y. and Kim, J. H. (2019). The epidemiology of hepatitis B virus infection in Korea. *The Korean Journal of Internal Medicine*, 34(5), 945–953.
63. Azanova, E. V. and Vedeneeva, E. V. (2015). *Metody bor'by s gepatitom B v Kazakhstane. Bulletin of Medical Internet Conferences*, Medconfer. **5**, 1628.
64. Lin, C. L. and Kao, J. H. (2017). Natural history of acute and chronic hepatitis B: The role of HBV genotypes and mutants. *Best Practice & Research: Clinical Gastroenterology*, 31(3), 249-255.
65. Sunbul, M. (2014). Hepatitis B virus genotypes: Global distribution and clinical importance. *World Journal of Gastroenterology*, 20(18), 5427-34.
66. Pourkarim, M. R., Amini-Bavil-Olyaei, S., Kurbanov, F., Van Ranst, M. and Tacke, F. (2014). Molecular identification of hepatitis B virus genotypes/subgenotypes: revised classification hurdles and updated resolutions. *World Journal of Gastroenterology*, 20(23), 7152-68.
67. Arikan, A. and Sanlıdag, T. (2016). Hepatit B virusunun moleküler epidemiyolojisi. *Klinik Dergisi*, 29(2), 56.
68. Yamazhan, T. (2015). *HBV Enfeksiyonunun Bulaşma yolları. Hepatit B den D ye Hep Güncel Klinik El Kitabı*. Özlem Kandemir, A. D. İstanbul, Content Ed Net Türkiye, 313.
69. Tran, T. T. (2016). Hepatitis B in pregnancy. *Clinical Infectious Diseases*, 62 Suppl 4, S314-7.
70. Cheung, K. W., Seto, M. T. Y. and Lao, T. T. (2019). Prevention of perinatal hepatitis B virus transmission. *Archives Gynecology Obstetrics*, 300(2), 251-259.
71. Nejo, Y., Faneye, A. O., Olusola, B., Bakarey, S., Olayinka, A., Motayo, B. (2018). Hepatitis B virus infection among sexually active individuals in Nigeria: A cross-sectional study. *The Pan African Medical Journal*, 30, 155.

72. van Bremen, K., Boesecke, C. and Wasmuth, J.-C. (2020). *Hepatitis B. Hepatology*. Mauss, S., Berg, T., et al. Bayern, Schafkopf, 37-50.
73. Wasley, A., Grytdal, S. and Gallagher, K. (2008). Surveillance for acute viral hepatitis--United States, 2006. *MMWR Surveill Summ*, 57(2), 1-24.
74. des Konsiliarlabors, B. (2019). *Epidemiologisches Bulletin*. *Epidemiologisches Bulletin*, 18(29), 261-270.
75. İnternet: Hepatitis B Foundation. (2020). "Acute Hepatitis B Infection." Web: <https://www.hepb.org/what-is-hepatitis-b/what-is-hepb/acute-vs-chronic/> .06 Ekim 2019'da alınmıştır.
76. Shiffman, M. L. (2010). Management of acute hepatitis B. *Clinical Liver Disease*, 14(1), 75-91.
77. Bennett, J. E., Dolin, R. and Blaser, M. J. (2014). *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*, Philadelphia: Elsevier Health Sciences.
78. Afyon, M. and Artuk, C. (2016). Hepatit B virüs enfeksiyonunda atipik serolojik profiller. *TAF Preventive Medicine Bulletin*, 15(3).
79. Yuen, M. F., Chen, D. S., Dusheiko, G. M., Janssen, H. L. A., Lau, D. T. Y., Locarnini, S. A. (2018). Hepatitis B virus infection. *Nature Reviews Disease Primers*, 4, 18035.
80. Liver, E. A. F. T. S. O. T. (2017). EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *Journal of hepatology*, 67(2), 370-398.
81. Lok, A. S., Zoulim, F., Dusheiko, G. and Ghany, M. G. (2017). Hepatitis B cure: from discovery to regulatory approval. *Journal of Hepatology*, 67(4), 847-861.
82. Yamazhan, T. (2015). *HBV Enfeksiyonunda Klinik Tablolar. Hepatit B den D ye Hep Güncel Klinik El Kitabı*. Özlem Kandemir, A. D. İstanbul, Content Ed Net Türkiye, 313.
83. Davitkov, P. and Falck-Ytter, Y. (2018). *Reactivation of Hepatitis B* Berlin: Springer, 279-289.
84. Mühlbacher, A., Weber, B., Bürgisser, P., Eiras, A., Cabrera, J., Louisiriotchanakul, S. (2008). Multicenter study of a new fully automated HBsAg screening assay with enhanced sensitivity for the detection of HBV mutants. *Medical Microbiology and Immunology*, 197(1), 55-64.
85. Alawi, F. B., Robertson, P. W., LePage, A. K., Jayamaha, J., Baleriola, C. and Rawlinson, W. D. (2013). The reliability of HBV core antibody in serological screening for hepatitis B virus. *Pathology*, 45(5), 501-505.
86. Maity, S., Nandi, S., Biswas, S., Sadhukhan, S. K. and Saha, M. K. (2012). Performance and diagnostic usefulness of commercially available enzyme linked immunosorbent assay and rapid kits for detection of HIV, HBV and HCV in India. *Virology journal*, 9(1), 290.

87. Song, J. E. and Kim, D. Y. (2016). Diagnosis of hepatitis B. *Annals of Translational Medicine*, 4(18), 338.
88. Us, D. (2016). *Viral Enfeksiyonların Serolojik Tanısı. Temel İmmunoloji ve Seroloji*. US, D. Ankara, Hipokrat kitabevi, 367.
89. Cohen, S. M. and Davitkov, P. (2018). *Liver Disease: A Clinical Casebook*, Berlin: Springer, 279-289.
90. Guirgis, B. S., Abbas, R. O. and Azzazy, H. M. (2010). Hepatitis B virus genotyping: current methods and clinical implications. *International Journal of Infectious Diseases*, 14(11), e941-53.
91. Liu, W. C., Mizokami, M., Buti, M., Lindh, M., Young, K. C., Sun, K. T. (2006). Simultaneous quantification and genotyping of hepatitis B virus for genotypes A to G by real-time PCR and two-step melting curve analysis. *J Clin Microbiol*, 44(12), 4491-7.
92. Dal, T. (2015). *Viral Hepatitlerin Yönetiminde İleri Moleküler Teknikler. Hepatit Mikrobiyolojisi*. Mustafa Altındış, F. T. İstanbul, İstanbul Tıp Kitabevi, 358.
93. Naito, H., Hayashi, S. and Abe, K. (2001). Rapid and specific genotyping system for hepatitis B virus corresponding to six major genotypes by PCR using type-specific primers. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(1), 362-364.
94. Song, Y., Dai, E., Wang, J., Liu, H., Zhai, J., Chen, C. (2006). Genotyping of hepatitis B virus (HBV) by oligonucleotides microarray. *Molecular and Cellular Probes*, 20(2), 121-127.
95. Tang, X. R., Zhang, J. S., Zhao, H., Gong, Y. H., Wang, Y. Z. and Zhao, J. L. (2007). Detection of hepatitis B virus genotypes using oligonucleotide chip among hepatitis B virus carriers in Eastern China. *World Journal of Gastroenterology*, 13(13), 1975-9.
96. Köse, Ş. and Dal, T. (2018). *Laboratory Diagnosis of HBV. Viral Hepatitis: Chronic Hepatitis B*. Ozaras, R. and Tahan, V. Berlin, Springer, 51-64.
97. Ahn, J. C. and Ahn, J. (2018). Hepatitis B: Standard and novel treatment options. *Clinical Liver Disease*, 12(1), 19-23.
98. Vlachogiannakos, J. and Papatheodoridis, G. V. (2018). Hepatitis B: WHO and when to treat? *Liver International*, 38, 71-78.
99. Lee, H. M. and Banini, B. A. (2019). Updates on chronic HBV: Current challenges and future goals. *Current Treatment Options in Gastroenterology*, 17(2), 271-291.
100. Viganò, M., Grossi, G., Loglio, A. and Lampertico, P. (2018). Treatment of hepatitis B: Is there still a role for interferon? *Liver International*, 38, 79-83.
101. Önder, F. O. (2014). *Kronik Hepatit B Tedavisinin Bugünü ve Yarını*, Ankara: TGV Sağlık Malz. Ltd. Şti., 328.

102. Türk Karaciğer Araştırmaları Derneği and Viral Hepatitle Savaşım Derneği (2018). *Türkiye Viral Hepatitler Tanı ve Tedavi Kılavuzu 2017*, Ankara: TGV Ltd. Şti., 47.
103. Florian van Bömmel, Johannes Wiegand and Berg, T. (2020). *Treatment of hepatitis B infections*. *Hepatology*. Mauss, S., Berg, T., et al. Bayern, Schafkopf, 165-200.
104. European Association for The Study of the Liver (2017). Clinical practice guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *Journal of Hepatology*, 67(2), 370-398.
105. Zeng, J., Zheng, C. and Li, H. (2019). Effectiveness of tenofovir or telbivudine in preventing HBV vertical transmission for pregnancy. *Medicine*, 98(14).
106. Terrault, N. A., Lok, A. S., McMahon, B. J., Chang, K. M., Hwang, J. P., Jonas, M. M. (2018). Update on prevention, diagnosis, and treatment of chronic hepatitis B: AASLD 2018 hepatitis B guidance. *Hepatology*, 67(4), 1560-1599.
107. Rajbhandari, R. and Chung, R. T. (2016). Treatment of hepatitis B: A concise review. *Clinical and Translational Gastroenterology*, 7(9), e190.
108. İnan, D. (2015). *Hepatit B Enfeksiyonunda Korunma: Aşı ve profilaksi. Hepatit B den D ye Hep Güncel Klinik El Kitabı*. Kandemir, Ö. and Danalıoğlu, A. İstanbul, Content Ed Net Türkiye, 313.
109. Nelson, N. P., Easterbrook, P. J. and McMahon, B. J. (2016). Epidemiology of hepatitis B virus infection and impact of vaccination on disease. *Clinical Liver Disease*, 20(4), 607-628.
110. Güçlü, E. (2012). Hepatit B enfeksiyonu ve korunma. *Konuralp Tıp Dergisi*, 4(2), 54-58.
111. Chang, M. S. and Nguyen, M. H. (2017). Epidemiology of hepatitis B and the role of vaccination. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 31(3), 239-247.
112. Maukayeva S.B (2009). Epidemiology and prevention of HBV infection. *West Kazakhstan Medical Journal*(3), 82-84.
113. Li, Y., Li, S., Duan, X., Yang, C., Xu, M. and Chen, L. (2018). Hepatitis C: from discovery to cure. *ISBT Science Series*, 13(3), 244-251.
114. Choo, Q. L., Kuo, G., Weiner, A. J., Overby, L. R., Bradley, D. W. and Houghton, M. (1989). Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*, 244(4902), 359-62.
115. Goering, R., Dockrell, H., Zuckerman, M. and Chiodini, P. L. (2018). *Mims' Medical Microbiology E-Book*, London: Elsevier Health Sciences, 293-304.
116. Us, D. (2016). *Viral Enfeksiyonların Serolojik Tanısı Temel İmmünoloji ve Seroloji*. Us, D. Ankara, Hipokrat Kitabevi, 241-246.
117. Manns, M. P., Buti, M., Gane, E., Pawlotsky, J.-M., Razavi, H., Terrault, N. (2017). Hepatitis C virus infection. *Nature Reviews Disease Primers*, 3(1), 1-19.

118. Kumar, A., Rajput, M. K., Paliwal, D., Yadav, A., Chhabra, R. and Singh, S. (2018). Genotyping & diagnostic methods for hepatitis C virus: A need of low-resource countries. *The Indian Journal of Medical Research*, 147(5), 445-455.
119. Tong, Y., Lavillette, D., Li, Q. and Zhong, J. (2018). Role of hepatitis C virus envelope glycoprotein E1 in virus entry and assembly. *Frontiers in Immunology*, 9, 1411.
120. Constancio, N. S., Ferraz, M. L. G., Martins, C. T. B., Kraychete, A. C., Bitencourt, P. L. and Nascimento, M. M. d. (2019). Hepatitis C in hemodialysis units: Diagnosis and therapeutic approach. *Brazilian Journal of Nephrology*, 41, 4.
121. Gawlik, K. and Gallay, P. A. (2014). HCV core protein and virus assembly: what we know without structures. *Immunologic Research*, 60(1), 1-10.
122. Öktem, M. A. (2015). *Hepatit C Virus Biyolojisi*, İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevi, 159-164.
123. Yost, S. A., Wang, Y. and Marcotrigiano, J. (2018). Hepatitis C virus envelope glycoproteins: A balancing act of order and disorder. *Frontiers in Immunology*, 9, 1917.
124. Haddad, J. G., Rouille, Y., Hanouille, X., Descamps, V., Hamze, M., Dabboussi, F. (2017). Identification of novel functions for hepatitis C virus envelope glycoprotein E1 in virus entry and assembly. *Journal of Virology*, 91(8).
125. İnternet: Hepatitis C Online. (2020). "HCV Biology." HCV Proteins, Web: <https://www.hepatitisc.uw.edu/> 24 Ekim 2019'da alınmıştır.
126. Freedman, H., Logan, M. R., Law, J. L. M. and Houghton, M. (2016). Structure and function of the hepatitis C virus envelope glycoproteins E1 and E2: antiviral and vaccine targets. *ACS Infectious Diseases*, 2(11), 749-762.
127. Drummer, H. E. (2014). Challenges to the development of vaccines to hepatitis C virus that elicit neutralizing antibodies. *Frontiers in Microbiology*, 5, 329.
128. Denolly, S., Mialon, C., Bourlet, T., Amirache, F., Penin, F., Lindenbach, B. (2017). The amino-terminus of the hepatitis C virus (HCV) p7 viroporin and its cleavage from glycoprotein E2-p7 precursor determine specific infectivity and secretion levels of HCV particle types. *PloS Pathogens*, 13(12), e1006774.
129. Suzuki, T. and Suzuki, R. (2016). *Role of nonstructural proteins in HCV replication. Hepatitis C Virus I*, Springer, 129-148.
130. Brass, V., Berke, J. M., Montserret, R., Blum, H. E., Penin, F. and Moradpour, D. (2008). Structural determinants for membrane association and dynamic organization of the hepatitis C virus NS3-4A complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(38), 14545-50.

131. Rupp, D. and Bartenschlager, R. (2014). Targets for antiviral therapy of hepatitis C. *Seminars in Liver Disease*, 34(01), 009-021.
132. Wang, Z., Chen, X., Wu, C., Xu, H. and Liu, H. (2016). Current drug discovery for anti-hepatitis C virus targeting NS4B. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 16(12), 1362-1371.
133. Altındış, M. (2015). *Hepatit C Virüs Biyolojisi. Hepatit Mikrobiyolojisi*. Öktem, M. A. İstanbul, İstanbul Tıp Kitabevi, **1**, 159-163.
134. Jassey, A., Liu, C.-H., Changou, C. A., Richardson, C. D., Hsu, H.-Y. and Lin, L.-T. (2019). Hepatitis C Virus Non-Structural Protein 5A (NS5A) Disrupts Mitochondrial Dynamics and Induces Mitophagy. *Cells*, 8(4), 290.
135. Ganta, N. M., Gedda, G., Rathnakar, B., Satyanarayana, M., Yamajala, B., Ahsan, M. J. (2019). A review on HCV inhibitors: Significance of non-structural polyproteins. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 164, 576-601.
136. Moradpour, D., Penin, F. and Rice, C. M. (2007). Replication of hepatitis C virus. *Nature reviews microbiology*, 5(6), 453-463.
137. Dustin, L. B., Bartolini, B., Capobianchi, M. R. and Pistello, M. (2016). Hepatitis C virus: Life cycle in cells, infection and host response, and analysis of molecular markers influencing the outcome of infection and response to therapy. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(10), 826-832.
138. Ashfaq, U. A., Javed, T., Rehman, S., Nawaz, Z. and Riazuddin, S. (2011). An overview of HCV molecular biology, replication and immune responses. *Virology Journal*, 8(1), 161.
139. Zajac, M., Muszalska, I., Sobczak, A., Dadej, A., Tomczak, S. and Jelińska, A. (2019). Hepatitis C - New drugs and treatment prospects. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 165, 225-249.
140. İnternet: Centers for Disease Control and Prevention. (2020). "Hepatitis C Questions and Answers for the Public." Web: <https://www.cdc.gov/hepatitis/hcv/cfaq.htm> 26 Ekim 2019'da alınmıştır.
141. Dalgard, O., Egeland, A., Ervik, R., Vilimas, K., Skaug, K. and Steen, T. W. (2009). Risk factors for hepatitis C among injecting drug users in Oslo. *Tidsskrift for den Norske laegeforening : tidsskrift for praktisk medicin, ny raekke*, 129(2), 101-104.
142. Spelman, T., Sacks-Davis, R., Dietze, P., Higgs, P. and Hellard, M. (2019). Injection drug network characteristics as a predictor of injection behaviour. *Epidemiology and Infection*, 147, e173-e173.
143. Bach, P., Walton, G., Hayashi, K., Milloy, M. J., Dong, H., Kerr, T. (2016). Benzodiazepine use and hepatitis C seroconversion in a cohort of persons who inject drugs. *American journal of public health*, 106(6), 1067-1072.
144. İnternet: World Health Organization (2018). Guidelines for the care and treatment of persons diagnosed with chronic hepatitis C virus infection. Web: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/273174/9789241550345-eng.pdf> 02 Şubat 2020'de alınmıştır.

145. Coppola, N., Alessio, L., Onorato, L., Sagnelli, C., Macera, M., Sagnelli, E. (2019). Epidemiology and management of hepatitis C virus infections in immigrant populations. *Infectious Diseases of Poverty*, 8(1), 17.
146. Botheju, W. S., Zghyer, F., Mahmud, S., Terlikbayeva, A., El-Bassel, N. and Abu-Raddad, L. J. (2019). The epidemiology of hepatitis C virus in Central Asia: Systematic review, meta-analyses, and meta-regression analyses. *Scientific Reports*, 9(1), 1-15.
147. PetruzzIELLO, A., Marigliano, S., Loquercio, G., Cozzolino, A. and CacciapuotI, C. (2016). Global epidemiology of hepatitis C virus infection: An up-date of the distribution and circulation of hepatitis C virus genotypes. *World Journal of Gastroenterology*, 22(34), 7824.
148. Begaidarova, R., Asenova, L., Alshynbekova, G., Devdariani, K., Dyusembaeva, A., Starikov, Y. (2016). Assesement of the severity of immunodeficiency in patients of asian ethnicity with HIV/HCV co-infection. *Georgian Medical News*(254), 53-56.
149. Altındış, M. (2015). *Hepatit C Genotipleme. Hepatit Mikrobiyolojisi*. Külah, C. İstanbul, İstanbul Tıp Kitabevi, **1**, 183-189.
150. İnternet: International Committee on Taxonomy of Viruses. (2019). "HCV Classification." A web resource to manage the classification and genotype and subtype assignments of hepatitis C virus. Web: https://talk.ictvonline.org/ictv_wikis/flaviviridae/w/sq_flavi/56/hcv-classification 28 Kasım 2019'da alınmıştır.
151. Gower, E., Estes, C., Blach, S., Razavi-Shearer, K. and Razavi, H. (2014). Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. *Journal of Hepatology*, 61(1 Suppl), S45-S57.
152. Hissar, S. S., Goyal, A., Kumar, M., Pandey, C., Suneetha, P. V., Sood, A. (2006). Hepatitis C virus genotype 3 predominates in North and Central India and is associated with significant histopathologic liver disease. *Journal of Medical Virology*, 78(4), 452-458.
153. Messina, J. P., Humphreys, I., Flaxman, A., Brown, A., Cooke, G. S., Pybus, O. G. (2015). Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*, 61(1), 77-87.
154. Murphy, D. G., Sablon, E., Chamberland, J., Fournier, E., Dandavino, R. and Tremblay, C. L. (2015). Hepatitis C virus genotype 7, a new genotype originating from central Africa. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(3), 967-972.
155. Borgia, S. M., Hedskog, C., Parhy, B., Hyland, R. H., Stamm, L. M., Brainard, D. M. (2018). Identification of a novel hepatitis C virus genotype from Punjab, India: expanding classification of hepatitis C virus into 8 genotypes. *The Journal of Infectious Diseases*, 218(11), 1722-1729.

156. Shopayeva, G. A. (2010). Markers of viral hepatitis B/C at patients with newly diagnosed pulmonary tuberculosis in Kazakhstan. *Health Care in Kyrgyzstan*(1), 70-71.
157. Sarsekeyeva, N., Kosherova, B. and Azizov, I. (2016). Comparative assessment of liver fibrosis in patients with HIV/chronic hepatitis C co-infection in different ethnic groups. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 10(10), 1099-1107.
158. Nersesov, A. K., Doskozhaeva, S. and Jumabayeva, A. (2014). *Efficacy of antiviral therapy of hepatitis C in Kazakhstan. The Liver Week 2014*. Seoul, 181-182.
159. Ahmad, N., Alspaugh, J. A., Drew, W. L., Lagunoff, M., Pottinger, P. S., Reller, L. B. (2018). *Sherris Medical Microbiology*. New York: McGraw-Hill Companies, 541-4.
160. Kandemir, Ö. and Danalıoğlu, A. (2015). *Hepatit B'den D'ye Hep Güncel* İstanbul: Content Ed Net Türkiye 313.
161. Wilkins, T., Akhtar, M., Gititu, E., Jalluri, C. and Ramirez, J. (2015). Diagnosis and management of hepatitis C. *American Family Physician*, 91(12), 835-42.
162. Bayacioğlu, S. (2014). *Kronik Hepatitler 2014 ve Sonrası*, Ankara: Fersa Matbaacılık Ltd. Şti., 326.
163. Aygen, B., Demirtürk, N., Türker, N., Asan, A., Eraksoy, H., Gürbüz, Y. (2017). Kronik Hepatit C Virusü İnfeksiyonunun Yönetimi: Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Derneği Viral Hepatit Çalışma Grubu Uzlaşma Raporu-2017 Güncellemesi. *Klinik Dergisi*, 30(1), 2-35.
164. European Association for the Study of the Liver (2017). EASL recommendations on treatment of hepatitis C 2016. *Journal of Hepatology*, 66(1), 153-194.
165. Khan, H., Hill, A., Main, J., Brown, A. and Cooke, G. (2017). Can hepatitis C virus antigen testing replace ribonucleic acid Polymerase Chain Reaction analysis for detecting hepatitis C virus? A systematic review. *Open Forum Infectious Diseases*, 4(2), ofw252.
166. İnternet: Spach, D. H. (2018). "Hepatitis C Diagnostic Testing." Web: <https://www.hepatitisc.uw.edu/go/screening-diagnosis/diagnostic-testing/core-concept/all> 26 Kasım 2019'da alınmıştır.
167. Abdel-Hamid, M., El-Daly, M., El-Kafrawy, S., Mikhail, N., Strickland, G. T. and Fix, A. D. (2002). Comparison of second- and third-generation enzyme immunoassays for detecting antibodies to hepatitis C virus. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(5), 1656-1659.
168. Dufour, D. R., Talastas, M., Fernandez, M. D. A. and Harris, B. (2003). Chemiluminescence assay improves specificity of hepatitis C antibody detection. *Clinical Chemistry*, 49(6 Pt 1), 940-944.
169. Alter, M. J., Kuhnert, W. L. and Finelli, L. (2003). Guidelines for laboratory testing and result reporting of antibody to hepatitis C virus. *Morbidity and Mortality Weekly Report Recommendations and Reports*, 1-24.

170. Smith, B. D., Drobeniuc, J., Jewett, A., Branson, B. M., Garfein, R. S., Teshale, E. (2011). Evaluation of three rapid screening assays for detection of antibodies to hepatitis C virus. *The Journal of Infectious Diseases*, 204(6), 825-831.
171. D'Angelo, R. G., Klepser, M., Woodfield, R. and Patel, H. (2015). Hepatitis C virus screening: A review of the Oraquick Hepatitis C virus rapid antibody test. *Journal of Pharmacy Technology*, 31(1), 13-19.
172. Abacioğlu, H. and Öktem, M. A. (2012). *Hepatit C Virüsü. Moleküler, Klinik ve Temel Viroloji*. Us, D. and Ergünay, K. Ankara, NOBEL Akademik Yayıncılık, 355-361.
173. Chevaliez, S. and Pawlotsky, J. M. (2006). Hepatitis C virus serologic and virologic tests and clinical diagnosis of HCV-related liver disease. *International Journal of Medical Sciences*, 3(2), 35-40.
174. İnternet: Viral Hepatitis and Liver Disease. (2016). "Laboratory Tests- Hepatitis C." Web: <https://www.hepatitis.va.gov/hcv/screening-diagnosis/laboratory-tests.asp#S5X> 26 Kasım 2019'da alınmıştır.
175. Sarrazin, C. (2016). The importance of resistance to direct antiviral drugs in HCV infection in clinical practice. *Journal of Hepatology*, 64(2), 486-504.
176. İnternet: Centers for Disease Control and Prevention. (2013). "Testing for HCV Infection: An Update of Guidance for Clinicians and Laboratorians." Web: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6218a5.htm> 26 Kasım 2019'da alınmıştır.
177. Rizzetto, M., Canese, M. G., Arico, S., Crivelli, O., Trepo, C., Bonino, F. (1977). Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (delta/anti-delta) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers. *Gut*, 18(12), 997-1003.
178. Rizzetto, M. (1983). The delta agent. *Hepatology*, 3(5), 729-737.
179. Altunoğlu, Y., Karataylı, S. C. and Bozdayı, M. (2011). Hepatit Delta Virüs Virolojisi: Taksonomi, Sınıflandırma, Yapısal ve Genomik Organizasyon, Viral Replikasyon, Viral Heterojenite, Deney Hayvanlarında İnfeksiyon. *Güncel Gastroenteroloji*, 15, 241-4.
180. Chang, J., Gudima, S. O., Tarn, C., Nie, X. and Taylor, J. M. (2005). Development of a novel system to study hepatitis delta virus genome replication. *Virology Journal*, 79(13), 8182-8.
181. Polo, J. M., Jeng, K.-S., Lim, B., Govindarajan, S., Hofman, F., Sangiorgi, F. (1995). Transgenic mice support replication of hepatitis delta virus RNA in multiple tissues, particularly in skeletal muscle. *Journal of Virology*, 69(8), 4880-4887.
182. Hetzel, U., Szirovicza, L., Smura, T., Prahauser, B., Vapalahti, O., Kipar, A. (2019). Identification of a novel Deltavirus in Boa constrictors. *mBio*, 10(2), e00014-19.

183. Wille, M., Netter, H. J., Littlejohn, M., Yuen, L., Shi, M., Eden, J. S. (2018). A divergent hepatitis D-like agent in birds. *Viruses*, 10(12).
184. Weller, M. L., Gardener, M. R., Bogus, Z. C., Smith, M. A., Astorri, E., Michael, D. G. (2016). Hepatitis Delta virus detected in salivary glands of sjogren's syndrome patients and recapitulates a sjogren's syndrome-like phenotype in vivo. *Pathogens and Immunity*, 1(1), 12-40.
185. İnternet: Lars, M., John, T., William, S. M., Camille, S., Paul, D. and Helene, N. (2018). "Deltavirus." Web: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/negative-sense-rna-viruses/w/deltavirus 26 Kasım 2019'da alınmıştır.
186. Botelho-Souza, L. F., Vasconcelos, M. P. A., Dos Santos, A. O., Salcedo, J. M. V. and Vieira, D. S. (2017). Hepatitis Delta: Virological and clinical aspects. *Virology Journal*, 14(1), 177.
187. Kayar, Y. and Danalıoğlu, A. (2015). *Hepatit Delta Virüsünün Moleküler Virolojisi. Hepatit B den D ye Hep Güncel Klinik El Kitabı*. Kandemir, Ö. and Danalıoğlu, A. İstanbul, Content Ed Net, 313.
188. Alfaiate, D., Dény, P. and Durantel, D. (2015). Hepatitis Delta virus: From biological and medical aspects to current and investigational therapeutic options. *Antiviral Research*, 122, 112-129.
189. Mentha, N., Clément, S., Negro, F. and Alfaiate, D. (2019). A review on hepatitis D: From virology to new therapies. *Journal of Advanced Research*, 17, 3-15.
190. Lempp, F. A. and Urban, S. (2017). Hepatitis delta virus: replication strategy and upcoming therapeutic options for a neglected human pathogen. *Viruses*, 9(7), 172.
191. Freitas, N., Cunha, C., Menne, S. and Gudima, S. O. (2014). Envelope proteins derived from naturally integrated hepatitis B virus DNA support assembly and release of infectious hepatitis delta virus particles. *Journal of Virology*, 88(10), 5742-5754.
192. Aldabe, R., Suarez-Amaran, L., Usai, C. and Gonzalez-Aseguinolaza, G. (2015). Animal models of chronic hepatitis Delta virus infection host–virus immunologic interactions. *Pathogens*, 4, 46-65.
193. Niro, G. A., Casey, J. L., Gravinese, E., Garrubba, M., Conoscitore, P., Sagnelli, E. (1999). Intrafamilial transmission of hepatitis delta virus: molecular evidence. *Journal of Hepatology*, 30(4), 564-569.
194. Chen, H.-Y., Shen, D.-T., Ji, D.-Z., Han, P.-C., Zhang, W.-M., Ma, J.-F. (2018). Prevalence and burden of hepatitis D virus infection in the global population: a systematic review and meta-analysis. *Gut*, 2018-316601.
195. Liaw, Y.-F., Chiu, K.-W., Chu, C.-M., Sheen, I.-S. and Huang, M.-J. (1990). Heterosexual transmission of hepatitis delta virus in the general population of an area endemic for hepatitis B virus infection: a prospective study. *Journal of Infectious Diseases*, 162(5), 1170-1172.

196. İnternet: World Health Organization (2019). Hepatitis D. Web: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-d> 03 şubat 2020'de alınmıştır.
197. Wedemeyer, H. and Negro, F. (2018). Devil hepatitis D: An orphan disease or largely underdiagnosed? *Gut*, 2018-317403.
198. Stockdale, A. J., Kreuels, B., Henrion, M. Y. R., Giorgi, E., Kyomuhangi, I., de Martel, C. (2020). The global prevalence of hepatitis D virus infection: systematic review and meta-analysis. *Journal of Hepatology*, S0168-8278(20), 30220-8.
199. Ayaz, C., Yardımcı, C., Çandır, N., Ersöz, G., Şanlıdağ, T., Tıgılı, A. (2014). Kronik hepatit D virusu infeksiyonunun yönetimi: Türk klinik mikrobiyoloji ve infeksiyon hastalıkları derneği viral hepatit çalışma grubu uzlaşısı raporu. *Klinik Dergisi*, 27(1), 40-47.
200. Chen, X., Oidovsambuu, O., Liu, P., Grosely, R., Elazar, M., Winn, V. D. (2017). A novel quantitative microarray antibody capture assay identifies an extremely high hepatitis delta virus prevalence among hepatitis B virus-infected mongolians. *Hepatology*, 66(6), 1739-1749.
201. Scarponi, C. F. O., Silva, R., Souza Filho, J. A., Guerra, M. R. L., Pedrosa, M. A. F. and Mol, M. P. G. (2019). Hepatitis Delta prevalence in South America: A systematic review and meta-analysis. *The Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine*, 52, e20180289.
202. Groc, S., Abbate, J. L., Le Gal, F., Gerber, A., Tuillon, E., Albert, J. L. (2019). High prevalence and diversity of hepatitis B and hepatitis delta virus in Gabon. *Journal of Viral Hepatitis*, 26(1), 170-182.
203. Butler, E. K., Rodgers, M. A., Collier, K. E., Barnaby, D., Krilich, E., Olivo, A. (2018). High prevalence of hepatitis delta virus in Cameroon. *Scientific Reports*, 8(1), 1-9.
204. Amini, N., Alavian, S. M., Kabir, A., Aalaei-Andabili, S. H., Saiedi Hosseini, S. Y. and Rizzetto, M. (2013). Prevalence of hepatitis d in the eastern mediterranean region: Systematic review and meta analysis. *Hepatitis Monthly*, 13(1), e8210.
205. Gheorghe, L., Csiki, I. E., Iacob, S., Gheorghe, C., Trifan, A., Grigorescu, M. (2015). Hepatitis Delta virus infection in Romania: Prevalence and risk factors. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases*, 24(4), 413-421.
206. Nersesov, A., Kaibullayeva, Z., Raissova, A., Jumabayeva, A., Novitskaya, M. and Kyzdarbekov, A. (2014). *Features of chronic Hepatitis D in Kazakhstan. The liver week 2014*. Korean Liver Transplantation Society. Seoul, 176.
207. Le Gal, F., Brichler, S., Drugan, T., Alloui, C., Roulot, D., Pawlotsky, J. M. (2017). Genetic diversity and worldwide distribution of the deltavirus genus: A study of 2,152 clinical strains. *Hepatology*, 66(6), 1826-1841.

208. Imazeki, F., Omata, M. and Ohto, M. (1990). Heterogeneity and evolution rates of delta virus RNA sequences. *Journal of Virology*, 64(11), 5594-5599.
209. Lee, C. M., Changchien, C. S., Chung, J. C. and Liaw, Y. F. (1996). Characterization of a new genotype II hepatitis delta virus from Taiwan. *Journal of Medical Virology*, 49(2), 145-154.
210. Ivaniushina, V., Radjef, N., Alexeeva, M., Gault, E., Semenov, S., Salhi, M. (2001). Hepatitis Delta virus genotypes I and II cocirculate in an endemic area of Yakutia, Russia. *Journal of General Virology*, 82(11), 2709-2718.
211. Cicero, M. F., Pena, N. M., Santana, L. C., Arnold, R., Azevedo, R. G., Leal, E. S. (2016). Is Hepatitis Delta infections important in Brazil? *BMC Infectious Diseases*, 16(1), 525.
212. Sakugawa, H., Nakasone, H., Nakayoshi, T., Kawakami, Y., Miyazato, S., Kinjo, F. (1999). Hepatitis delta virus genotype IIb predominates in an endemic area, Okinawa, Japan. *Journal of Medical Virology*, 58(4), 366-72.
213. Wu, J. C., Chiang, T. Y. and Sheen, I. J. (1998). Characterization and phylogenetic analysis of a novel hepatitis D virus strain discovered by restriction fragment length polymorphism analysis. *Journal of General Virology*, 79 (Pt 5), 1105-13.
214. İnternet: ICTV Reports. (2019). "Genus: Deltavirus." Web: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/negative-sense-rna-viruses-2011/w/negrna_viruses/211/deltavirus 26 Kasım 2019'da alınmıştır.
215. Ilyassova, B. S., Abzhaparova, B. S., Shamsivaliyeva, K. A., Belousov, V. Y., Ayunova, V. S., Solomadin, M. V. (2019). Hepatitis Delta virus genotyping study results in regions of Kazakhstan. *Medicine*, 10-11, 208-209.
216. Su, C.-W., Huang, Y.-H., Huo, T.-I., Shih, H. H., Sheen, I. J., Chen, S.-W. (2006). Genotypes and viremia of hepatitis B and D viruses are associated with outcomes of chronic hepatitis D patients. *Gastroenterology*, 130(6), 1625-1635.
217. Gilman, C., Heller, T. and Koh, C. (2019). Chronic hepatitis delta: A state-of-the-art review and new therapies. *World Journal of Gastroenterology*, 25(32), 4580-4597.
218. Koh, C., Heller, T. and Glenn, J. S. (2019). Pathogenesis of and new therapies for hepatitis D. *Gastroenterology*, 156(2), 461-476 e1.
219. Aksoy, E. K. and Köklü, S. (2015). *HDV Enfeksiyonu: Klinik. Hepatit B den D ye Hep Güncel Klinik El Kitabı*. Kandemir, Ö. and Danalıoğlu, A. İstanbul, Content Ed Net Türkiye, 313.
220. Niro, G. A. and Smedile, A. (2012). Current concept in the pathophysiology of hepatitis delta infection. *Current infectious disease reports*, 14(1), 9-14.
221. Altındış, M. (2015). *Hepatit D Virus Enfeksiyonlarında Güncel Tanı. Hepatit Mikrobiyolojisi*. Bayraktar, B. İstanbul, İstanbul Tıp Kitabevi, 1, 233-235.
222. Farci, P. and Niro, G. A. (2012). Clinical features of hepatitis D. *Seminars in Liver Disease*, 32(3), 228-36.

223. Fattovich, G., Boscaro, S., Noventa, F., Pornaro, E., Stenico, D., Alberti, A. (1987). Influence of hepatitis delta virus infection on progression to cirrhosis in chronic hepatitis type B. *The Journal of Infectious Diseases*, 155(5), 931-5.
224. Ji, J., Sundquist, K. and Sundquist, J. (2012). A population-based study of hepatitis D virus as potential risk factor for hepatocellular carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 104(10), 790-792.
225. Romeo, R., Del Ninno, E., Rumi, M., Russo, A., Sangiovanni, A., de Franchis, R. (2009). A 28-year study of the course of hepatitis Delta infection: a risk factor for cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 136(5), 1629-38.
226. Çelen, M. K. and Kandemir, Ö. (2015). *HDV Enfeksiyonu. Hepatit B den D ye hep güncel klinik el kitabı*. Kandemir, Ö. and Danalıoğlu, A. İstanbul, Content Ed Net, 313.
227. Huang, C. R. and Lo, S. J. (2014). Hepatitis D virus infection, replication and cross-talk with the hepatitis B virus. *World Journal of Gastroenterology*, 20(40), 14589-97.
228. Yurdaydin, C. (2019). New treatment options for delta virus: Is a cure in sight? *Journal of Viral Hepatitis*, 26(6), 618-626.
229. Wedemeyer, H., Yurdaydin, C., Hardtke, S., Caruntu, F. A., Curescu, M. G., Yalcin, K. (2019). Peginterferon alfa-2a plus tenofovir disoproxil fumarate for hepatitis D (HIDIT-II): a randomised, placebo controlled, phase 2 trial. *The Lancet Infectious Diseases*, 19(3), 275-286.
230. El-Bassel, N., Gilbert, L., Terlikbayeva, A., Beyrer, C., Wu, E., Shaw, S. A. (2014). HIV risks among injecting and non-injecting female partners of men who inject drugs in Almaty, Kazakhstan: implications for HIV prevention, research, and policy. *International Journal of Drug Policy*, 25(6), 1195-1203.
231. Zhussupov, B., Shakarishvily, A., Muratbayeva, G., Bronzan, R., Ryan, C. and Favorov, M. (2007). Study of behaviors associated with HIV infection, STI and viral hepatitis among injecting drug users in Temirtau and Karaganda, Republic of Kazakhstan. *Central Asia Office*, 1.
232. Ostankova, Y., Semenov, A., Burkitbayev, Z., Savchuk, T. and Areg, T. A. (2016). Genetic variants of hepatitis B virus in primary donors in Astana, Kazakhstan. *Infektsiya i Immunitet*, 6(4), 359-365.
233. Ostankova, Y. V., Semenov, A., Burkitbayev, Z., Savchuk, T. and Totolian, A. A. (2018). Results of genotyping hepatitis virus B in HBsAg-negative blood donors in Astana, Kazakhstan. *Russian Journal of Infection and Immunity*, 7(4), 383-392.
234. Botova, O. P. (2012). Prevalance of hepatitis B and C among health workers and patients with non hospital for determining the results of markers in blood serum. *Èkologija i gigiena*, 62(1), 52-55.

235. García-Montalvo, B., Farfán-Ale, J., Acosta-Viana, K. and Puerto-Manzano, F. (2005). Hepatitis B virus DNA in blood donors with anti-HBc as a possible indicator of active hepatitis B virus infection in Yucatan, Mexico. *Transfusion Medicine*, 15(5), 371-378.
236. Ramia, S., Ramlawi, F., Kanaan, M., Klayme, S. and Naman, R. (2005). Frequency and significance of antibodies against hepatitis B core (anti-HBc) antigen as the only serological marker for hepatitis B infection in Lebanese blood donors. *Epidemiology and Infection*, 133(4), 695-9.
237. Glikberg, F., Brawer-Ostrovsky, J. and Ackerman, Z. (1997). Very high prevalence of hepatitis B and C in Bukharian Jewish immigrants to Israel. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 24(1), 30-3.
238. Alizadeh, Z., Milani, S. and Sharifi, Z. (2014). Occult hepatitis B virus infection among Iranian blood donors: a preliminary study. *Archives of Iranian Medicine*, 17(2), 106-7.
239. Bhatti, F. A., Ullah, Z., Salamat, N., Ayub, M. and Ghani, E. (2007). Anti-hepatitis B core antigen testing, viral markers, and occult hepatitis B virus infection in Pakistani blood donors: implications for transfusion practice. *Transfusion*, 47(1), 74-9.
240. Bárcena, R. (2014). Hepatitis B infection transmission by anti-HBc-positive grafts. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 37 Suppl 2, 43-50.
241. Wu, T., Kwok, R. M. and Tran, T. T. (2017). Isolated anti-HBc: the relevance of hepatitis B core antibody—a review of new issues. *American Journal of Gastroenterology*, 112(12), 1780-1788.
242. Pondé, R., Cardoso, D. and Ferro, M. (2010). The underlying mechanisms for the 'anti-HBc alone' serological profile. *Archives of virology*, 155(2), 149-158.
243. Çetinkol, Y., Yıldırım, A. A., Çalgın, M. and Altındış, M. (2015). Atipik hepatit B serolojileri; retrospektif bir değerlendirme. *Turkish Journal of Clinics and Laboratory*, 6(4), 112-115.
244. Kishk, R., Nemr, N., Elkady, A., Mandour, M., Aboelmagd, M., Ramsis, N. (2015). Hepatitis B surface gene variants isolated from blood donors with overt and occult HBV infection in north eastern Egypt. *Virology journal*, 12(1), 153.
245. Özdemir, D., Yilmaz, Z., Şencan, İ., Yildirim, M. and Küçükbayrak, A. (2008). İzole Anti-Hbc pozitifliği saptanan hastaların hepatit B aşısına karşı immün yanıtlarının değerlendirilmesi. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*, 10(1), 28-31.
246. Knöll, A., Hartmann, A., Hamoshi, H., Weislmaier, K. and Jilg, W. (2006). Serological pattern "anti-HBc alone": characterization of 552 individuals and clinical significance. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 12(8), 1255.
247. Ramezani, A., Banifazl, M., Eslamifar, A. and Aghakhani, A. (2010). Serological pattern of anti-HBc alone infers occult hepatitis B virus infection in high-risk individuals in Iran. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 4(10), 658-661.

248. Organization, W. H. (2019). Hepatitis B vaccines: WHO position paper, July 2017–Recommendations. *Vaccine*, 37(2), 223-225.
249. Wong, G. L. and Chan, H. L. (2013). Use of quantitative hepatitis B surface antigen with hepatitis B virus DNA in clinical practice. *Clin Liver Dis (Hoboken)*, 2(1), 8-10.
250. Sharma, S. K., Saini, N. and Chwla, Y. (2005). Hepatitis B virus: inactive carriers. *Virology Journal*, 2(1), 82.
251. Ding, F., Yu, H.-G., Li, Y.-X., Cui, N., Dai, J.-F. and Yu, J.-P. (2015). Sequence analysis of the HBV S protein in Chinese patients with coexisting HBsAg and anti-HBs antibodies. *Journal of medical virology*, 87(12), 2067-2073.
252. Aydin, N., Kirdar, S., Uzun, N., Eyigör, M. and Sayan, M. (2016). Hepatit B Enfeksiyonunda Atipik Serolojik Profiller: HBsAg ve Anti-HBs Birlikte Pozitif Olgularda S Geni Mutasyonlarının Araştırılması. *Mikrobiyol Buluteni*, 50(4), 535-543.
253. Kirdar Sevin (2015). *Atipik serolojik profillere yaklaşım Hepatit Mikrobiyolojisi*. Altındış, M. and Tabak, F. İstanbul, İstanbul Tıp Kitabevi, 88-95.
254. Huang, X., Qin, Y., Zhang, P., Tang, G., Shi, Q., Xu, J. (2010). PreS deletion mutations of hepatitis B virus in chronically infected patients with simultaneous seropositivity for hepatitis-B surface antigen and anti-HBs antibodies. *Journal of medical virology*, 82(1), 23-31.
255. Zhang, J.-M., Xu, Y., Wang, X.-Y., Yin, Y.-K., Wu, X.-H., Weng, X.-H. (2007). Coexistence of Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg) and Heterologous Subtype-Specific Antibodies to HBsAg among Patients with Chronic Hepatitis B Virus Infection. *Clinical Infectious Diseases*, 44(9), 1161-1169.
256. Omarova, M. N., Shuratov, I. H., Tachanova, G. K., Jumagaliyeva, A. B., Ashueva, N. I. and Sarsenova, A. B. (2016). HCV genotypes in patients with some «noninfectious» disease. *International Journal of Applied and Fundamental Research*, 8(1), 36-39.
257. Sadvakas, A. S., Nersesov, A. V., Rysuly, M. R., Parmankulova, T. N. and Kelimhanova, S. E. (2019). Screening for viral hepatitis C: New prospects for the use of new generation serological tests in the republic of Kazakhstan. *Vestnik KazNMU*(1), 596-600.
258. Nwokediuko, S. C. and Ijeoma, U. (2009). Seroprevalence of antibody to HDV in Nigerians with hepatitis B virus-related liver diseases. *Niger J Clin Pract*, 12(4), 439-42.
259. Khan, A., Kurbanov, F., Tanaka, Y., Elkady, A., Sugiyama, M., Dustov, A. (2008). Epidemiological and clinical evaluation of hepatitis B, hepatitis C, and delta hepatitis viruses in Tajikistan. *Journal of Medical Virology*, 80(2), 268-276.

260. Ahmed, M., Sheemy, M. A.-M., Sedky, N., Esmat, G. and Gomaa, A. (2016). Study of the impact of hepatitis D virus infection on chronic hepatitis B virus patients in Egypt. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5(2), 449-458.
261. Uçmak, H., Çelik, M., Kökoğlu, Ö. F., Kuzhan, N., Toprak, R., Güler, E. (2007). Kronik hepatit C'li hastalarda ve ailelerinde HCV bulaş ile ilgili risk faktörlerinin değerlendirilmesi. *Viral Hepatit Dergisi*, 12(1):, 24-29.
262. Zhang, Z.-H., Wu, C.-C., Chen, X.-W., Li, X., Li, J. and Lu, M.-J. (2016). Genetic variation of hepatitis B virus and its significance for pathogenesis. *World Journal of Gastroenterology*, 22(1), 126.
263. Croagh, C. M., Desmond, P. V. and Bell, S. J. (2015). Genotypes and viral variants in chronic hepatitis B: A review of epidemiology and clinical relevance. *World Journal of Hepatology*, 7(3), 289.
264. Thijssen, M., Trovão, N. S., Mina, T., Maes, P. and Pourkarim, M. R. (2020). Novel hepatitis B virus subgenotype A8 and quasi-subgenotype D12 in African-Belgian chronic carriers. *International journal of infectious diseases: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases*, 93, 98-101.
265. Tallo, T., Tefanova, V., Priimägi, L., Schmidt, J., Katargina, O., Michailov, M. (2008). D2: Major subgenotype of hepatitis B virus in Russia and the Baltic region. *Journal of General Virology*, 89(8), 1829-1839.
266. Ostankova, J., Semenov, A., Fajzullaev, H., Kazakova, E., Kozlov, A., Musabaev, E. (2016). Molecular-Biological markers of hepatitis B in patients with liver fibrosis/cirrhosis in Uzbekistan. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii*(5), 34-43.
267. Semenov, A. V., Ostankova, Y. V., K.A, N., Ksymbekova, K. T., Lavrentieva, I. N., Tobokalova, S. T. (2016). Molecular epidemiology features of HBV/HDV co-infection in Kyrgyzstan. *Russian Journal of Infection and Immunity*, 6(2), 141-150.
268. Ostankova, Y. V., Semenov, A. V., Burkitbayev, Z. K., Savchuk, T. N. and Totolian, A. A. (2016). Genetic variants of hepatitis B virus in primary donors in Astana, Kazakhstan. *Russian Journal of Infection and Immunity*, 6(4), 359-366.
269. Shevcov, A., Filipenko, M., Kijanbekova, L., Kravchenko, A., Omralina, A., Abeev, A. (2011). Genotipy virusa gepatita B, cirkulirujušie na territorii g. Astana. *Eurasian Journal of Applied Biotechnology*(4), 14-23.
270. Karataş, E., Erensoy, S., Akarca, U. S. and Sertöz, R. (2018). Hepatit B Virüsü (HBV) Genotip D ile Enfekte Hasta Gruplarında HBV preS1, preS2 ve S Gen Bölgelerinin Analizi. *Mikrobiyoloji Buluteni*, 52(1), 23-34.
271. Bozdayi, G., Türkyilmaz, A. R., Idilman, R., Karatayli, E., Rota, S., Yurdaydin, C. (2005). Complete genome sequence and phylogenetic analysis of hepatitis B virus isolated from Turkish patients with chronic HBV infection. *Journal of medical virology*, 76(4), 476-481.

272. Reddy, S., Bilolikar, A. and Kakarla, P. (2017). Significance of hepatitis C virus (HCV) viremia in anti-HCV antibody (IgG) positive subjects. *Journal of Medicine in Scientific Research*, 5(1), 17-20.
273. Buket, C. A., Ayse, A., Selcuk, K., Suleyman, O. and Emel, S. C. (2014). Comparison of HCV core antigen and anti-HCV with HCV RNA results. *African Health Sciences*, 14(4), 816-20.
274. Akkuzu, M. Z., Yaraş, S., Adam, S. M., Altıntaş, E. and Sezgin, O. (2019). Evaluation of anti-HCV-positive HCV RNA-negative patients: Is it a safe condition? *The Turkish Journal of Gastroenterology*, 30(suppl), S58.
275. Fidan, I., Çuhadar, T., Koç, Z., Duman, G. G., Ünal, A. and Karakuş, R. (2017). Anti-HCV pozitif serum örneklerinde viremi oranlarının ve anti-HCV düzeyleri ile ilişkisinin araştırılması. *ANKEM Dergisi*, 31(1), 7-13.
276. Kirişçi, Ö. and Caliskan, A. (2019). Threshold value of the anti-HCV test in the diagnosis of HCV infection. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 13(10), 914-919.
277. Oradova, A. S. and Shopaeva, G. A. (2017). *Struktura genotipov virusa gepatita C u pacientov gepatologičeskogo centra g. Almaty. Molekuljarnaja Diagnostika 2017*, 41-42.
278. Oradova, A. S. and Shopaeva, G. A. (2017). *Kompleksnoe PCR-issledovanie gepatita C u bol'nyh gepatologičeskogo centra g. Almaty. Molekuljarnaja Diagnostika 2017*, 42.
279. El-Awady, M. K. and Dawood, R. M. (2017). *Resistance to direct-acting antiviral agents in treatment of hepatitis C virus infections, update on hepatitis*, London: IntechOpen Limited, 1-93.
280. Romano, K. P., Ali, A., Royer, W. E. and Schiffer, C. A. (2010). Drug resistance against HCV NS3/4A inhibitors is defined by the balance of substrate recognition versus inhibitor binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(49), 20986-91.
281. Sun, D., Dai, M., Shen, S., Li, C. and Yan, X. (2018). Analysis of Naturally Occurring Resistance-Associated Variants to NS3/4A Protein Inhibitors, NS5A Protein Inhibitors, and NS5B Polymerase Inhibitors in Patients With Chronic Hepatitis C. *Gene Expression*, 18(1), 63-69.
282. Rajagopalan, R., Misialek, S., Stevens, S. K., Myszka, D. G., Brandhuber, B. J., Ballard, J. A. (2009). Inhibition and binding kinetics of the hepatitis C virus NS3 protease inhibitor ITMN-191 reveals tight binding and slow dissociative behavior. *Biochemistry*, 48(11), 2559-68.
283. Aissa Larousse, J., Trimoulet, P., Recordon Pinson, P., Tauzin, B., Azzouz, M. M., Ben Mami, N. (2015). Prevalence of hepatitis C virus (HCV) variants resistant to NS5A inhibitors in naive patients infected with HCV genotype 1 in Tunisia. *Virology Journal*, 12, 84.
284. Paolucci, S., Fiorina, L., Mariani, B., Gulminetti, R., Novati, S., Barbarini, G. (2013). Naturally occurring resistance mutations to inhibitors of HCV NS5A

- region and NS5B polymerase in DAA treatment-naive patients. *Virology Journal*, 10, 355.
285. Fridell, R. A., Qiu, D., Wang, C., Valera, L. and Gao, M. (2010). Resistance analysis of the hepatitis C virus NS5A inhibitor BMS-790052 in an in vitro replicon system. *Antimicrob Agents Chemother*, 54(9), 3641-50.
 286. Fridell, R. A., Wang, C., Sun, J. H., O'Boyle, D. R., Nower, P., Valera, L. (2011). Genotypic and phenotypic analysis of variants resistant to hepatitis C virus nonstructural protein 5A replication complex inhibitor BMS-790052 in humans: in vitro and in vivo correlations. *Hepatology*, 54(6), 1924-1935.
 287. Zeuzem, S., Berg, T., Gane, E., Ferenci, P., Foster, G., Fried, M. (2012). 2 TMC435 in HCV genotype 1 patients who have failed previous pegylated interferon/ribavirin treatment: Final SVR24 results of the ASPIRE trial. *Journal of Hepatology*, 56, S1-S2.
 288. Suzuki, F., Sezaki, H., Akuta, N., Suzuki, Y., Seko, Y., Kawamura, Y. (2012). Prevalence of hepatitis C virus variants resistant to NS3 protease inhibitors or the NS5A inhibitor (BMS-790052) in hepatitis patients with genotype 1b. *Journal of clinical virology*, 54(4), 352-354.
 289. Ji, H., Kozak, R. A., Biondi, M. J., Pilon, R., Vallee, D., Liang, B. B. (2015). Next generation sequencing of the hepatitis C virus NS5B gene reveals potential novel S282 drug resistance mutations. *Virology*, 477, 1-9.
 290. Donaldson, E. F., Harrington, P. R., O'Rear, J. J. and Naeger, L. K. (2015). Clinical evidence and bioinformatics characterization of potential hepatitis C virus resistance pathways for sofosbuvir. *Hepatology*, 61(1), 56-65.
 291. Thompson, P. A., Patel, R., Showalter, R. E., Li, C., Applemon, J. R. and Steffy, K. (2008). *In vitro studies demonstrate that combinations of antiviral agents that include HCV polymerase inhibitor ANA598 have the potential to overcome viral resistance*. *Hepatology*, John Wiley & Sons Inc 111 River St, Hoboken, NJ 07030 usa. 48, 1164a-1164a.
 292. Ilyassova, B. S., Baymakhanov, B. B., Ibrayeva, N., Baychalova, A., Abzhaparova, B. S., Abdraimova, A. (2018). *The study of virological and immunologic factors of the progression of chronic viral hepatitis Delta in the Kazakh population*. *Transplantation*. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins. 102, 217.
 293. Bozdayı, A., Aslan, N., Bozdayı, G., Türkyılmaz, A., Sengezer, T., Wend, U. (2004). Molecular epidemiology of hepatitis B, C and D viruses in Turkish patients. *Archives of Virology*, 149(11), 2115-2129.
 294. Altuğlu, I., Özacar, T., Sertoz, R. Y. and Erensoy, S. (2007). Hepatitis delta virus (HDV) genotypes in patients with chronic hepatitis: molecular epidemiology of HDV in Turkey. *International journal of infectious diseases*, 11(1), 58-62.
 295. Aftab, M., Amin, I., Idrees, M., Ali, A., Rafique, S. and Naz, S. (2018). Molecular epidemiology of hepatitis delta and hepatitis B viruses circulating in two major provinces (East and North-West) of Pakistan. *Infection, Genetics and Evolution*, 64, 65-69.

296. Tsatsralt-Od, B., Takahashi, M., Endo, K., Buyankhuu, O., Baatarkhuu, O., Nishizawa, T. (2006). Infection with hepatitis A, B, C, and delta viruses among patients with acute hepatitis in Mongolia. *Journal of Medical Virology*, 78(5), 542-550.
297. Tsatsralt-Od, B., Takahashi, M., Nishizawa, T., Endo, K., Inoue, J. and Okamoto, H. (2005). High prevalence of dual or triple infection of hepatitis B, C, and delta viruses among patients with chronic liver disease in Mongolia. *Journal of Medical Virology*, 77(4), 491-499.
298. Binh, M. T., Hoan, N. X., Van Tong, H., Giang, D. P., Sy, B. T., Toan, N. L. (2018). HDV infection rates in northern Vietnam. *Scientific Reports*, 8(1), 1-7.
299. Ifeorah, I. M., Faleye, T. O., Bakarey, A. S., Adewumi, O. M., Gerber, A., Le Gal, F. (2019). Characterization of hepatitis delta virus strains spreading in Abuja, Nigeria. *Journal of Medical Virology*, 91(9), 1688-1692.
300. Popescu, G. A., Otelea, D., Gavriliu, L. C., Neaga, E., Popescu, C., Paraschiv, S. (2013). Epidemiology of hepatitis D in patients infected with hepatitis B virus in bucharest: a cross-sectional study. *Journal of Medical Virology*, 85(5), 769-74.
301. Gheorghe, L., Csiki, I. E., Iacob, S., Gheorghe, C., Trifan, A., Grigorescu, M. (2015). Hepatitis Delta Virus Infection in Romania: Prevalence and Risk Factors. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases*, 24(4), 413-21.
302. Aftab, M., Naz, S., Aftab, B., Ali, A., Rafique, S., Fatima, Z. (2019). Characterization of hepatitis Delta virus among pregnant women of Pakistan. *Viral Immunology*, 32(8), 335-340.
303. Yolcu, A., Karabulut, N., Alaçam, S., Önel, M., Büyük, M., Güllüoğlu, M. (2019). Frequency of Hepatitis Delta Virus in Hepatitis B Surfaceantigen-positive Patients. *Viral Hepatit Dergisi*, 25(1), 14.
304. Krogsgaard, K., Kryger, P., Aldershvile, J., Andersson, P., Sørensen, T. I. and Nielsen, J. O. (1987). Delta-infection and suppression of hepatitis B virus replication in chronic HBsAg carriers. *Hepatology*, 7(1), 42-5.
305. Schaper, M., Rodriguez-Frias, F., Jardi, R., Tabernero, D., Homs, M., Ruiz, G. (2010). Quantitative longitudinal evaluations of hepatitis delta virus RNA and hepatitis B virus DNA shows a dynamic, complex replicative profile in chronic hepatitis B and D. *Journal of Hepatology*, 52(5), 658-64.





EK-1. Etik Kurul Raporu

Ф-МК-003/097



Hoca Ahmet Yesevi Uluslararası Türk-
Kazak Üniversitesi Tıp Bilimsel
Araştırma Enstitüsü Müdürü
Prof. Dr.
Moldaliyev I.S. " 26 " 09 2017

Klinik tanı ve klinik olmayan çalışmaların yürütülmesi olasılığı hakkında

BİLİRKİŞİ RAPORU

Hoca Ahmet Yesevi Uluslararası Türk-Kazak Üniversitesi 06.27.2013 № 6 Senatosu oturumunda oluşturulmuş Bilimsel Araştırma Enstitüsü uzmanlar komisyonu, K.K. Baitursinov'un "Kazakistan, Türkistan bölgesinde hepatit virüsleri (Hepatit A, B, C, D, E,) ve diğer kan ve kan yoluyla bulaşan (Human Immunodeficiency Virüs-1 (HIV-1) Ve Human T-Lymphotropic Virüs 1-2 (HTLV 1-2)) virüsler için prevalans çalışması" adlı projesinin bilimsel araştırma protokolünü inceleyerek: örneklerin toplanması (kan serumu) ve bilimsel proje uygulanmasında teşhis çalışmalarının yapılması uluslararası ve ulusal tıp etiği standartlarını ihlal eden bilgileri içermediğini doğrular (19/05/2015 tarihli Kazakistan Cumhuriyeti Kanununun "halkın sağlığı ve sağlık sistemi" kararı 180 ve 181) ve Kazakistan Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı 12 Kasım 2009 697 Sayılı "Biyomedikal deneyler, klinik öncesi (klinik olmayan) ve klinik çalışmalar yürütmek için kuralların onaylanması üzerine" kararı ile çelişmiyor.

KARAR: Yukarıdaki araştırma çalışmaları (klinik öncesi çalışmalar) çerçevesinde, kan örneklerinin toplanması (serum) ve tanı çalışmasının yürütülmesine izin veriliyor.

Etik Kurul Başkanı

Prof. Dr. Ishigov I.A.

Etik Kurul Sekreteri

Turmanbaeva A.A.

EK-1. (devam) Etik Kurulu Raporu

Φ-MK-003/097

ONAYLANDI

Hoca Ahmet Yesevi Uluslararası Türk-Kazak Üniversitesi Tıp Bilimsel
 Araştırma Enstitüsü Müdürü
 Prof. Dr.
 Moldaliyev I.S. 26 " 09 2017

Hoca Ahmet Yesevi Uluslararası Türk-Kazak Üniversitesi
 Etik Kurul Kararı

Oturum No. 1

Tarih: 25 / 09 / 2017

Protokol No. 1

Atanan numara: 001 / 2017

1. Proje adı: "Kazakistan, Türkistan bölgesinde hepatit virüsleri (Hepatit A, B, C, D, E,) ve diğer kan ve kan yoluyla bulaşan (Human Immunodeficiency Virüs-1 (HIV-1) Ve Human T-Lymphotropic Virüs 1-2 (HTLV 1-2)) virüsler için prevalans çalışması".					
Proje Yönetici:		Baitursinov Kozhakhmet Kulakhmetovich			
Enstitü:		Hoca Ahmet Yesevi Uluslararası Türk-Kazak Üniversitesi Tıp Fakültesi			
Dikkate alınan unsurlar		☒ Ekli ☐ Ekli değil			
Tekar değerlendirme ☐ Evet ☒ Hayır		Bir önceki derlemenin tarihi: -			
Karar		☒ İzin verildi (I) ☐ Önerilerle izin verildi (ÖI) ☐ Tekrar başvuru (TB) ☐ İzin verilmiyor (IV)			
No	Etik komisyonu üyeleri	Kararı			
		I	ÖI	TB	IV
1	Baizakova B.U.	✓			
2	Temirbekov A.N.	✓			
3	Ashurmetov R.I.	✓			
4	Rakhimberdyev D.S.	✓			

NOT: I – İzin verildi; ÖI – Önerilerle izin verildi; TB – Tekrar başvuru; IV – İzin verilmiyor

Etik Kurul Başkanı

Prof. Dr. Ishigov I.A.

Etik Kurul Sekreteri

Turmanbaeva A.A.

EK-2. Türkiye ve Kazakistan Sağlık Bakanlığından alınan izinler



**T.C.
SAĞLIK BAKANLIğI**
Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü

HALK SAĞLIğI GENEL MÜDÜRLÜĞÜ - HSGM
MİKROBİYOLOJİ REFERANS
LABORATUVARLARI VE BİYOLOJİK ÜRÜNLER
DAİRESİ BAŞKANLIğI
11/10/2018 15:39 - 80962070-944-1404



00078607161

Sayı : 80962070/
Konu : Gümrük Muafiyeti





TİCARET BAKANLIğINA
(Gümrükler Genel Müdürlüğü)

İlgi : 11.10.2018 tarih ve 000-170888/00078546107 sayılı yazı;

Kazakistan Ahmet Yesevi Üniversitesi Tıp Fakültesi ve Ankara Üniversitesi Hepatoloji Enstitüsü ile ortak yapılan ve Kazakistan'ın Türkistan şehri genel popülasyonda "kan yolu ile bulaşan hastalıkların moleküler ve serolojik prevalansı"nı saptamayı amaçlayan araştırma projesinden elde edilen sayısı 600-800 adet arasında değişen 2 ml'lik serum örnekleri Ankara Üniversitesi Hepatoloji Enstitüsü'nde moleküler epidemiyoloji çalışmalarında kullanılmak üzere gönderilmesi planlanmaktadır.

İlgi yazıda belirtilen 600-800 adet 2 ml'lik serum örneklerinin sadece Ankara Üniversitesi Hepatoloji Enstitüsü tarafından moleküler epidemiyolojik analizleri yapılacak olup, Türkiye'ye girişinde insan sağlığı yönünden bir sakıncası bulunmamaktadır.

Bilgilerini ve gereğini arz ederim.

Prof. Dr. Selim KILIÇ
Daire Başkanı

Ek:
1- Yazı 1 Adet (1 Sayfa)

Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları ve Biyolojik Ürünler Daire Başkanlığı
Adres: Sağlık Mahallesi A. Adnan Saygun 2 Cad. No:55 06100 Sıhhiye/ANKARA
Ayrıntılı bilgi için : Tel (312) 565 53 62 Faks: (312) 565 50 60

Bilgi için: Ömer BİLGE
V.H.K.İ
Telefon : (0312) 565 55 71
e-posta : omer.bilge@saglik.gov.tr

EK-2. (devam) Türkiye ve Kazakistan Sağlık Bakanlığ'ından alınan izinler

Қазақстан Республикасының Денсаулық сақтау министрлігі Қазақстан Республикасы Денсаулық сақтау министрлігі Қоғамдық денсаулық сақтау комитеті		Министерство здравоохранения Республики Казахстан Комитет охраны общественного здоровья Министерства здравоохранения Республики Казахстан
---	---	---

ЗАКЛЮЧЕНИЕ
(разрешительный документ)

на ввоз на территорию Республики Казахстан и (или) вывоз с территории Республики Казахстан образцов клеток, тканей, биологических жидкостей и секретов, в том числе продуктов жизнедеятельности человека, физиологических и патологических выделений, мазков, сосюбов, смывов, предназначенных для диагностических целей или полученных в процессе проведения биомедицинских исследований

№ KZ74VRE00000122 Дата: 26.12.2018 г.

Комитет охраны общественного здоровья Министерства здравоохранения Республики Казахстан
(Наименование государственного органа, выдавшего заключение)

Выдано: Учреждение "Клинику - диагностический центр Международного казахско-турецкого университета имени Ходжи Ахмета Ясави", 161200, Республика Казахстан, Туркестанская область, Туркестан Г.А., г. Туркестан, улица Б.Саттарханов, дом № 29,
(Страна, название организации, юридический адрес)

Вид перемещения: Авиаперевозка

Наименование товара	Количество	Единица измерения
Сыворотка крови	800	2-х мл пробирки с винтовой

Получатель/отправитель*: Университет Анкара, Институт Гепатологии / Международной казахско-турецкой университет имени Ходжи Ахмета Ясави., Cebeci Mahallesi, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Cebeci Kampusu Balkıaz Mahallesi Dikimevi Matak Ankara Turkey 06620, 06620 Çankaya/Ankara, ТУРЦИЯ
(название, юридический адрес, страна)

Страна назначения/отправления*: ТУРЦИЯ

Цель ввоза/вывоза: Для научных диагностических целей, Отправляется в Институт гепатологии Университета Анкары (организация осуществляющей научную деятельность Akademi Pazarlama İthalat İhracat Tic.Ltd.Şti. указанное в договоре) в Турецкую Республику для проведения молекулярного и генотипического анализа для гепатитов А, В, С, D, Е и другие вирусы иммунодефицитных вирусов 1-го типа (HIV-1) и человека t-лимфотропного вируса 1-2 (HTLV 1-2) у образцов пациентов, собранных в рамках проекта.

Срок временного ввоза (вывоза): 6 месяцев

Основание: приказ председателя Комитета охраны общественного здоровья МЗ РК от 26.12.2018 года № 234 -НҚ

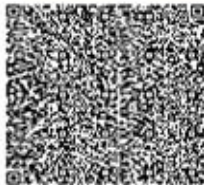
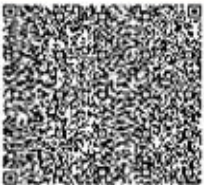
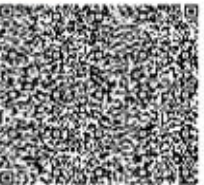
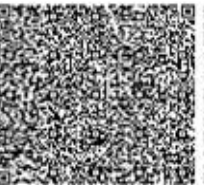
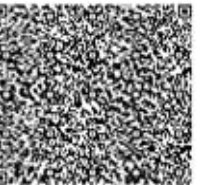
Дополнительная информация:

Страна транзита: (транзит по территории)

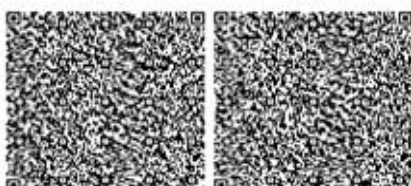
Заключение действительно по: 25.12.2019 г.

Заместитель председателя **Ахметиязова Лаура Мустафьевна**

<*> заполняется с учетом требований к категориям товаров

Бұл құжат ҚР 2003 жылдың 7 қаңтарындағы «Электрондық құжат және электрондық сөзбе» заңы туралы заңның 7-бабы, 1-тармағына сәйкес қолтаңбаның болуымен және электрондық құжаттың www.ebis.kz порталында әрқашан электрондық құжат түріндегісімен www.ebis.kz порталында тексерілетіндігі белгіленген. Дәлелді документ болмауына кәсіпкер 1-статья 7-ЗРК от 7-жылы 2003-жылы «Об электронном документе и электронной цифровой подписи» равнозначен документ болмауына кәсіпкер. Электронный документ оформляется на портале www.ebis.kz. Проверить подлинность электронного документа можно на портале www.ebis.kz.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : SARZHANOVA Shakhnoza
 Uyruğu : KAZAKİSTAN
 Doğum tarihi ve yeri : 03.09.1988, KAZAKİSTAN
 Medeni hali : Evli
 Telefon : +905530172227, +77056818787
 Faks : -
 e-mail : shakhnoza.sarzhanova@gmail.com



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Doktora	Gazi Üniversitesi, Tıbbi Mikrobiyoloji	2016 – Devam ediyor
Yüksek Lisans	Ahmet Yesevi Üniversitesi, Biyoloji	2010 – 2012
Lisans	Ahmet Yesevi Üniversitesi, Biyoloji	2006 – 2010

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2010 – 2011	Türkistan Şehir Hastanesi	Biyolog

Yabancı Dil

Rusça, İngilizce

Yayınlar

1. **Sarzhanova Sh** and Bozdayı G (2020). Yeni ve yeniden önem kazan virüsler. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*. (Derleme). Baskıdaki makale.
2. **Sarzhanova Sh**, Sarzhanov F, Altay A, Uysal B, Fidan I, Bozdayı G (2019). Cytomegalovirüs seroprevalence in a population-based different sex and age groups study in Turkestan region, Kazakhstan. 22nd Annual Meeting of the European Society for Clinical Virology. European Society for Clinical Virology. Copenhagen, 146.
3. Sarzhanov F, **Sarzhanova Sh**, Altay A, Uysal B, Bozdayı G and M, B. (2019). Determination of seroprevalence antibodies for rubella among the population of Turkestan in Kazakhstan. 22nd Annual Meeting of the European Society for Clinical Virology. European Society for Clinical Virology. Copenhagen, 148.
4. **Sarzhanova Sh**, Sarzhanov F, Altay A, Bozdayı G and M, B. (2019). Age-specific seroepidemiology of hepatitis A, and E virüs in Turkestan region, Kazakhstan. 22nd Annual Meeting of the European Society for Clinical Virology. European Society for Clinical Virology. Copenhagen, 225.
5. Sahin E, **Sarzhanova Sh**, Uysal B, Hizel K and Bozdayı G (2019). Human T-Lymphotropic virüs type 1 and type 2 coinfections in individuals infected with Human Immunodeficiency Virüs. 22nd Annual Meeting of the European Society for Clinical Virology. European Society for Clinical Virology. Copenhagen, 238.
6. Colak M, **Sarzhanova Sh**, Ozkurt Z.N, Yegin Z.A, Fidan I, Caglar K (2018). Investigation of EBV infection in patients with acute lymphoblastic leukemia and lymphoma. 21st Annual Meeting of the European Society for Clinical Virology. European Society for Clinical Virology. Athene, 68.



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR...

