



**KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KSÜ ARAŞTIRMA VE UYGULAMA HASTANESİ**  
**POLİKLİNİKLERİNE BAŞVURAN HBSAG POZİTİF**  
**HASTALARDA HDV POZİTİFLİĞİNİN SEROLOJİK**  
**VE MOLEKÜLER YÖNTEMLER KULLANILARAK**  
**ARAŞTIRILMASI VE BU TANI YÖNTEMLERİNİN**  
**KARŞILAŞTIRILMASI**

**Adem Ünal ULAKCI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KAHRAMANMARAŞ 2012**

**T.C.  
KAHRAMANMARAŞ SÜTCÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KSÜ ARAŞTIRMA VE UYGULAMA HASTANESİ  
POLİKLİNİKLERİNE BAŞVURAN HBSAG POZİTİF HASTALARDA  
HDV POZİTİFLİĞİNİN SEROLOJİK VE MOLEKÜLER  
YÖNTEMLER KULLANILARAK ARAŞTIRILMASI VE BU TANI  
YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

**DANIŞMAN: Doç. Dr. Murat ARAL**

**Adem Ünal ULAKCI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KAHRAMANMARAŞ - 2012**

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü öğrencisi Adem Ünal ULAKCI tarafından hazırlanan “KSÜ Araştırma ve Uygulama Hastanesi polikliniklerine başvuran HBsAg pozitif hastalarda HDV pozitifliğinin serolojik ve moleküler yöntemler kullanılarak araştırılması ve bu tanı yöntemlerinin karşılaştırılması ” adlı bu tez, jürimiz tarafından 08/06/2012 tarihinde oy birliği / oy çokluğu ile Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Murat ARAL (DANIŞMAN)

Doç.Dr. Mustafa GÜL (ÜYE)

Doç. Dr. Hasan UÇMAK (ÜYE)

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Mehmet Akif KILIÇ  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu çalışma 2011/2-1 YLS kodlu proje olarak Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir.

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

## TEŞEKKÜR

Eğitimim süresince ve bu çalışmada bana her türlü desteği veren, oluşan problemleri özmemi sağlayan değerli danıőmanım Sayın Doç. Dr. Murat Aral'a ,

Daima yakın desteklerini gördüğüm Sayın Doç. Dr. Mustafa Gül'e ,

Eğitimim süresince samimiyetlerini esirgemeyen yüksek lisans öğrenci ve asistan arkadaşlarıma,

Laboratuvar çalıőmalarında yardımlarını esirgemeyen Sayın Onur Kaynar'a

Eğitimimin her noktasında yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşım Arő. Gör. Erkan Kılınç'a

Eğitimim süresince benimle birlikte sıkıntıları paylaşan değerli mesai arkadaşlarım Sayın Osman Sanlı, Sayın İsmail Orhan, Sayın Hulusi Güven ve diğer mesai arkadaşlarıma,

Desteklerini esirgemeyen değerli eşim Sayın Nesibe Ulakcı'ya,

Çalıőmam süresince bana yardımcı olan ve emeği geçen herkese,  
Teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	II
TABLO LİSTESİ.....	V
ŞEKİL LİSTESİ.....	VI
GRAFİK LİSTESİ.....	VII
KISALTMALAR.....	VIII
ÖZET.....	IX
ABSTRACT.....	XI
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. VİRAL YAPI.....	2
2.1.1. Zarf Yapısı.....	3
2.1.2. Genomik Yapı.....	4
2.1.3. Delta Antijeni (HDAg).....	5
2.2. HEPATİT D VİRÜSÜNÜN REPLİKASYONU.....	6
2.3. EPİDEMİYOLOJİ.....	8
2.4. PATOGENEZ.....	10
2.5. LABORATUVAR TANISI.....	11
2.5.1. PCR (Polimeraz zincir reaksiyonu).....	14
2.5.2. Real time PCR.....	15
2.6. KLİNİK.....	16
2.6.1. Koenfeksiyon.....	17
2.6.2. Süperenfeksiyon.....	18
2.7. TEDAVİ VE KORUMA.....	19
3. MATERYAL VE METOD.....	20
3.1. ANTİ- HDV IGM DELTA ANTİKORLARIN ARAŞTIRILMASI.....	20
3.1.1. Anti- HDV IgG Delta Antikorlarının Araştırılması.....	21
3.2. HDV RNA'NIN ARAŞTIRILMASI.....	22
3.2.1. HDV RNA Ekstraksiyonu (EZ1 Virus Mini Kit v2.0).....	22
3.2.2. EZ1 Virus Mini Kit v2.0 kit içeriği.....	23
3.2.3. Kantitatif HDV RNA Amplifikasyonu (Real-Time PCR).....	24
3.2.4. Amplifikasyon Protokolü.....	26
4. BULGULAR.....	27

4.1. İSTATİKSEL ANALİZ .....	28
4.1.1. <i>Spesifite ve sensitivite hesaplanması</i> .....	28
5. TARTIŞMA.....	29
6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	36
7. KAYNAKLAR .....	38
8. ÖZGEÇMİŞ .....	46

## TABLO LİSTESİ

TABLO 1: HDV EPİDEMİYOLOJİSİNDE ENDEMİSİTE DAĞILIMI .....	9
TABLO 2: HDV ENFEKSİYONU TANISINDA SEROLOJİK VE HİSTOLOJİK BELİRTEÇLER .....	12
TABLO 3: HDV’NİN SEROLOJİSİ VE MOLEKÜLER SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ.....	13
TABLO 4: REAL-TİME PCR AMPLİKASYON AMPLİKASYON PROTOKOLÜ .....	26
TABLO 5: HEPATİT D VİRÜS SEROLOJİKVE MOLEKÜLER TEST SONUÇLARI .....	27

## ŞEKİL LİSTESİ

ŞEKİL 1. HEPATİT DELTA VİRÜSÜN ŞEMATİK YAPISI .....	3
ŞEKİL 2. HEPATİT DELTA VİRÜSÜN ZARF YAPISI .....	4
ŞEKİL 3. HDV GENOM YAPISI.....	5
ŞEKİL 4. HDV REPLİKASYONU .....	7
ŞEKİL 5. HDV’NİN DÜNYA ÜZERİNDE YAYILIMI .....	8
ŞEKİL 6. PCR ÇALIŞMA PRENSİBİ .....	14
ŞEKİL 7. HBV-HDV KOENFEKSİYONUN SEROLOJİK BULGULARI.....	17
ŞEKİL 8. HBV-HDV SÜPERENFEKSİYON SEROLOJİK BULGULARI .....	18
ŞEKİL 9. HDV ENFEKSİYONUNDA KLİNİK GELİŞİM .....	19
ŞEKİL 10. ÇALIŞMA DÜZENİĞİ .....	23



## GRAFİK LİSTESİ

GRAFİK 1. HEPATİT D VİRÜS SEROLOJİK VE MOLEKÜLER TEST SONUÇLARI DAĞILIMI.....27

## KISALTMALAR

<b>ALT:</b>	Alanin aminotransferaz
<b>Anti-HBe:</b>	HBV e antijenine karşı antikor
<b>Anti-HDV IgM, G:</b>	Delta antijenine karşı antikorlar
<b>AST:</b>	Aspartat aminotransferaz
<b>EIA:</b>	Enzim Immünassay
<b>ELISA:</b>	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
<b>HBsAg:</b>	Hepatit B Yüzey Antijeni
<b>HBV:</b>	Hepatit B Virusü
<b>HCC:</b>	Hepatosellüler Karsinoma
<b>HCV :</b>	Hepatit C virüsü
<b>HDAg:</b>	Hepatit Delta Antijeni
<b>HDV:</b>	Hepatit Delta Virusü
<b>HIV:</b>	Human Immun deficiency Virus
<b>IFN :</b>	İnterferon
<b>KHB :</b>	Kronik Hepatit B
<b>KSÜ :</b>	Kahramanmaraş Sütcü İmam Üniversitesi
<b>L-HDAg:</b>	Büyük HDAg
<b>mRNA:</b>	Mesenger RNA
<b>ORF:</b>	Açık Okuma Alanı (Open Reading Frame)
<b>PCR:</b>	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>RIA:</b>	Radyoimmünassay
<b>RNA:</b>	Ribonükleik Asit
<b>RNP:</b>	Ribonükleoprotein
<b>RT-PCR:</b>	Revers Transcriptase Polimerase Chain Reaction
<b>S-HDAg:</b>	Küçük HDAg

**KSÜ Araştırma ve Uygulama Hastanesi Polikliniklerine Başvuran Hbsag Pozitif Hastalarda HDV Pozitifliğinin Serolojik ve Moleküler Yöntemler Kullanılarak Araştırılması ve Bu Tanı Yöntemlerinin Karşılaştırılması**

**(Lisansüstü Eğitim Tezi)**

**Adem Ünal ULAKCI**

**KAHRAMANMARAŞ SÜTCÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ**

**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HAZİRAN-2012**

**ÖZET**

1977 yılında İtalyan Doktor Mario Rizzetto, Hepatit B virüsü (HBV) ile enfekte olan hastaların karaciğer hücrelerinden yeni bir nükleer antijen keşfetti. Antijenin HBV tarafından kodlanan yeni bir protein olduğu düşünülüyordu ve delta antijeni olarak adlandırıldı. Fakat daha sonra şempanzeler üzerinde yapılan araştırmalarda, bu antijeni yeni bir virüsün kodladığı bulunmuş ve bu virüs Hepatit Delta Virus (HDV) olarak adlandırılmıştır.

HDV ile dünya çapında yaklaşık 15 milyon kişi enfekte olmaktadır. Yüksek yaygınlık alanları; Kuzey Afrika, Orta Doğu, Amazon Havzası ve Amerikan Samoa Güney Pasifik adaları, Hauru ve Hiue Güney İtalya olmakla birlikte Çin, Japonya, Tayvan, Myanmar (eski Burma) HBV enfeksiyonu prevalansının yüksek olmasına rağmen HDV enfeksiyonunun düşük oranda görüldüğu ülkelerdir.

HDV enfeksiyonu, ko-enfeksiyon ve süper-enfeksiyon olmak üzere iki şekilde görülür. HBV enfeksiyonu olan hastalarda, HDV enfeksiyonunu tespit etmek, hasta için daha doğru bir prognoz sağlar. Ayrıca, akut HDV enfeksiyonu olan hastalarda şiddetli veya fulminan hepatit gelişme olasılığı daha fazladır.

HBV enfeksiyonunun tanısında; serumda anti-HDV varlığının gösterilmesi güvenilir bir şekilde tanı için yeterli olur. HDV tanısında Anti-HDV IgG ve Anti-HDV IgM antikorları RIA ve EIA yöntemleri ile tespit edilebilir. Anti-HDV 1 ile 2 ay içinde akut HDV enfeksiyonu vakalarının %90'ından fazlasında saptanabilir hale gelir. Anti-HDV varlığını tespit etmek HDV enfeksiyonu için çok yararlı bir tarama testi olsa da immün

sistemi baskılanmış hastalarda yeterli miktarda antikor olmayacağından dolayı enfeksiyonun tanısında güvenilir olmayabilir.

HDV enfeksiyonunun tanısında altın standart, karaciğerde HD antijenini (HDAg) göstermektir. Fakat bu yöntem sadece araştırma laboratuvarlarında mevcuttur. HDV RNA, akut enfeksiyonun erken tanısında ve kronik enfeksiyonu olan hastalarda HDV replikasyonunu göstermede önemli bir parametredir. HDV RNA serum düzeyleri tanısal uygulamalara ek olarak, antiviral tedavinin izlenmesinde de yardımcıdır.

Bu çalışmada, HDV enfeksiyonlarının ELİSA tanısında kullanılan HDV-IgG ve HDV-IgM antikorları ile serum HDV-RNA pozitifliği arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi planlanmıştır. Bu amaçla HBsAg pozitif 87 serum örneğinde, HDV-IgG ve HDV-IgM antikorları ELİSA yöntemi ile HDV-RNA varlığı ise gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real-Time PCR) yöntemi ile araştırılmıştır. Çalışmada 84 HBsAg pozitif örneğin 4'ü (%4.76) HDV antikorları yönünden pozitif bulunmuş, çalışılan örneklerin HDV-RNA varlığı saptanmamıştır.

Sonuç olarak HBsAg pozitifliği saptanan bireylerin aynı zamanda HDV enfeksiyonu yönünden de araştırılması uygun olacaktır. Bu vakalarda Anti-Delta antikorlarının saptanması her ne kadar güvenli bir tanı için yeterli olsa da, gerçek viremiyi göstermek için RT-PCR yöntemi ile HDV-RNA'nın saptanması gerekmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Hepatit Delta Virüsü, HDV RNA, HDV IgG, HDV IgM, Hepatit B Virüsü.

## ABSTRACT

In 1977, an Italian doctor named Mario Rizzetto discovered a new nuclear antigen in the liver cells of patients infected with Hepatitis B Virus (HBV). The antigen was thought to be a new protein encoded by HBV, and it was labeled as the delta antigen. Subsequent research on chimpanzees, however, indicated that this antigen was derived from a new virus, named the Hepatitis Delta Virus (HDV).

Approximately 15 million people are infected with HDV worldwide. Areas with the highest prevalence include southern Italy; North Africa; the Middle East; the Amazon Basin; and the American South Pacific islands of Samoa, Hauru, and Hiue. China, Japan, Taiwan, and Myanmar (formerly Burma) have a high prevalence of HBV infection but a low rate of HDV infection.

There are two types of HDV infection, co-infection ve super-infection. Knowing that HDV infection is present in a patient with HBV infection allows a more accurate prognosis. Moreover, patients with acute HDV infection are more likely to develop severe or fulminant Hepatitis

The presence of anti- HDV in serum also appears to be a reliable and specific way of diagnosing HDV infection. Anti- HDV can be detected by RIA and EIA for both IgG and IgM antibodies to HDV. Anti-HDV becomes detectable in more than 90%of cases within 1 to 2 months of acute HDV infection. Although the presence of anti-HDV may be a very useful screening test for HDV infection, it may not be totally reliable in immunosuppressed patients, who may not be able to mount an antibody response sufficient to be detected.

The gold standard of diagnosis of HDV infection is the detection of HDAg in the liver by immunostaining. However, HDAg staining is available only in research laboratories. HDV RNA is an early marker of acute infection and a useful marker of HDV replication in patients with chronic infection. In addition to diagnostic applications, levels of HDV RNA in serum may be useful for monitoring the effect of antiviral therapy.

The objective of this study was to evaluate the correlation between serum Hepatitis delta virus (HDV) RNA detection and anti-HDV IgG and IgM antibodies, in the serodiagnosis of delta Hepatitis. A total of 84 HBsAg positive sera were screened for the presence of, anti-HDV IgG and anti-HDV IgM by commercial enzyme immunoassays and HDV-RNA by Real time polymerase chain reaction (PCR). Of 84 sera, 4 (4.76%) were found positive for HDV antibodies. The presence of HDV-RNA in worked samples wasn't detection.

Consequently, it will be suitable that at the same time researching for HDV infection of individuals who have been determined positiveness of HBsAg. In these cases, Although determining of anti-Delta antibodies is adequate for a confident diagnosis, HDV-RNA need to determine via by using RT-PCR method that for true viremia has been showed.

**Key words:** Hepatitis Delta Virus, HDV RNA, Real Time PCR, Hepatitis B Virus.

## 1. GİRİŞ

Hepatit Delta Virüsü (HDV) 1970'li yıllarda Mario Rizzetto ve arkadaşları tarafından kronik karaciğer hastalığı bulunan Hepatit B'li hastaların karaciğerlerinde bir nükleer antijen olarak bulunmuştur. Bu antijen hiç bir zaman non-B Hepatitli hastaların karaciğer biyopsi örneklerinde bulunmadığı gibi, her B Hepatitli hastanın karaciğerinde de saptanamamıştır. Benzer şekilde bu hastaların sadece bir kısmında, bu yeni antijene karşı antikor geliştiği gösterilmiştir. Bu antijen, virolojik natürü bilinemediği için başlangıçta Delta antijeni olarak adlandırılmıştır (1). Fakat daha sonra şempanzeler üzerinde yapılan araştırmalarda, bu antijeni yeni bir virüsün kodladığı bulunmuş ve bu virüs Hepatit Delta Virüsü olarak adlandırılmıştır.

Dünyada iki milyar civarında insanın Hepatit B virüsü ile enfekte olduğu düşünülmektedir. Bu enfeksiyona yakalan kişilerin yaklaşık 350 milyonu kronik taşıyıcı durumundadır, Hepatit B enfeksiyonuna bağlı olarak dünyada 10 milyon kişinin HDV ile enfekte olduğu düşünülmektedir (2).

HDV enfeksiyonu, Akdeniz bölgesinde, Orta Doğu'da Afrika'nın bir bölümünde endemik olarak görülebilmektedir. Delta virus olarak adlandırılan Hepatit D virüsü (HDV), dört ayrı komponentten oluşmuş, 36 nm çapında, tek sarmallı defektif bir RNA virüsüdür. Heparnaviridea ailesi içinde bulunmaktadır. Çok yoğun sirküler genoma sahiptir. Taksonomik olarak satelatik grubunda yer alan HDV, çoğalmak için Hepatit B virüsüne gereksinim duyar (3,4).

Delta virüsünün hastalık yapabilmesi, HBV (Hepatit B virüsü) ile koenfeksiyon tarzında vücuda girmesi veya süregelen HBV enfeksiyonu üzerine delta virüsünün eklenmesi (süper enfeksiyonu) sonucu olur (5). Koenfeksiyon ve süperenfeksiyon ayırımında klinik ve laboratuvar tanısı olarak çok büyük farklılıklar yoktur. HDV koenfeksiyonlarda %3-10 ve süperenfeksiyonlar da %90 oranında kronikleşebilmektedir (6).

HDV tanısı için HBsAg ve anti-HDV tespiti yeterlidir. Fakat kesin tanı için moleküler yöntemler kullanılarak HDV-RNA'nın tespiti veya immünfloresan ve immunperoksidaz yöntemler kullanılarak karaciğer hücrelerinde HDV antijeninin varlığının tespiti yeterli olmaktadır. Anti-HDV IgM virüsle enfekte olduktan yaklaşık 1 ay sonra gösterilebilir ve 2-4 hafta içinde kaybolur (6).

HDV endemik açıdan baktığımız zaman dünyada düşük, orta ve yüksek bölgelere ayrılmaktadır. Ülkemiz de dahil olmak üzere Akdeniz ülkeleri orta endemik bölgede yer

almaktadır (2). Ülkemiz de yapılan epidemiyolojik çalışmalarda özellikle Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde HBV ile enfekte kişilerin yaklaşık %20'sinde delta süper enfeksiyonu olduğu göz önüne alındığında delta Hepatitin ülkemiz için önemli bir sağlık sorunu olduğu kabul edilmektedir (7).

Bu çalışmada KSÜ Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesinin çeşitli polikliniklerine başvuran Hepatit B yüzey antijeni pozitif bireylerde; HDV ELİSA (Anti-HDV IgM, Anti-HDV IgG) ve moleküler yöntemler (HDV RNA) kullanılarak araştırılması amaçlanmıştır.

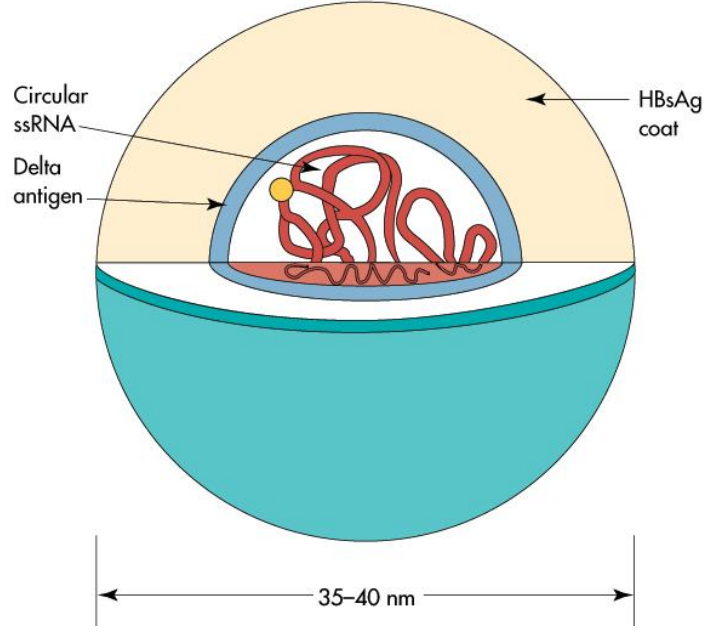
## **2. GENEL BİLGİLER**

HDV enfeksiyon yapabilmesi için Hepatit B virüsüne ihtiyaç duyan defektif bir RNA virüsüdür (8). Rizzetto ve arkadaşları HBV hastalarında yaptıkları çalmalarında bazı hastaların durumu diğer HBV hasta guruplarına göre daha şiddetli bir şekilde ilerlemekteydi, Rizzetto ve arkadaşları yaptıkları incelemelerde bu grupta HBsAg antijenin ile birlikte farklı bir antijen yer almaktaydı (1), araştırmacılar öncelikle delta antijeni olarak adlandır; bu antijen daha sonra başka bir enfeksiyon etkeni olduğu anlaşıldı ve Hepatit Delta Virüsü olarak adlandırıldı (9). HDV bazı özellikleri açısından bitki patojenlerin değişik sınıflarında yer alan viroidler, virusoidler ve satellite virüslere benzemektedir (8).

### **2.1. Viral yapı**

Hepatit delta virüsü 36 nm çapındaki boyutuyla, 22 nm çapında HBsAg ve 42 nm çapındaki HBV partikülünden farklıdır. HDV, HBV' ye benzemektedir, fakat HBV'nin 27 nm'lik nükleokapsidine karşın, HDV'nin nükleokapsidi 19 nm'dir ve nükleokapsid RNA ile bir fosfoprotein olan delta antijeninden meydana gelmektedir (10). Viral yapı şekil 1'de gösterilmiştir.

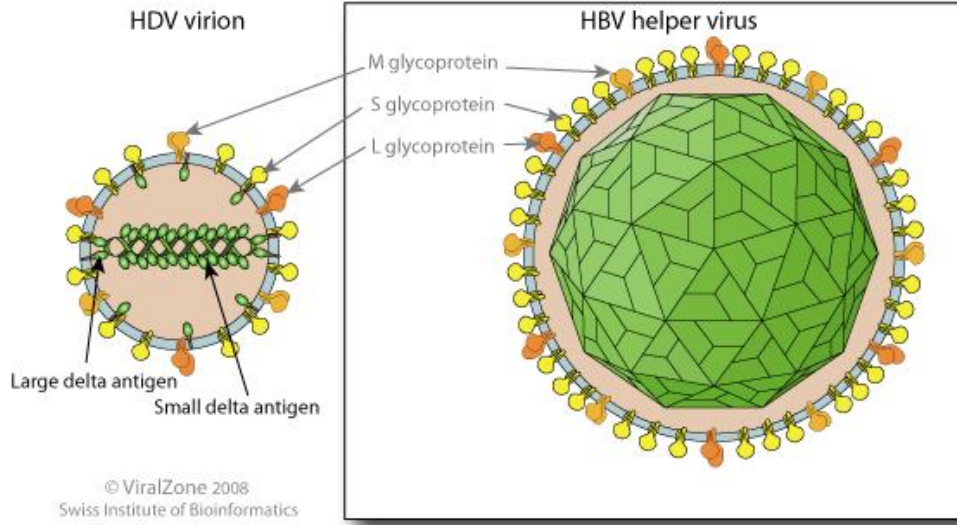




**Şekil 1.** Hepatit delta virüsün şematik yapısı (11).

### 2.1.1. Zarf Yapısı

Hepatit D virüsünün zarf yapısını oluşturan yüzey proteinleri HBV yüzey antijeni tarafından meydana gelir ve HBsAg'nin S, M ve L formlarını içerir. HBV'den kaynaklanan bu zarf; 1.7 kb tek iplikçikli HDV genomu ile beraber büyük delta antijeni (L-HDAg) ve küçük delta (S-HDAg) antijenlerinin 60 kopyasından oluşan 19 nm'lik bir nükleokapsidi çevreler, sonuç olarak HDV virion partikülleri 38 nm çaplı RNA genomu ve HDAg ile bunu çevreleyen HBsAg'den oluşmuş bir kılıfa sahiptir (12). HDV'nin zarf yapısı şekil 2' de gösterilmiştir.



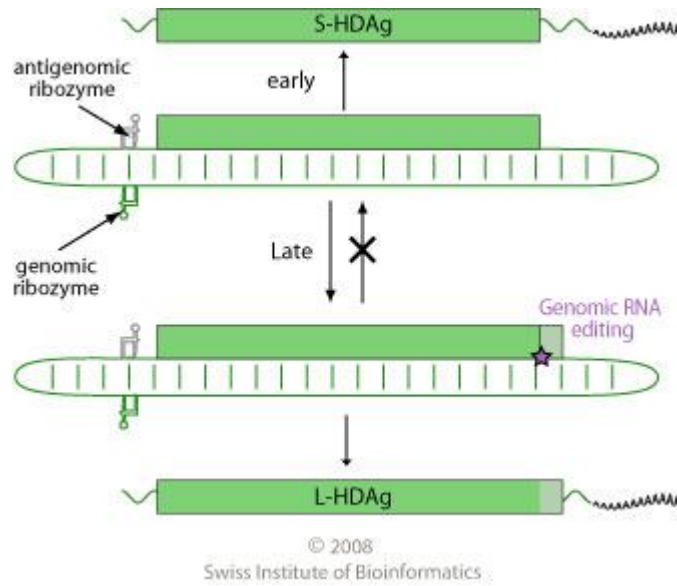
**Şekil 2.** Hepatit delta virüsün zarf yapısı

### 2.1.2. Genomik Yapı

HDV genomu, 1700 bp büyüklüğünde, negatif eğilimli, tek iplikli RNA içerir. Genomu daireseldir fakat G+C oranının yüksek olması (%60) ve intramoleküler baz çiftleşmelerinin yoğunluğu (%70) nedeniyle genom çomaksı bir yapıda bulunur. Denatüre olduğunda ise dairesel biçimine döner (13).

HDV genomundaki nükleik asit çeşitliliğine göre 3 farklı genotipe ayrılmaktadır. Bunlar genotip 1, genotip 2 ve genotip 3 şeklindedir. Dünyada en çok bulunan ve şiddetli patojen olan tip genotip 1' dir. Genotipler arasında hastalığın tedaviye karşılık vermesi ve hastalığın şiddeti arasında bir farklılık tespit edilememiştir. Genotip 2 Asya'da, Genotip 3 Güney Amerika'da tespit edilmiştir (14).

HDV genomunun çoğalma işlemi sadece hepatosit çekirdeklerinde gerçekleşmektedir. İnfekte hepatositlerin nükleusunda genomun yanı sıra tam bu genomu tamamlayacak komplementeri olan antijenomu bulunur. HDV'nin replikasyonu, ribozomik aktiveye ihtiyaç duyar, bu aktivasyonda Genomik RNA ve antijenom, spontan kırılma ve spontan bağlanma reaksiyonlarının gerçekleşmesi şeklinde olur (15). Ribozim bölgesi genomik RNA'da 680 ve 780 nükleotidleri arasında, antijenomik RNA'da ise genomik ribozim bölgesine komplementer olacak şekilde bulunur. Her RNA özgül olarak spontan kırılmanın olduğu tek bir bölgeye sahiptir. Genomik RNA'da spontan kırılma bölgesi 688-689 nükleotidlerinde G ve U arasındadır. Antijenomik RNA'da ise genomik RNA'ya komplementer olacak şekilde 903-904 nükleotidleri arasına yerleşmiştir (şekil 3). Genomik ve antijenomik RNA'larda kırılmanın olduğu bölgelerde spontan bağlanma reaksiyonları ortaya çıkmaktadır (4).



**Şekil 3.** HDV Genom yapısı.

### 2.1.3. Delta Antijeni (HDAg)

İnfekte tüm hücrelerde bulunan delta antijeni HDV'nin kodladığı tek proteindir. HDV delta antijeninin iki farklı formu bulunmaktadır. Antijenomik RNA'da bulunan tek ORF (open reading frame) tarafından HDAg'nin küçük (S-195 aa) ve büyük (L-214 aa) formları kodlanmaktadır (16).

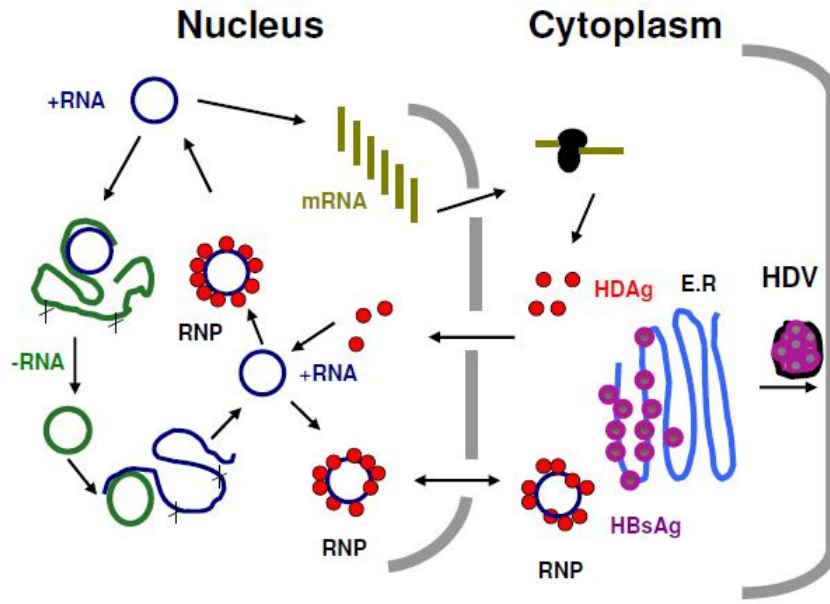
HDVAg' nin komponentleri olan SHDAg antijeni virüsün replikasyonu için gereklidir. HDVAg, diğer komplementeri olan LHDAg; replikasyonu baskılar ve HBsAg ile birlikte virionun bir araya gelmesini sağlar (17).

HDVAg, HDV RNA'ya yüksek bağlanma afiniteli, bir RNA bağlayıcı proteindir (RNA binding protein). HDAg-HDVRNA bağlanması HDV RNA'nın çomaksı yapısını gerektirir. Bu etkileşim çok kuvvetli olup yalnızca virion partiküllerinin yapısal organizasyonunda değil aynı zamanda RNA replikasyonunda da rol oynar. Enfekte hücrede, HDAg nükleusda yer almaktadır. Bu lokalizasyon replikasyondaki olası rolü ile uyumludur (18).

## 2.2. Hepatit D Virüsünün Replikasyonu

HDV hepatosit hücrelerine girebilmek için HBV'ye ait preS1 reseptörüne ihtiyaç duyar. Reseptöre tutunan HDV hücreye girer ve bunu zarfın soyulması izler. Delta antijeninin bünyesinde bulunan çekirdek yerleşim sinyali ile hücre çekirdeğine doğru ilerleme sağlanmaktadır (19). Virüs replikasyonu sırasında, enfekte hepatositlerde genomik RNA (negatif polariteli), antigenomik RNA (pozitif polariteli) ve HDAg sentezi için gerekli olan ORF'yi içeren messenger RNA olarak da bilinen antigenomik polariteli poliadenilat RNA olmak üzere 3 türde RNA meydana gelir (20). Çekirdek yerleşim sinyali ile çekirdeğe taşınan genom burada replike olmaktadır. Viral genom negatif meyillidir ve kalıp olarak kullanılarak mRNA'nın sentezini sağlar. Daha sonra bu mRNA'dan hem HDAg, hem de viral genom sentezlenir.

HDV birçok bitki virüsünün kullandığı "double rolling circle" modeli olarak bilinen yuvarlanan çift çember replikasyon mekanizmasını kullanmaktadır (21). Viral RNA replikasyon öncesi daireseldir ve bazların %70'i eşleşerek çomak şekline gelir. Bu çomak üzerinde replikasyonu başlatma, bitirme ve poliadenilasyon sinyali içeren özgül bölgeler bulunmaktadır (Sekil 4).



Şekil 4. HDV Replikasyonu (22).

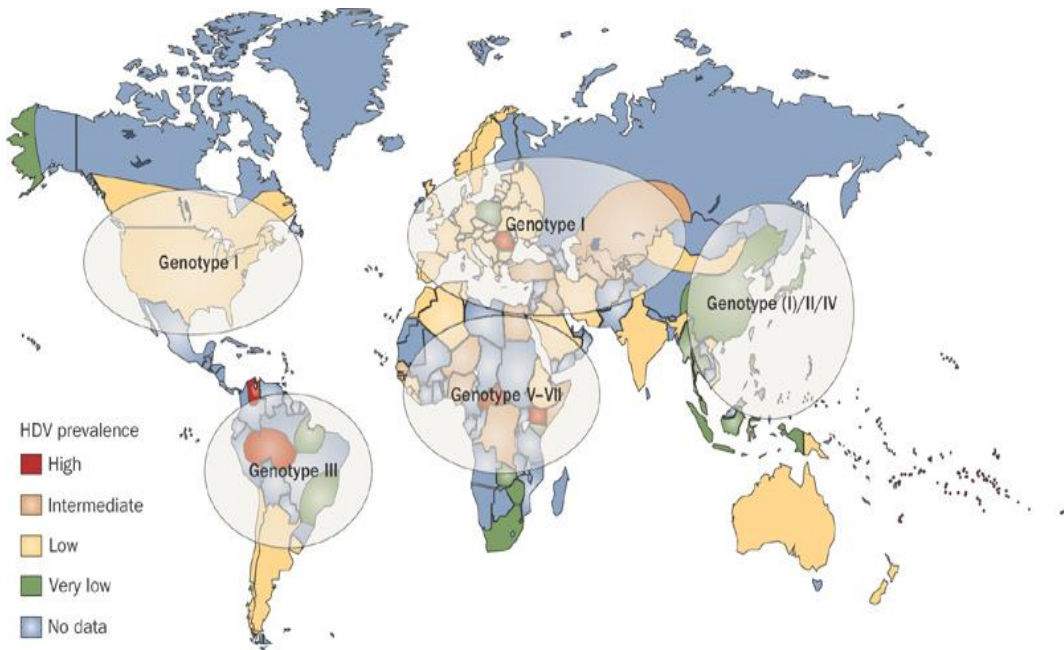
Aynı zamanda ribozim gibi işlev görebilen viral genom, replikasyonu başlatma bölgesinde kendi üzerine katlanarak 4 kollu bir yapı oluşturur. Bu kollardan biri enzim, bir diğeri substrat bağlanma bölgesi olarak işlev görerek replikasyonu sağlar. Replikasyon poliadenilasyon bölgesine geldiğinde sentezlenen zincir poliadenil kuyruğu kazanır ve sentez devam ederken ayrılır. Oluşan poliadenile, 800 bazlık mRNA HDsAg'nin sentezlenmesini sağlar. HDsAg'nini kodlayan mRNA'nın ayrılmasından sonra sentez devam eder ve 1,7 KB'lik bir zincir sentezlenir. Bu antigenom olarak da adlandırılan pozitif iplikçiktir. Antigenomun poliadenillenmesi ortamdaki HDsAg ve çomak benzeri yapısı nedeniyle engellenir. Antigenom sentezi ayrılma noktasında sonlanır ve iki ucundan kapanarak çembersel bir yapı oluşturur. Antigenom bu haliyle viral genom için kalıp olarak kullanılabilir. Viral genomun sentezi konak hücre çekirdeğinde ve hücresel RNA polimeraz II enzimi kullanılarak gerçekleşir. Bu sırada replikasyon döngüsü devam ederek yeni mRNA ve antigenom sentezi yapılır. HDsAg'i kodlayan mRNA iki tip protein sentezi yapar. Bunlar aynı kodondan sentezlenmeye başlayan büyük ve küçük HDsAg'leridir. Viral genom çekirdekte sentezlendikten sonra küçük (S) ve büyük (L) HDsAg ile birlikte paketlenir. Golgi aygıtından geçerek HBsAg kılıfını alır ve hücreden salınır. Virus çoğaldığı hücreye sitopatik ve sitostatik etki yapmaz (23).

### 2.3. Epidemiyoloji

HDV enfeksiyonu dünya genelinde yaklaşık 15 milyon insanın yakalandığı düşünülmektedir (24). HDV enfeksiyonu Hepatit B ve C' ye göre daha seyrek görülmesine rağmen mortalite ve morbiditesi daha yüksektir ve hastaların karaciğer sirozuna yakalanmaları daha hızlı ve daha sıktır. Yine hepatosellüler kanser insidansı yalnız Hepatit B enfeksiyonuna yakalanan hastalara göre daha fazladır (25).

HDV'nin asıl bulaşma yolu parentereldir ve özellikle de HDV koenfeksiyonu bu şekilde gelişmektedir. Seksüel bulaşma da olası yollardan biridir. Gelişmemiş veya az gelişmiş birçok ülkede ise parenteral bulaşma ihtimalinin az olmasına rağmen yüksek HDV oranları muhtemelen aile içi horizontal bulaşımı düşündürmektedir. Delta enfeksiyonu, IV uyuşturucu kullananlarda daha sık görülmekle beraber, HBV enfeksiyonu için geçerli olan tüm risk gruplarını etkileyebilir (26).

HDV prevalansının yüksek olduğu bölgeler İtalya, Doğu Avrupa'nın bazı bölgeleri, Amazon bölgesi, Venezüella, Kolombiya, bazı Pasifik adaları, Pakistan ve Batı Asya'yı içermektedir (27). Ayrıca Japonya'nın Okinowa adası, Çin'in bazı köyleri, Kuzey Hindistan ve Arnavutluk'un güney kesiminde de enfeksiyonun yeni bir tipi olduğu belirlenmiştir (28).



Şekil 5. HDV'nin dünya üzerinde yayılımı (29).

HDV süper enfeksiyonu çoğunlukla Akdeniz çevresinde ve gelişmiş ülkelerde, koenfeksiyonu ise gelişmemiş ülkelerde sık görülmektedir. HDV endemik bir enfeksiyon olmasına rağmen çocuklar ve genç erişkinlerde ani başlayan fulminan Hepatit şeklinde epidemilerine rastlanmaktadır. İntravenöz ilaç kullananlar ve hemodiyaliz hastalarında koenfeksiyon epidemileri rapor edilmiştir (30).

**Tablo 1.** HDV epidemiyolojisinde endemisite dağılımı (31).

Endemisite	Ülkeler	Anti-Delta	
		HBsAg taşıyıcıları	Kronik Hepatit B
Yüksek	Kenya, Nijerya, Amazon, Venezüella, Güney İtalya, Romanya, Kolombiya Akdeniz ülkeleri, Nijerya	>%20	>%60
Orta	Somali, Uganda, Türkiye Bazı Ortadoğu ülkeleri Batı Avrupa, Kuzey Amerika	%10-19	%30-60
Düşük	Avustralya, Güney Afrika, Etiyopya Uruguay, Şili, Arjantin,	%3-9	%10-25
Çok düşük	Peru, Doğu Amazon, Güney Brezilya	%0-2	%10

Ülkemizdeki ulusal HBV aşılama çalışmaları sonunda HBV kontrol çalışmalarına paralel olarak HDV prevalansında yıllar içinde azalma gözlenmektedir (32). Ökten ve arkadaşlarının çalışmaları da bu sonucu desteklemektedir. İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenterohepatoloji Bilim Dalı polikliniğinde yapılmış çalışmalarının verileri

değerlendirildiğinde 1991-1994, 1995-1997, 1998-2001 ve 2002- 2005 yılları arasındaki kronik Hepatitlerin sırasıyla %7.6, %5.1,%3 ve %4.8'ini HDV' ye bağlı Hepatitlerin oluşturduğu görülmektedir (33). Benzer biçimde 1994–2000 ve 2002-2005 yılları arasındaki HSK olgularının da sırasıyla %12 ve %6,8'inin HDV' ye bağlı karsinomlar olduğu dikkati çekmektedir. Dikkat edileceği üzere, yıllar içerisinde HDV' ye bağlı kronik Hepatit ve HSK prevalansında belirgin azalma mevcuttur. Ayrıca 2002-2005 yılları arasında tetkik ve tedavi edilen toplam 381 karaciğer sirozlu olgunun %18'ini HDV'ye bağlı karaciğer sirozlu hastalar oluşturmaktadır (32).

#### **2.4. Patogenez**

HDV'nin çoğalabildiği tek organ karaciğerdir. Karaciğerde hepatosellüler nekroz ve inflamasyonla kendini gösterir ve akut veya kronik Hepatite neden olur. Histolojik olarak diğer Hepatitlerden ayrılmayan bu tablo daha ağır olabilir (23).

Hepatit D'de immünopatogenezin çok önemli bir rol oynaması olasıdır. Akut HDV enfeksiyonu esnasında, hastalık geçici olarak gelişen immün yanıt ve aynı anda HDV seviyesindeki düşüş ile ilişkilidir. Kronik Hepatit D'deki klasik nekroinflamatuvar hastalığın varlığı da immünopatogenezin majör rolü ile uyumludur. Buna karşın, Hepatit D'de immünopatogenezin HBV antijenlerine, HDAg' ye veya her ikisine birden karşı oluşan bir yanıt ile olup olmadığı halen açıklanamamıştır. Transplantasyonlar esnasında elde edilen deneyimler, karaciğerde HBV antijenlerinin yeniden ortaya çıkışına kadar nekroinflamasyon bulunmaması, HBV-ilişkili immünopatogenezin daha etkin olduğunu göstermektedir (33).

HDV enfeksiyonunun patogenezi tam olarak açıklanamamıştır. HDV'nin direk sitopatik etkili olduğunu bildiren çalışmalar vardır. HDV'nin küçük ve büyük proteinlerinin deneysel modellerde infekte hücrelerdeki ekspresyonu, büyüme potansiyelini azaltmış veya toksisiteye neden olmuştur. Küçük proteininin avian hücrelerinde eksprese olduğunda ise anlamlı olarak apoptozu indüklediği gösterilmiştir. Bununla birlikte HDV ile infekte insanların hepatositlerinde, transgenik fare modellerinde ve sadece Delta antijeni eksprese eden dokularda HDV varlığına rağmen karaciğer hasarı saptanmadığını dolayısıyla sitopatik olmadığını bildiren çalışmalar da mevcuttur (34,35). Buna karşılık daha sık olarak delta Hepatit enfeksiyonuna nekroinflamasyon eşlik etmektedir ki bu durumda delta Hepatit'e bağlı Hepatit gelişiminde immün sistemin rolünü düşündürmektedir. Kronik Hepatit delta enfeksiyonuna çeşitli otoantikolar eşlik edebilmektedir, bunlardan en spesifikleri 'liver-kidney' antikorlarının (LKM antikorları, tip 3)



eşlik ettiği kronik delta Hepatitlerdir. LKM ve diğer otoantikörlerin kronik delta Hepatitindeki patogenetik rolleri ise bilinmemektedir (36).

HDV antijenlerini kodlayan dizilerdeki özellikle B ve T hücre epitoplardaki genetik rekombinasyon virüsün evolüsyonunda ve farklılaşmasında önemli rol oynamaktadır. Nitekim akut alevlenme sonrası S-HDAg'nin B hücre epitoplarında aminoasit değişiklikleri sonucu meydana gelmiş yeni dominant epitoplar saptanmıştır. Bu değişiklikler sonucu konağın immün yanıtından kaçmasını sağlayan kaçak mutasyonlar meydana gelebileceği bildirilmiştir. Ayrıca birçok persistan viral enfeksiyonda saptanmış defektif virüsler, kronik HDV enfeksiyonlu hastalarda da saptanmıştır. Bu parametrelerin HDV'nin patogenezinde ve kronikleşmesinde etkili olduğu düşünülmektedir (37).

## **2.5. Laboratuvar Tanısı**

HDV'nin tanısı, karaciğer biyopsi örneklerinde direk immüno Floresans yada immünoperoksidaz yöntemleriyle veya serumda RIA ya da EIA yöntemleriyle viral antijenin (HDAg) gösterilmesi esasına dayanır. Fakat çok daha pratik olması ve invazif girişim gerektirmemesi açısından yaygın olarak kullanılan yöntem, serumda anti-HDV total, IgG ve IgM antikörlerinin EIA yöntemi ile saptanmasıdır (38).

Kronik HDV enfeksiyonunun tanısı için serolojik ve virolojik testlerden faydalanılır. Serum HDV-RNA ilk olarak pozitifleşen testtir. PCR ile tespiti akut enfeksiyonun yanı sıra devam eden HDV enfeksiyonunun da en iyi göstergesidir. Sensitivitesi 10-100 kopya/mL dolaylarındadır. Laboratuvar uygulamasında genetik heterojenite nedeniyle en çok korunan bölge olan HDAg geninin C-terminaline spesifik primer kullanılmaktadır. Ayrıca, hibridizasyona göre 10 kat daha duyarlı olan RT-PCR'de kullanılmakta olup, en güvenilir yöntem olma özelliğine sahiptir (5). Buna göre PCR'nin, northern blot hibridizasyon yöntemine göre 10.000 kat daha duyarlı bir yöntem olduğu rapor edilmiştir (39).

Serumda anti-delta antikörleri, IgG ve IgM sınıfı anti-HDV antikörlerinden oluşur. Primer HDV enfeksiyonunu göstermede en önemli tanı yöntemidir. Anti-delta IgM akut enfeksiyonu takiben bir ay içerisinde serumda RIA ve ELISA yöntemleri ile saptanabilmektedir. Daha sonra anti-delta IgG ortaya çıkar ve en az altı ay pozitif kalır. Kronikleşme durumunda yüksek titrede total anti-HDV (çoğunluğu anti-delta IgG) varlığı mevcuttur. HDVAg, geç inkübasyon ve erken prodromal dönemde serumda kısa sürede saptanabilir. Dokuda immüno Floresan veya immünperoksidaz boyama yöntemleri kullanılarak tespit edilebilmektedir. HDVAg ayrıca, serumda ELISA ve RIA yöntemleriyle

incelenebilir. Ancak serumda HDV' ye karşı gelişen yüksek antikor titresine bağlı immünkompleks halinde antijen sekestrasyonu nedeniyle sağlıklı ve tam sonuç alınamamaktadır. Serum örneğindeki antikordan etkilenmeyen immünblot yöntemiyle HDVAg direk olarak tespit edilebilir. HDVAg, en güvenilir yöntemdir.

Total anti-HDV titresinin EIA ve RIA ile 1/100 üzerinde pozitif olması kronik delta Hepatitini düşündürmelidir (5).

**Tablo 2. HDV enfeksiyonu tanısında serolojik ve histolojik belirteçler (40).**

<b>BELİRTEÇ</b>	<b>YÖNTEM</b>	<b>ÖZELLİK</b>
<b>SERUM</b>		
Total anti-HDV	Immunoassay	Koenfeksiyon ve süperenfeksiyonda pozitif aktif enfeksiyonda titresini yüksek
IgM anti HDV	Immunoassay	Akut ve kronik enfeksiyonda pozitif aktif enfeksiyonda titresini yüksek
HDV RNA	Northern Blot	Aktif HDV replikasyonunu bildirir
	RT-PCR	En duyarlı test 10-100 kopya
HDAg	Immunoassay	Kronik enfeksiyonda immün kompleks ile maskelenir
	Western Blot	Aktif HDV replikasyonunu bildirir, araştırma amaçlı kullanılır
HBsAg	Immunoassay	Genellikle pozitif
IgM anti-HBc	Immunoassay	Koenfeksiyonda pozitif
<b>KARACİĞER</b>		
HDV RNA	Nothern Blot	Aktif replikasyonu bildirir, araştırma amaçlı kullanılır
HDAg	Western Blot	Aktif replikasyonu bildirir, araştırma amaçlı kullanılır
	İmmuno-staining	Aktif replikasyonu bildirir, klasik standarttır

Anti-HDV IgM etkenin alınmasından sonra 1 ay içinde serumda RIA veya ELISA ile saptanabilir. 2-4 hafta içinde kaybolur ve anti-HDV IgG antikorları ortaya çıkar. IgG, 6 ay pozitifliğini korur. IgM türü antikorların devamı kronik enfeksiyona geçişin işaretidir.

Moleküler yöntemlerle viremi esnasında HDV RNA saptamak mümkündür. Bu değerli bir göstergedir ve HDVAg ile genellikle paralellik gösterir. Anti HBc IgM ve anti-Delta antikorlarının birlikte gösterilmesi koenfeksiyon tanısını koydurur. Ancak Süperenfeksiyon tablosunda HBsAg'i HDVAg ve HDV RNA'sı ile birlikte dir. Anti-Delta, anti-HDV IgM ve anti-HDV IgG antikorları da pozitif olarak saptanır (41). HDV serolojisi ve yorumları ile ilgili ayrıntılı bilgi tablo 3'te verilmiştir.

**Tablo 3. HDV'nin serolojisi ve moleküler sonuçlarının değerlendirilmesi (42)**

KLİNİK	HBsAg	AntiHBcIgM	HDVAg	HDV RNA	AntiHDVIgM	Total HDV	YORUM
Akut Hepatit	+/-	+	+	+	+	+	Koenfeksiyon
Akut Hepatit	+	-	+	+	+	+	Süperenfeksiyon
Kronik Hepatit	+	-	+/-	+	+	+	Kronik HBV-HDV

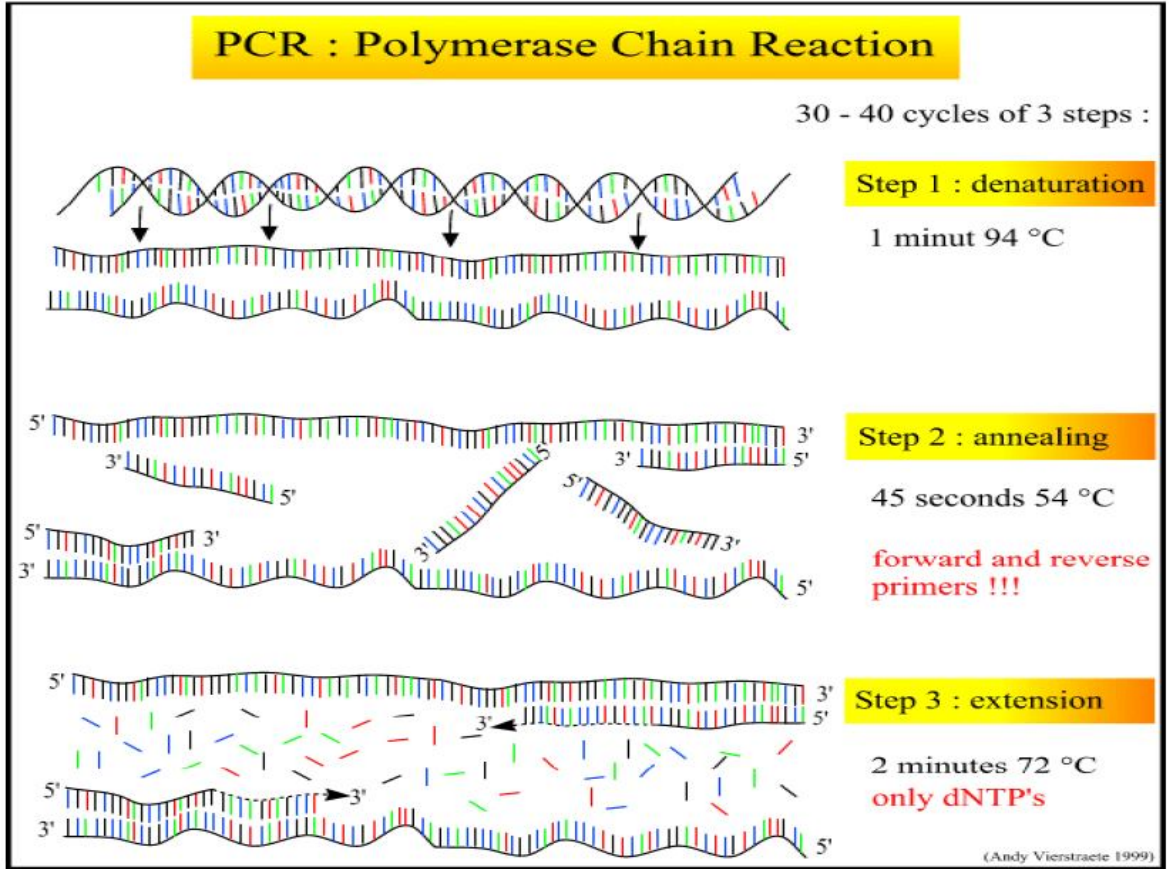
Akut veya kronik HDV enfeksiyonunda immunoblot yöntemi ile hasta serumunda HDAg saptanabilir ve bu yöntem enzim immünassay'den daha duyarlıdır. HDAg'nin Western Blot ile analizinde viral proteinler izole edilir ve poliakrilamid jel elektroforezi yapılır, ardından nitroselüloz membrana aktarılır. Nitroselüloz membranda HDAg, anti-HDV primer-antikor ile reaksiyon verebilir, daha sonra immuno-peroksidaz ya da kemilüminesans bir ajan ile işaretli sekonder bir antikor bu yapıya bağlanır ve HDAg renk değişimi veya ışımaya ile membranda belirlenebilir. Bu yöntem kullanılarak kronik Hepatit D hastalarının %70'inde HDAg'nin saptanabildiği bildirilmiştir (38).

Özet olarak HDV enfeksiyonlarının tanısında belli başlı 4 yöntem kullanılır bunlar şöyle sıralanabilir:

- Serumda Hepatit Delta antijenine karşı gelişen antikorların saptanması.
- Serumda HDV RNA'nın moleküler yöntemler ile gösterilmesi.
- Fikse karaciğer dokusunda direkt in-situ hibridizasyon yöntemiyle HDV RNA'nın saptanması.
- Biyopsi ile alınan karaciğer dokusunda immunohistokimyasal teknikler kullanılarak Hepatit Delta antijeninin gösterilmesi (43).

### 2.5.1. PCR (Polimeraz zincir reaksiyonu)

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), dizisi bilinen bir DNA bölgesinin in vitro olarak çoğaltılmasını sağlayan ve DNA molekülünün milyonlarca, hatta milyarlarca kopyasını kısa zamanda yapmaya olanak sağlayan bir yöntemdir. Polimeraz zincir reaksiyonunu Kary Mullis bulmuştur ve bu sayede 1993 yılında Nobel Kimya Ödülü'nü kazanmıştır. PCR'nin prensibi tekrarlanan üç basamağa dayanır (44) (Şekil 6).



Şekil 6. PCR çalışma prensibi

### **A. Denatürasyon**

Bu basamakta PCR reaksiyonu içinde yer alan çift zincirli kalıp DNA'nın birbirinden ayrılması sağlanır. Genelde 94-95°C'de 0.5-2 dakika denatürasyon yeterlidir. Alternatif olarak denatürasyonu kolaylaştırmak için reaksiyona gliserol, dimetilsülfoksid (DMSO) ve formamid gibi kimyasallar eklenebilir.

### **B. Primerlerin bağlanması (annealing)**

Bu basamakta birbirinden ayrılmış DNA zincirlerine primerlerin 55-60°C'de bağlanması gerçekleştirilir. Optimal "annealing" sıcaklığı T<sub>m</sub> (melting temperature) derecesinden 5°C daha düşüktür. 0.5-2 dakika "annealing" için yeterlidir. Eğer spesifik olmayan PCR ürünleri elde ediliyorsa her defasında "annealing" derecesi 1-2°C artırılarak optimize edilebilir.

### **C. Zincir uzaması polimerizasyon (extention):**

Zincir uzaması taq DNA polimerazın aktivitesinin en yüksek olduğu 70-75°C arasında gerçekleştirilir. 2 kb'ye kadar olan PCR ürünlerinin oluşturulması için bir dakika süre yeterlidir. Daha uzun DNA fragmanlarının çoğaltılabilmesi için bu süreye her kb için bir dakika eklenmelidir.

**Döngü sayısı:** Kalıp DNA miktarı 10 kopyadan az ise 40 döngü uygulanabilir. DNA miktarının yüksek olduğu durumlarda 25-35 döngü arası seçilmelidir (44).

## **2.5.2 Real time PCR**

Real time PCR, nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresan sinyalin ölçülmesiyle template miktarını kısa surede, kantitatif olarak saptayan spesifik, duyarlı bir PCR yöntemidir. PCR'in her döngüsünde, reaksiyon sırasındaki amplicon üretimini, floresan yayılımını indiktor kullanarak görüntüler. Real time PCR kantitasyonu, "in house" PCR' da ürünü görüntülemek için uygulanan PCR sonrası işlemleri ortadan kaldırır (şekil 7). Bu da daha duyarlı sonuçların elde edilmesine olanak sağlarken, aynı zamanda kontaminasyon riskini azaltır ve potansiyel hata kaynağı olan PCR sonrası işlemleri elimine eder (45).

Gerçek zamanlı PCR'ı klasik PCR'dan ayıran en önemli özellik, nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresans sinyalinin ölçülmesiyle kantitatif sonuç alınması ve viremiyi göstermesi spesifik tedavi seçeneğine olanak sağlamaktadır. Aynı zamanda hızlı tanı sağlanması ve tüpler açılmadan testin tamamlanması nedeniyle kontaminasyon riskini azaltan ve yanlış pozitif sonuçların ortaya çıkmasını engelleyen bir yöntemdir (46).

## 2.6. Klinik

HDV enfeksiyonu klinik seyri açısından değişkindir, ancak diğer viral Hepatitlerle karşılaştırdığımızda, genellikle daha şiddetli olduğu görülmektedir. Pre-ikterik dönem; 2-12 hafta arasında değişen inkübasyon döneminden sonra başlamakta, iştahsızlık, halsizlik, letarji, bulantı gibi nonspesifik klinik belirtiler içermekte ve üç-yedi gün devan etmektedir. Pre-ikterik dönemde Hepatit göstergesi olarak değerlendirilen biyokimyasal testlerde bazı değerler (ALT ve AST gibi) artmaktadır. Viral replikasyon genellikle bu dönemde azalmaktadır (47,48,49).

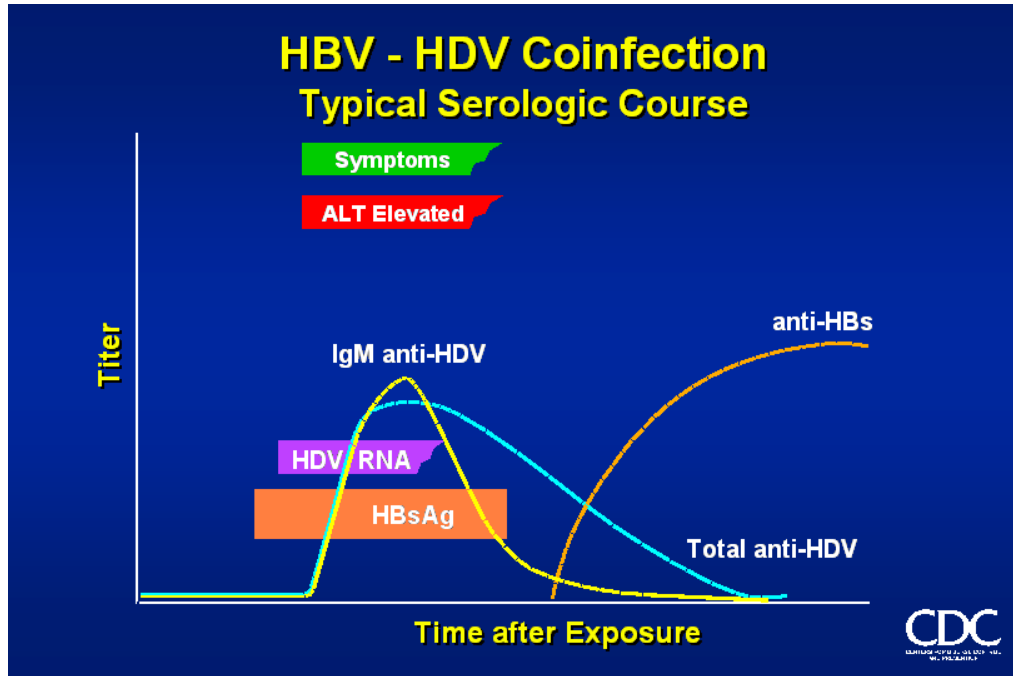
İkterik dönemin başlangıcında sarılık görülebilir. Hastada bulantı ve halsizlik devam etmektedir. Serumda bilirubin seviyesi yükselir. Karaciğerin bilirubini konjuge edebilme ve atabilme kabiliyetinin azalmasının bir belirtisi olarak aynı dönemde kil rengine de dışkı ve koyu idrar görülür. Klinik hastalığın daha ağır durumunda viral replikasyonun belirteçlerinin düzeyinde bir miktar azalma olduğu görülür. Akut, kendi kendisini sınırlayan enfeksiyonlu hastalarda klinik semptomların azalmasıyla konvelasan dönem başlamaktadır. İştahsızlık ve bulantı nispeten erken dönemde görülür, ancak halsizlik ve letarji aylarca kalıcı olabilir. Akut viral Hepatitin nadir bir sonucu olarak fulminant Hepatit, akut hastalığın daha ağır formu olup viral Hepatitin diğer tiplerine göre tip D Hepatitte yaklaşık 10 kat fazla görülmektedir. Bu formda konsantrasyon güçlüğü, konfüzyon, uykuya eğilim, kişilik değişikliği gibi Hepatit ensefalopati bulguları, ağır olgularda ise anormal davranışlar, somnolans ve koma izlenir. Sarılık çok ileri düzeyde olabilir. Serum ALT ve AST değerleri, masif hepatik nekroz sonucu canlı hepatositlerin azalmasına bağlı olarak düşebilir. Fulminant Hepatitte mortalite, yaklaşık %80'dir. Fulminant Hepatit, ortotopik karaciğer transplantasyonu için bir indikasyondur. Kronik viral Hepatit, Hepatit D hastalığının sık bir sonucudur. Semptomlar, sıklıkla daha hafif olmak üzere, akut Hepatit tablosundaki gibidir. Serum ALT ve AST düzeyleri yükselmiştir. Ancak serum bilirubin ve albumin düzeyleri ile protrombin zamanı normaldir. Kronik tip D Hepatitli hastaların yaklaşık %60-70' inde siroz gelişir. Bu oran, tip B ve C Hepatitlerindeki siroz gelişimine göre yaklaşık üç kat daha yüksektir. Hastaların büyük çoğunluğu siroz ve karaciğer yetmezliğinden kaybedilir (47).

Enfeksiyonun üç klinik formu tanımlanmıştır:

1. Akut HDV koenfeksiyonu: HBV ve HDV'nin aynı anda alınması ile gelişen enfeksiyon olup %5 kronikleşir.
2. Akut HDV süperenfeksiyonu: Kronik HBsAg taşıyıcılarında HDV'nin sonradan alınmasıyla oluşup %70 kronikleşir.
3. Kronik HDV enfeksiyonu: Altta yatan HBV enfeksiyonu genellikle inaktif olup, anti-HDV titresi yüksektir. %60-70 siroz gelişir (50,51).

### 2.6.1. Koenfeksiyon

Akut Hepatit B'den doruk aminotransferaz yüksekliğinin bifazik olması ile ayırt edilebilir. Koenfeksiyonda Hepatit B virüsü geçici bir süre kanda bulunur; delta virüsü de bu duruma eşlik eder. Bu nedenle kronikleşme istisnadır. Genelde akut delta koenfeksiyonu karaciğerde bir sekel bırakmaksızın şifa ile düzelir. Buna karşılık delta koenfeksiyonunda fulminan Hepatit gelişme riski tek başına akut Hepatit B'ye göre fazladır (36), (Şekil 8).

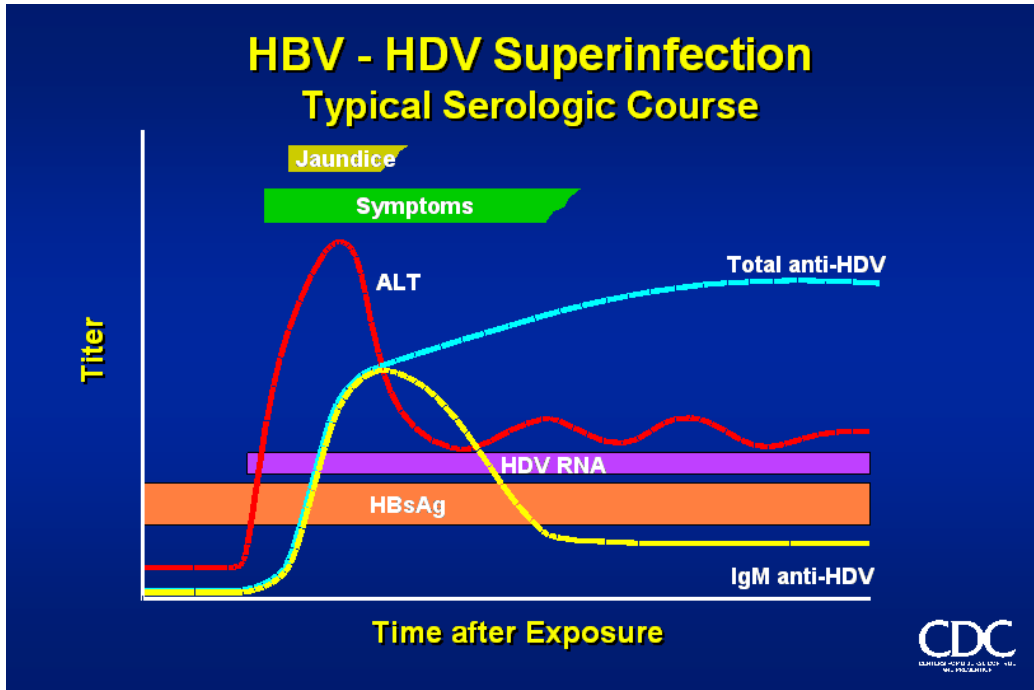


Şekil 7. HBV-HDV koenfeksiyonunun serolojik bulguları

### 2.6.2. Süperenfeksiyon

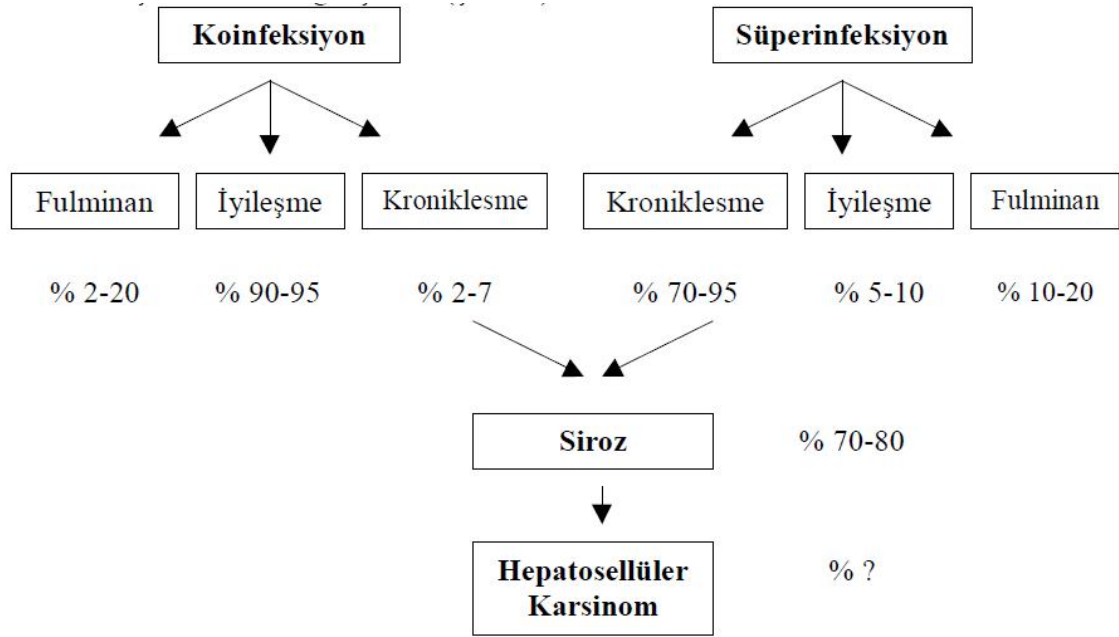
Hastaların en az %90'ında kronik Hepatit'e ve siroza gidiş vardır. Nadiren delta Hepatiti süperenfeksiyonu kronikleşmez ve HDV ve Hepatit B virüsü atılır. Kronik delta Hepatit'i klinik olarak diğer kronik viral Hepatit'lerden ayırdedilemez, yani kronik delta Hepatit'in klinik özellikleri non-spesifiktir. Bununla birlikte kronik delta Hepatit şu durumlarda akla gelmelidir:

- anti HBe (+), HBV DNA (-) kronik B Hepatit;
- Hepatit B enfeksiyonlu bir hastada gözlenen hastalık aktivasyonu;
- hızlı seyreden, kısa surede siroz gelişen Hepatit B vakaları (52), (Şekil 9).



Şekil 8. HBV-HDV Süperenfeksiyon serolojik bulguları





**Şekil 9.** HDV Enfeksiyonunda Klinik Gelişim (53)

Kronik viral Hepatit, HDV enfeksiyonunun en sık görülen klinik şeklidir. Süperenfeksiyon sonrası hastalarda sıklıkla kronik HDV enfeksiyonu gelişir. Diğer kronik Hepatitlerin aksine, genellikle klinik olarak belirgin bir akut enfeksiyonla birlikte başlar. Semptomlar akut Hepatitte görülenlere benzerdir, ancak daha hafif seyreder. Serum ALT ve AST düzeyleri yüksektir, ancak siroz gelişiminden önce serum bilirubin ve albumin düzeyi ile protrombin zamanı normal olabilir. Kronik delta Hepatitine özgü spesifik bulgu yoktur. Hastalarda sıklıkla halsizlik, yorgunluk, eklem ağrısı ve sağ hipokondriumda karın ağrısı yakınmalarına rastlanır (54).

## 2.7. Tedavi ve korunma

HDV enfeksiyonunun etkili bir tedavisi yoktur. Kronik delta Hepatiti'nin hızlı seyri ve virüsün benzersiz yapısı, antiviral tedavi seçenekleri zora sokmaktadır. HDV'nin, Hepatit B virüsünün yardımcı fonksiyonunun varlığında enfeksiyon yapabildiğinden, HBV'ye dönük tedavi rejimlerinin yararlı olabileceği düşünülebilir (55).

HDV enfeksiyonu genelde daha ağır karaciğer hastalığı tabloları ile karşımıza çıkmasına rağmen tedavi olanaklarının son derece sınırlı olduğu bir hastalıktır. Önceki dönemlerde denenmiş olan steroid + azathiopirine kombinasyonu ve Ribavirin etkili bulunmamıştır. Acyclovir'in etkili olmadığı gösterilmiş, bunun da ötesinde hepatositlerde HDV replikasyonunu artırdığı şeklinde paradoksal bulgularla dahi karşılaşılmıştır. Kronik Delta Hepatiti tedavisindeki ümit verici ilk sonuçlar, interferon-a kullanımına ilişkin çalışmalardan elde edilmiştir ve bu gün için geçerli olan tek tedavi alternatifi olma özelliğini korumaktadır (56).

Hepatit D Virüsü enfeksiyonunun, diğer viral hastalıkların çoğunda olduğu gibi radikal tedavisi olmadığından korunma ön plandadır. İyi bir korunma için hastalığın epidemiyolojisinin iyi bilinmesi gereklidir (57). Korunma genel olarak HBV enfeksiyonu gibidir. Sağlıklı insanlar veya HBV'li hasta yakınlarının HDV enfeksiyonuna karşı korunmalarında en etkili ve kesin yöntem HBV aşısıdır. Bu nedenle aşı endikasyonu olan bütün hedef gruplar, özellikle HBV'li hasta eşleri, aile üyeleri ve temas ettiği yakınları muhtemel HDV süperenfeksiyonuna karşı aşılanmalıdır (31).

### **3. MATERYAL VE METOD**

Çalışmamızda 2010 yılı içerisinde KSÜ Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesinin çeşitli polikliniklerine başvuran, Hepatit B yüzey antijeni (HBsAg) pozitif 84 bireyde, KSÜ Araştırma ve Uygulama Hastanesi İmmünoloji Labortuarında, HDV varlığının ELİSA yöntemiyle Anti-HDV IgM, Anti-HDV IgG çalışıldı ve hasta örneklerinin tamamına KSÜ Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Mikrobiyoloji AD. PCR Laboratuvarında moleküler yöntem ile HDV RNA çalışılarak sonuçları yorumlandı.

#### **3.1. Anti- HDV IgM Delta Antikorlarının Araştırılması**

Total anti-Delta antikorunu, KSÜ Araştırma ve Uygulama Hastanesi İmmünoloji Laboratuvarında, EIA (Enzim İmmünasay ) yöntemi kullanılarak (Radim Via del Mare, 125-00040 Pomazia (Roma) İtalia ) kiti ile çalışıldı. Radim Anti- HDV IgM, rekabete dayalı bir EIA testidir.

HDAg ile kaplı kuyucuklara serum örnekleri eklenir. Örneklerde anti-Delta antikorlarının bulunması durumunda kuyucuklardaki HDAg'lere bağlanır. Daha sonra

eklenen konjugatlı anti-Delta antikoru serbest kalır ve yıkamayla uzaklaştırılır. Test edilen örnekler anti-Delta antikoru içermediğinde ise HDAg'ler konjugatlı anti-Delta antikoruyla bağlanarak kuyucuklar mavi/yeşil bir renk alır. Reaksiyon sülfürik asit ile durdurulduğunda bu renk turuncuya döner. Anti-Delta antikoru pozitif örneklerde konjugat bağlanımı söz konusu olmadığından mavi renk oluşumu yoktur. Bu durumda sülfürik asit eklendiğinde sarı renk oluşur.

**Kit içeriği:**

1. HDAg ile kaplı kuyucukların yer aldığı plak
2. Sample dilüent
3. Negatif ve pozitif kontroller
4. Konjugat
5. Konsantre ve dilüent substrat
6. Yıkama ve stop solüsyonu

**3.1.1 Anti- HDV IgG Delta Antikorlarının Araştırılması**

Anti-Delta IgG antikoru, KSÜ Araştırma ve Uygulama Hastanesi İmmünoloji Laboratuvarında, EIA (Enzim İmmün asay ) yöntemi kullanılarak ( Radim Via del Mare, 125-00040 Pomazia (Roma) İtalia ) kitiyle çalışıldı.

Radim anti-HDV IgG, rekabete dayalı bir EIA testidir. HDAg ile kaplı kuyucuklara serum örnekleri eklendi. Örneklerde anti-Delta antikoru bulunması durumunda kuyucuklardaki HDAg'lere bağlandı. Daha sonra eklenen konjugatlı anti-Delta antikoru serbest kaldı ve yıkamayla uzaklaştırıldı. Test edilen örnekler anti-Delta antikoru içermediğinde ise HDAg'ler konjugatlı anti-Delta antikoruyla bağlanarak kuyucuklar mavi/yeşil bir renk aldı. Reaksiyon sülfürik asit ile durdurulduğunda bu renk turuncuya döndü. Anti-Delta antikoru pozitif örneklerde konjugat bağlanımı söz konusu olmadığından mavi renk oluşumu gözlenmedi. Bu durumda sülfürik asit eklendiğinde sarı renk oluşumu gözlemlendi.

**Kit içeriği:**

1. HDAG ile kaplı kuyucukların yer aldığı plak
2. Sample dilüent
3. Negatif ve pozitif kontroller
4. Konjugat
5. Konsantre ve dilüent substrat
6. Yıkama ve stop solüsyonu

**3.2. HDV RNA'nın Araştırılması**

KSÜ Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Mikrobiyoloji AD. PCR Laboratuvarında HDV-RNA varlığı ise Real-Time PCR (Rotor-Gene Q, QIAGEN in Duesseldorf, Germany) yöntemi ile araştırıldı.

Başlangıç miktarına göre oluşan, son PCR ürününün kantitasyonunun özgün olduğu, hassas ve diğer metodlara göre daha kolay tespit edilebildiği bir yöntemdir. Real-time PCR de oluşan fragmentin uzunluğu araştırılmaz, böylelikle DNA ve cDNA ayrımı yapılmaz.

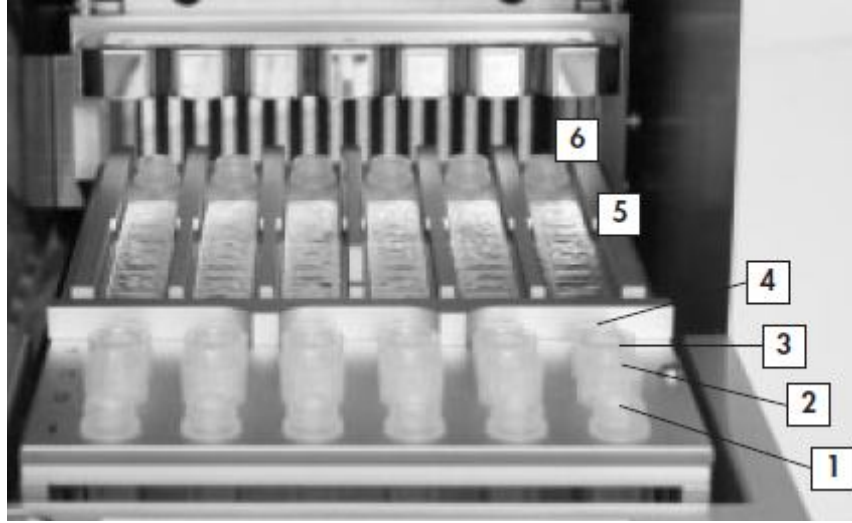
Real-time PCR bizi klasik PCR sonrası yapılması zorunlu jel elektroforez gibi diğer değerlendirme çalışmalarından kurtarır. Real-time PCR sisteminin temelini floresan taşıyıcı moleküllerinin ışınlarının tespiti ve miktarının belirlenmesi sistemine dayanır. Sinyal artışı PCR ürününün artışıyla direk orantılıdır. DNA amplifikasyonunu belirlemek için değişik floresan sistemler kullanılır (58).

**3.2.1. HDV RNA Ekstraksiyonu (EZ1 Virus Mini Kit v2.0)**

HDV RNA çalışılacak 84 hastanın dondurulmuş kan numuneleri oda ısısına getirilerek çalıştırılmaya hazır hale getirildi.

### 3.2.2. EZ1 Virus Mini Kit v2.0 kit içeriği

- Reagent Cartridges, Virus Mini v2.0
- Disposable Tip Holders
- Disposable Filter-Tips
- Sample Tubes (2 ml)
- Elution Tubes (1.5 ml)
- Carrier RNA
- Buffer AVE
- Q-Card



**Şekil 10.** Çalışma düzeneği (59)

1. İlk sıra: EZ1 Virüs protokolde, elüsyon tüpleri (1,5 ml) yüklendi.
2. İkinci sıra: EZ1 Virüs protokolde, filtrelipipet uçları konuldu.
3. Üçüncü sıra: EZ1 Virüs protokolde, tüpler (1,5 ml) taşıyıcı RNA ve iç kontrol (kullanılıyorsa) içeren tampon AVE burada yüklendi.
4. Dördüncü sıra: EZ1 Virüs protokolde, numune tüpleri (2 ml) yüklendi.

5. Reaktif kartuşu: kartuş raf yüklendi.

Her numune için 3,6 mikrolitre çözünmüş taşıyıcı RNA içeren 60 mikrolitre çözelti hazırlayarak 1.5 ml tüp içerisine konulduktan sonra makinada üçüncü sıraya yerleştirildi, oda ısısına gelen numuneler 400 mikrolitre 2 ml numune tüpleri içine kondu ve makinada dördüncü sıraya yerleştirildi ve makine çalıştırıldı. İşlem bittikten sonra elusyon tüplerinde HDV RNA ekstraksiyonu gerçekleşmiş oldu. Sonuçta saflaştırılmış, yüksek kaliteli viral nükleik asit elde edildi.

### **3.2.3. Kantitatif HDV RNA Amplifikasyonu (Real-Time PCR)**

#### **3.2.3.1 Kitlerin ve Çalışılacak Numunelerin Hazırlanması**

Kit İçeriği:

- HDV özel primer/probe mix (Kahve renkli kutu)
- HDV pozitif kontrol örneği (Kırmızı renkli kutu)
- HDV RT primer mix (Yeşil renkli kutu)
- Internal extraction kontrol RNA (mavi renkli kutu)
- Internal extraction control primer/probe mix
- endojen ACTB primer/probe mix
- Internal extraction kontrol/HDV/ACTB RT primer mix
- RNase / DNAz ,(Susuz)

Sulandırma Protokolü:

Liyofilize şeklinde gelen kitler aşağıda verilen miktarlar uygun şekilde sulandırılarak kullanıma hazırlandı.

1. HDV Primer/Probe mix 165 µl
2. Internal extraction control primer/probe mix 165 µl
3. Internal extraction control/Pathogen/ACTB RT primer mix 165 µl
4. Endogenous ACTB primer/probe mix 165 µl
5. Internal extraction control RNA 600 µl
6. Positive Control Template 500 µl

RT-PCR çalışılmak üzere numuneler ependorf tüpünde aşağıda verilen prosedürlere göre hazırlandı.

Her çalışılacak RNA örnekleri için aşağıdaki prosedüre göre bir reaksiyon karışımı hazırlandı.

- 5 x Precision OneStep™ qRT-PCR MasterMix 10 µl
- HDV Primer/Probe mix (BROWN) 1 µl
- Internal extraction control primer/probe mix (BROWN) 0.5 µl
- RNA sample 10 µl
- RNase/DNase free water (WHITE) 13.5 µl
- Final Volume 50 µl

Her RNA örneği için bir endojen aşağıdaki prosedüre göre ACTB kontrol reaksiyonu hazırlandı.

- 2 x Precision OneStep™ qRT-PCR MasterMix 10 µl
- Endogenous ACTB primer/probe mix (BROWN) 1 µl
- RNA sample X µl
- RNase/DNase free water (WHITE) X µl
- Final Volume 20 µl

### **3.2.3.2. Standart protokolünün hazırlanması**

Her bir standart eğri örnek için bir reaksiyon karışımı aşağıdaki prosedüre göre hazırlandı.

- 2 x Precision™ MasterMix 10 µl
- HDV Primer/Probe mix (BROWN) 1 µl
- RNase/DNase free water (WHITE) 4 µl
- Final Volume 15 µl

### 3.2.3.3. Pozitif kontrolün hazırlanması

- Tube 1 Positive control (RED)  $2 \times 10^5$  per  $\mu$ l
- Tube 2  $2 \times 10^4$  per  $\mu$ l
- Tube 3  $2 \times 10^3$  per  $\mu$ l
- Tube 4  $2 \times 10^2$  per  $\mu$ l
- Tube 5 20 per  $\mu$ l
- Tube 6 2 per  $\mu$ l

### 3.2.4. Amplifikasyon Protokolü

Hazırlanan numunelerin ependorf tüpleri ve kontrollerin ependorf tüpleri, Rotor-Gene Real-time PCR cihazına yerleştirilerek cihaz çalıştırıldı. Cihaz, amplifikasyon işlemini, üretici firmanın verdiği değerler ölçüsünde otomatik olarak taplo 5'te gösterilen sıcaklık ve zamanda yaptı.

Aplikasyon sonuçlarını; cihaza bağlı bilgisayar yardımıyla, özel olarak hazırlanmış yazılım aracılığıyla otomatik olarak oluşturan grafik ve nicel olarak öğrendik.

**Tablo 5.** Real-time PCR amplifikasyon protokolü (60)

	Step	Time	Temp
	Enzyme activation	10 mins	95 °C
50 Cycles	Denaturation	10s	95 °C
	DATA COLLECTION *	60s	60 °C

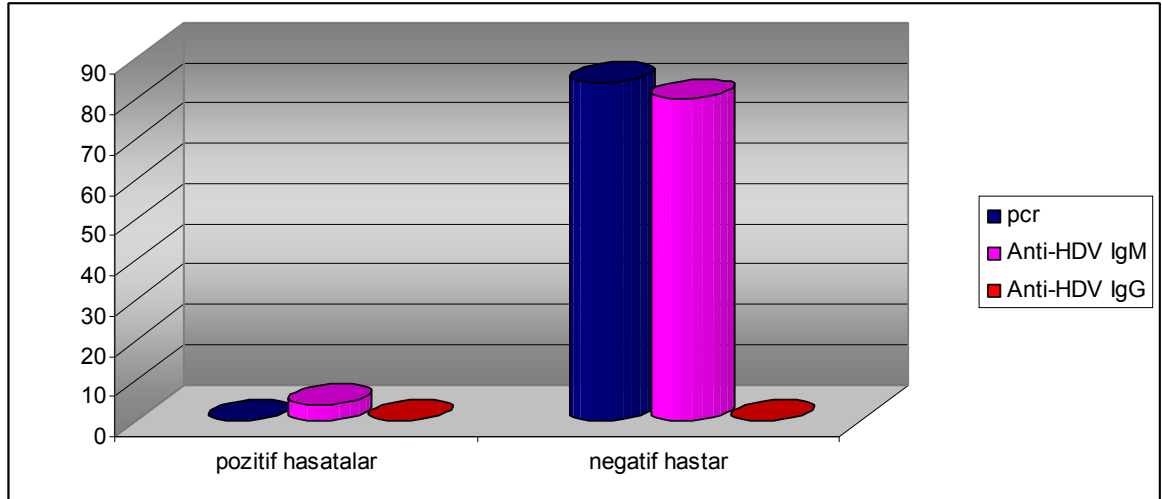


#### 4. Bulgular

Bu çalışmada KSÜ Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesinin çeşitli polikliniklerine başvuran Hepatit B yüzey antijeni (HBsAg) ve HBV DNA'sı pozitif 84 hastada; HDV ELİSA yöntemiyle Anti-HDV IgM, Anti-HDV IgG ve moleküler yöntemle RT-PCR (HDV RNA) kullanılarak çalışma yapılmış olup sonuçlar tablo 6' da verilmiştir.

**Tablo 6.** Hepatit D virüs serolojik ve moleküler test sonuçları.

84 (HASTA)	Pozitif	Negatif
Anti-HDV IgM (ELİSA)	4 (%4.76)	80 (%93.24)
Anti-HDV IgG (ELİSA)	0 (%0)	84 (%100)
HDV RNA (PCR)	0 (%0)	84 (%100)
HBV DNA (PCR)	84 (%100)	0 (%0)



**Grafik 1.** Hepatit D virüs ELİSA ve moleküler test sonuçları dağılımı

Hepatit D virüs serolojik ve moleküler test sonuçları çalışıldı. HBsAg pozitif 84 hasta örneğinin 4'ünde (%4.76) Anti-HDV IgM pozitif bulunmuştur. Çalışılan bu hastaların tamamında HDV RNA çalışıldı ve sonuçlar negatif olarak bulundu.

#### 4.1. İstatistik Analiz

##### 4.1.1. Spesifite ve sensitivite hesaplanması

Duyarlılık (Sensitivite) : Hastalık varken testin pozitif çıkma olasılığı

Özgüllük (Spesifite) : Hastalık yokken testin negatif çıkma olasılığı

$$\text{Duyarlılık} = \text{GP} / [\text{GP} + \text{YN}] = a/a+c$$

$$\text{Özgüllük} = \text{GN} / [\text{GN} + \text{YP}] = d/d+b$$

**Tablo 7. Spesifite ve sensitivite hesaplanma tablosu (61)**

		HASTALIK	
		VAR	YOK
TEST	+	a GP	YP b
	-	c YN	GN d

$$\text{Duyarlılık} = \text{GP} / [\text{GP} + \text{YN}] = a/a+c \text{ (61)}$$

$$\text{Özgüllük} = \text{GN} / [\text{GN} + \text{YP}] = d/d+b \text{ (61)}$$

**Tablo 8. ELİSA testi için Sonuçların spesifite ve sensitivite hesaplanması**

		PCR TESTİ	
		Hastalık	
ELİSA testi		+	-
	+	0	4
	-	0	84

$$\text{Spesifite} = \text{GN} / [\text{GN} + \text{YP}] = d/d+b$$

$$\text{Spesifite} = d/d+b$$

$$\text{Spesifite} = 84/88$$

$$\text{Spesifite} = \%95.45$$

Altın standart PCR testi olduğundan ELİSA testi için spesifite hesabı yapıldı ve %95.45 bulundu. Gerçek pozitif hasta olmadığı için sensitivite hesaplanamadı.

## 5.TARTIŞMA

HDV yalnız HBV enfeksiyonu olan kişilerde hastalık oluşturabilen, tek başına patojen olmayan defektif bir RNA virüsüdür. HDV'nin RNA genomu, insanı enfekte eden Hepatit virüslerinden en küçük genoma sahip olanıdır (9). HDV enfeksiyonu özellikle Balkan ülkeleri, eski Sovyet Cumhuriyetleri ve Türkiye olmak üzere tüm dünyada önemli bir halk sağlığı problemi olmayı sürdürmektedir (62). HDV hem akut hem de kronik Hepatite neden olurken, oluşturduğu klinik tablolar diğer viruslara kıyasla daha ağırdır. HDV enfeksiyonunda fulminan seyir ve kronikleşme sıktır (24).

HDV enfeksiyonlarının laboratuvar tanısında serolojik ve virolojik yöntemlerden yararlanılır. Delta Hepatitinin tanısı, karaciğer biyopsi örneklerinde direk immüno floresans ya da immünoperoksidaz yöntemleriyle veya serumda RIA ya da EIA yöntemleriyle viral antijenin (HDAg) gösterilmesi esasına dayanır. Ancak çok daha pratik olması ve invazif girişim gerektirmemesi açısından yaygın olarak kullanılan yöntem, serumda anti-HDV total, IgG ve IgM antikorlarının EIA ile saptanmasıdır. Özellikle kronik delta Hepatitinin tanısı ve takibinde en duyarlı testin anti-HDV IgM olduğu, bunu HDV-RNA ve serum HDAg'nin izlediği bildirilmektedir 38(38). Akut delta Hepatitinde viral replikasyonun göstergesi olan serumda HDV-RNA'sının PCR ile saptanması viremin belirlenmesinde büyük önem taşımaktadır (63).

Bu çalışmada amacımız, HBsAg'si pozitif çıkan hasta serumlarında, HDV pozitifliğinin gösterilmesi ve tanıda ELİSA yöntemi ile Real time PCR yöntemlerinin karşılaştırılmasıdır. Çalışmada HBsAg pozitif çıkan 84 hasta serum örneğine anti-HDV IgG ve anti-HDV IgM çalışılmıştır ve sonuç olarak HBsAg pozitif 84 serum örneğinin 4'ünde (%4.76) Anti-HDV IgM pozitif bulunmuştur. Çalışılan bu hastaların tamamının HDV RNA'sı negatif çıkmıştır. Literatürde bizim çalışmamıza yakın çalışmalar ve sonuçları şöyledir:

Sakugawa ve arkadaşları, Japonya'ya HDV enfeksiyonunun prevalansını hesaplamak için yaptıkları çalışmada, 1994-95 yıllarında arasında check-up yapılan sağlıklı 2028 kişi incelenmiş ve 195 (% 9,6) bireyde HBsAg pozitif bulunmuştur. Bu HBsAg pozitif bireyin, 46 (% 23,6)'nda HDV antikorunu tespit edilmiştir (64).

Viana ve arkadaşları Batı Brezilya'nın Amazon bölgesinde HBV ve HDV'nin prevalansını belirlemek için 17 Şubat ve 20 Temmuz 2002 tarihleri arasında yaptıkları çalışmada HBV ve HDV belirteçleri ELİSA yöntemi ile analiz edilmiştir. 2656 örneğin, 89

(% 3.3)'unda HBsAg'i ve 1.628 (% 61.5)'inde Hepatit B kor antijenine karşı IgG antikor pozitifliği tespit edilmiştir. HDV antikor 47 olguda (% 1.8) tespit edilmiştir. (65).

Roshandel ve arkadaşları Golestan eyaletinde yaptıkları çalışmada, 139 HBsAg pozitif hasta; ELISA kitleri kullanılarak anti-HDV antikor varlığı açısından değerlendirilmiştir. 139 olgunun 8'inde anti-HDV antikor (%5.8) pozitif bulunmuştur (66).

Djebbi ve arkadaşlarının Tunus'da Hepatit delta virüsü ile enfekte olmuş hastalarda serolojik ve moleküler yöntemler kullanılarak HBsAg'i pozitif 215 hastada yaptıkları çalışmada, 24 hastada (% 11,1) delta antijeni ve 15 hastada da delta antikor (% 6,9) pozitif olarak tespit edilmiştir. HDV serolojisi pozitif olan bu hastaların 21 tanesinde de (% 53.8) HDV RNA pozitif bulunmuştur (67).

Das ve arkadaşları Jinnah Postgraduate Tıp Merkezinde yaptıkları çalışmada; 2007 yılı Şubat ve 2007 yılı Temmuz ayları arasında gastroenteroloji kliniğine başvuran ve HBsAg'si pozitif 73 hasta çalışmaya dahil edilmiştir. Bu hastaların serum örneklerinden 23 tanesinde Anti-HDV pozitif bulunmuş ve bu hastaların da 15 tanesinde HDV-RNA pozitifliği tespit edilmiştir (68).

Nwokediuko ve arkadaşları Nijerya'da yaptıkları prospektif ve kesitsel çalışmada karaciğer hastalığı ve Hepatit B yüzey antijeni (HBsAg) pozitif olan doksan altı hastanın serumlarının HDV antikor için test edildiği çalışmada; 12 hastada (%12.5) anti-HDV'nin pozitif olduğu gösterilmiştir (69).

Alizadeh ve arkadaşları 2002-2007 yılları arasında Hamedan Eyaletinde Toplum Sağlığı Merkezinde Kronik Hepatit B olduğu tespit edilen hastalar üzerinde yaptıkları çalışmada; HBsAg pozitif 81 hastada ELISA yöntemiyle Anti-HDV IgG ve Anti-HDV IgM araştırılmış ve 14 (% 17.3) hastada Anti-HDV IgG, ve bir hastada (% 1.2) Anti-HDV IgM pozitif tespit edilmiştir. Anti-HDV IgG pozitif ve negatif hastalarda kronik Hepatit B sıklığı sırasıyla % 28.6 ve % 39.2 olarak rapor edilmiştir (70).

Kore'de Kim ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada HBV ile kronik olarak enfekte 949 hasta çalışmaya dahil edilmiş, bu hastalar anti-HDV total için test edilmiştir. Sadece üç hastada, anti-HDV pozitif bulunmuş olup bu yaklaşık %0.32 oranında tespit edilmiştir. Anti-HDV'si pozitif olan hastaların sadece iki tanesinde, PCR'da HDV RNA amplifiye edilebilmiştir (71).

Gené ve arkadaşları tarafından 2008 yılında yapılan 'İsviçre'de Hepatit delta: sessiz bir salgın' isimli çalışmada 1699 Hepatitli hastanın 101 tanesinin HDV ile ko-enfekte olduğu ve bunların da 37'sinde HDV RNA'nın pozitif olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak bu çalışmada HBsAg'si pozitif hastalarda Hepatit D prevalansı %5.9 olarak bildirilmiştir (72).

Shaikh ve arkadaşları Chandka Medical College Hastanesinde yaptıkları çalışmada, 2003-2008 yılları arasında karaciğer hasarı olan 774 yetişkin hasta serumunda, ELISA yöntemi kullanılarak delta antikor varlığı araştırılmış ve sonuç olarak 183 hastada (%23.6) Anti-HDV pozitif bulunmuştur (73)

Khan ve arkadaşlarının Pakistanda yaptıkları çalışmada; HBsAg yüzey antijeni pozitif 228 hasta da HBV DNA araştırılmış ve bu örneklerin 190'ında (% 83.3) HBV DNA pozitif tespit edilmiştir. HBV DNA'sı pozitif bulunan 190 hastanın, HDV RNA'sı RT-PCR ile araştırılmış ve 53 hastada da (% 28) HDV-RNA pozitif bulunmuştur. Bu çalışmaya göre; Sindh, Khyber Pakhtoonkhaw ve Punjab şehirlerinde HDV prevalansı sırasıyla %67, %6 ve %4 olarak bulunmuştur (74).

Avrupa'da HIV ile enfekte kişilerde Hepatit delta enfeksiyonu varlığını araştıran Soriano ve arkadaşları, HIV ile enfekte hastalarda HBsAg'i pozitif 422 hastayı çalışmaya dahil etmişlerdir. EIA yöntemi ile Anti-HDV IgG değerlendirilmiş ve sonuçta 422 hastanın 61'inde (prevalans %14.5) anti-HDV IgG pozitif bulunmuştur. Anti-HDV IgG pozitif hastalarda real-time PCR yöntemi kullanılarak HDV-RNA araştırılmış ve 53 (%87) hastada HDV-RNA tespit edilmiştir (75).

De Paschale ve arkadaşları Kuzey İtalya'da bir kentsel alanda Hepatit D virüsü (HDV) enfeksiyonu epidemiyolojisini araştırmışlardır. Çalışmaya HBsAg'si pozitif olan 488 hasta dahil edilmiştir. Sonuç olarak bu hastaların 24'ü (4.9%) anti-HDV pozitif bulunmuş ve bunların sadece bir tanesinde (0.2%) HDAg'i pozitif bulunmuştur (76).

Ülkemizde bu konuda ilk çalışma, Gürakar ve ark. tarafından, kronik karaciğer hastalığı olan bireylerde 1980'li yılların başında yapılmış ve bu bireylerde HDV enfeksiyonu sıklığı %11 olarak bulunmuştur (77).

Bozdayı ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, Ankara Yüksek İhtisas Hastanesi Kan Bankasına kan bağışında bulunan 850 donörde HBV enfeksiyonu varlığı ile ilgili olarak HBsAg çalışılmış; HBsAg pozitif olgularda HDV enfeksiyonu göstergesi olarak anti-HD (total:IgM + IgG) ETA yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. 850 olgunun 45'inde (% 5.29) HBsAg pozitif bulunmuştur. HBsAg pozitif olgularda Anti-HD pozitifliğine rastlanmamıştır (%0) (78).

Arıbaş ve arkadaşları Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji polikliniğine başvuran ve bölümde yatırılarak takip edilen Hepatit B virus (HBV) enfeksiyonlu olgularda, HDV antikorunun araştırılması amacıyla yaptıkları çalışmada; 30 asemptomatik HBsAg taşıyıcısı, 32 akut B Hepatitli ve 45 kronik B Hepatitli hastaya ait serum örneklerinde, anti-HDV antikoru ELISA yöntemi ile araştırılmıştır. Olguların tamamının serum örneklerinde HBsAg, anti-HBcIgM, anti-HBcIgG, HBeAg, anti-HBe, anti-HBs ve anti-HDV (total) ELISA yöntemi ile bakılmıştır. Çalışmaya alınan HBsAg pozitif toplam 107 olgunun 32 (% 29.9)'si akut Hepatit B, 45 (% 42.1)'i kronik Hepatit B ve 30 (% 28.0)'u HBsAg taşıyıcısı iken bu olguların 2'sinde (% 1.9) Anti-HDV antikoru pozitif bulunmuştur. Anti-HDV pozitifliğinin hasta gruplarına dağılımına bakıldığında akut Hepatit B olgularının hiçbirisinde delta antikor pozitifliği saptanmazken, kronik Hepatit B olgularının 1'inde (% 2.2) ve HBsAg taşıyıcılarının da 1'inde (% 3.3) delta antikor pozitifliği saptanmıştır (79).

Özekinci ve arkadaşlarının Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji laboratuvarında yaptıkları çalışmada, HBsAg pozitif 153 serum örneği incelenmiş ve bu örneklerde anti-HDV IgG ve IgM pozitifliği mikroEIA yöntemiyle (Diapro, Diagnostic Bioprobes, Milano, Italy) çalışılmıştır. HDV-RNA tespitinde real time polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi kullanılmıştır. Çalışmanın sonucunda, 153 HBsAg pozitif örneğin 86'sı (%56.2) HDV antikorları yönünden pozitif, 67'si (%43.8) ise negatif bulunmuştur. Anti-HDV pozitif 86 olgunun 35'inde sadece IgG, 11'inde sadece IgM ve 40'ünde hem IgG hem de IgM pozitifliği mevcuttur. Serum örneklerinde HDV-RNA pozitiflik oranı ise %21.5 (33/153) olarak saptanmıştır. HDV-RNA pozitif örneklerin 4'ünde sadece IgG, 8'inde sadece IgM, 19'unda ise hem IgG hem de IgM pozitifliği mevcuttur (80).

Cesur ve arkadaşlarının Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Bakteriyoloji Anabilim Dalı'nda 1990-2000 yılları arasında yaptıkları çalışmada kronik Hepatit B tanısı ile izlenen 275 hastada anti-HDV (total) ve anti-HCV antikorlarının sıklığı araştırılmıştır. Çalışma 163 (%59.2) erkek ve 112 (%40.7) kadın olmak üzere toplam 275 HBsAg pozitif hastada yapılmış ve sonuç olarak HBsAg taşıyıcılarının %4.78'inde anti-HDV pozitifliği, %0.86'sında ise anti-HCV pozitifliği saptanmıştır. Kronik Hepatit B'li hastaların ise %8.8'inde anti-HDV pozitifliği saptanırken, hiç birinde anti-HCV pozitifliği saptanmamıştır (81).

Gebe popülasyonunda Hepatit B, C, D virus enfeksiyonu sıklığını araştıran Karaca ve arkadaşları, SSK Bezm-i Alem Valide Sultan Vakıf Gureba Eğitim Hastanesi Kadın

Hastalıkları ve Doğum Kliniğine antenatal takip amacıyla başvuran 460 gebe kadında HBsAg ve anti-HCV pozitifliği değerlendirilmiştir. HBsAg pozitif vakalarda anti delta total antikoru (anti-HDV total) tetkik edilmiş ve çalışma kapsamına alınan 460 hastanın sonuçları şöyle bulunmuştur: 22 (%4.7) gebede HBsAg, 6 (%1.3) gebede anti-HCV pozitif saptanmıştır. Anti-HCV pozitif 6 gebenin 3'ünde (%50) HCV-RNA pozitif, 3'ünde de (%50) negatif tespit edilmiştir. HBsAg pozitif 22 gebenin hiçbirinde anti-HDV seropozitifliği saptanmamıştır (82).

Türkdoğan ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, Hepatit B virüs enfeksiyonunun sık görülüşü Van yöresinde Hepatit B virüsüne bağlı kronik Hepatit ve karaciğer sirozlu hastalarda Hepatit delta virüs enfeksiyonunun rolü ve epidemiyolojik özellikleri araştırılmıştır. HBV ve HDV enfeksiyonunun serolojik göstergeleri (HBsAg, HbeAg, Anti-HBe ve Anti HDV total:IgM+IgG) ELİSA yöntemi ile değerlendirilmiştir. Bu çalışmaya 361 hasta dahil edilmiş ve sonuç olarak; Hepatit delta virus enfeksiyonu, asemptomatik Hepatit B virüs taşıyıcılarının %5'inde (7/138), kronik Hepatit B'li hastaların %16'sında (24/148) ve HBV sirozlu hastaların %45'inde (34/75) tespit edilmiştir (7).

Güdücüoğlu ve arkadaşlarının Van Askeri Hastanesi'nde yaptıkları çalışmada HBsAg'i pozitif 184 hasta serumunun 36'sında (%19.5) Anti-HDV pozitifliği saptamışlardır (83).

İskender ve arkadaşları tarafından Aralık 2004-Temmuz 2005 tarihleri arasında takip edilen Hepatit B enfeksiyonlu 86 hastada anti-HDV varlığı ELISA (Abbott AxSYM) yöntemiyle araştırılmıştır. Çalışmaya alınan 86 hastanın 84'ünde (%97.67) anti-HDV negatif, 2 (%2.33) hastada ise pozitif bulunmuştur (84).

Dr. Meşe yapmış olduğu uzmanlık çalışmasında Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Kan Bankasında 2007 yılının Ocak ve Şubat aylarında 4882 gönüllü kan donörü taranmış ve taramalar sonucunda 160 (%3.28) donörde HBsAg pozitif bulunmuştur. HBsAg pozitif 160 serum örneğinin 14'ünde (%8.75) total anti-Delta antikoru pozitif bulunmuştur. Total anti-Delta antikoru pozitif bulunan 14 örneğin sadece 2 (%14.29)' sinde HDV RNA pozitif olarak saptanmıştır. Böylece tüm HBsAg pozitif donörler arasında HDV RNA pozitifliğinin %1.25 (2/160) olduğu belirlenmiştir (85).

Koruk ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, kronik Hepatit B (KHB) enfeksiyonu nedeniyle Harran Üniversitesi Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği ile Pediatri Kliniğinde takip edilen çocuk hastaların

değerlendirilmesi yapılmıştır. Ocak 2005-Aralık 2009 tarihleri arasında başvuran KHB enfeksiyonu tanısı almış 266 çocuk hastanın demografik verileri ve laboratuvar bulguları değerlendirilmiş ve yapılan aile taramalarında hastaların %64.2'sinde ailede HBV enfeksiyonu öyküsü olduğu saptanmıştır. Dört hastada da (%1.5) anti-HDV pozitifliği bulunmuştur (86).

Bahçecioğlu ve arkadaşlarının Türkiye'nin doğusunda kronik Hepatit B hastalarında Hepatit delta virüsü (HDV) enfeksiyonu yaygınlığını bulmak amacıyla yaptıkları çalışmaya kronik HBV ile enfekte 282 hasta dahil edilmiştir. HDV varlığı Anti-HDV ile araştırılmış ve Anti-HDV pozitif hastalar daha sonra HDV RNA için test edilmiş ve sonuç olarak Anti-HDV pozitifliği (128/282) % 45.5 oranında bulunmuştur. Anti-HDV pozitif 128 hastadan 116'sı HDV RNA varlığı yönünden araştırıldığında ve % 56.9 (66/116) oranında pozitif bulunmuştur. Böylece tüm çalışma grubunda Kronik HDV enfeksiyonu oranının (66/282) % 23.4 olduğu saptanmıştır (87).

Altınbaş ve arkadaşları Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Hepatoloji polikliniğine Nisan 2009 -Şubat 2011 tarihleri arasında başvuran HBsAg pozitif hastalarda HDV sıklığı retrospektif olarak değerlendirmiştir. Çalışmalarının sonucunda, 348 hastanın 7'sinde (%2.0) anti-HDV pozitif bulunmuş ancak bu hastaların sadece 2 (%0.5) tanesinde HDV RNA pozitif tespit edilmiştir (88).

ELİSA yöntemi 1960'lı yıllarda radioimmunoassay yöntemlerine alternatif yöntemler aranırken bulunmuştur. 1960'lı yıllardan günümüze kadar rutin kullanıma girmiş ve dünyanın her tarafına yayılmıştır. ELİSA yönteminde kullanılan reaktiflerin uzun ömürlü olması ve atık maddeleri ile ilgili radyasyon tehlikesi olmaması nedeniyle hızlı bir şekilde RİA yöntemine göre çokça tercih edilmeye başlanmıştır. ELİSA yönteminin en önemli avantajlarından biri de tanı laboratuvarlarında az zamanda çok sayıda örnekle çalışma imkanı sağlamasıdır. Bu testlerin kullanımının artmasıyla paralel üretimlerinin de yaygınlaşmasıyla maliyetlerinde de düşme olmuştur. Bu nedenle birçok hastane ve laboratuvarında güvenilir ve ekonomik sonuçlar verdiği için sık olarak kullanılmaktadır. Fakat ELİSA kompleks bir teknik olmamasına rağmen bu teknikte birçok değişken kontrol etmektedir. Katı faz, yıkama işlemleri, kullanılan enzim ve substratların seçimi ve etkinliği, reaksiyonların sonlandırılma zamanı, kontrol edilmesi gereken değişkenlerdir. ELİSA'nın en önemli dezavantajının birisi de sadece bir tek antijeni tespit edebilme yeteneğinde olmasıdır. Bu gibi nedenlerden dolayı ELİSA yöntemi hatalı sonuçlar



verebilmektedir. ELISA testi; HDV ile ilgili olmayan diğer bazı proteinleri de HDV'ye özgü antikorlar olarak tanıyabilir. Bu durumda test sonucu pozitif çıkabilir. Bu duruma yalancı pozitiflik denir. Bizim yaptığımız çalışmada ELISA testi sonuçlarına göre dört hastada Anti-HDV IgM pozitif çıkmıştır fakat PCR yöntemi ile yapılan çalışmada bu hastaların HDV-RNA'sı negatif olarak tespit edilmiştir.

Gelişen dünya şartlarında her geçen gün ELISA yönteminin yerini daha yüksek spesifite ve sensitifiteye sahip olan başta PCR olmak üzere çeşitli moleküler yöntemler almaktadır. Enfeksiyon tanısında, hastaya bulaştan itibaren PCR yöntemiyle enfeksiyonun tanısı için gerekli süre ELISA yöntemiyle enfeksiyonun tanısı için gerekli süreden daha kısadır. PCR yöntemi ile enfeksiyonun viral yükünü takip ederek enfeksiyonun durumu hakkında hekime bilgi verir fakat ELISA'nın böyle bir avantajı yoktur. PCR yönteminde, aranan mikroorganizmaya ait hedef gen bölgesinin kısa oligonükleotid parçaları ile amplifikasyonu yapılmakta ve çoğaltılan DNA parçaları çeşitli şekillerde görüntüleyerek kantitatif sonuç vererek tespit etmekte ve güvenilir olduğu için altın standart olarak kabul edilmektedir.

Yaptığımız çalışmada HDV antikorları negatif tüm hastalarda HDV RNA'nın da negatif olması göz önünde bulundurulursa rutin tarama amaçlı işlemlerde güvenilir bir ELISA tekniği ile anti-HDV antikorunun araştırılmasının da hastanın HDV virüsü ile enfekte olup olmadığını belirlemede yeterli olacağı düşünülebilir. Diğer yandan anti-HDV antikorları pozitif tespit edilen serumların öncelikle ELISA ile tekrar çalışılması ve hastalığın doğrulanması için HDV RNA testlerinin yapılması gerektiğini düşünmekteyiz. ELISA ve PCR metotlarının birlikte kullanılması pozitif sonuçların doğrulanmasına ve erken tanıya yardımcı olacaktır.

Çalışmamızda önemli bir sonuç ise ELISA yöntem ile pozitif çıkan hastalarda viral replikasyonun gösterilememesidir ki bu durumda serolojik yöntemlerin ne kadar güvenilir olduğu konusunda akıllarda soru işareti oluşturmaktadır. ELISA yöntemin sensitivitesinde problem yokken spesifitesinde yaklaşık %5 gibi bir sapma olması bize yine ELISA yönteminin bir tarama yöntemi, moleküler yöntemlerin ise doğrulama testi olarak kullanımının doğru olacağını göstermiştir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Hepatit D virüsünün tanısı, HBsAg'ye eşlik eden anti-HDV antikörlerinin varlığı ile gerçekleşir. Fakat bu tanıya kesinlik katmak için moleküler biyoloji teknikleri (Northern-Blot hibridizasyonu; PCR) ile serumda HDV-RNA'nın veya immünfloresan ya da immünperoksidaz boyamaları ile hepatositlerde HDV-antijeninin gösterilmesi gerekir. HDV virüsünün tanısında kullanılan ELISA kitleri ile anti-HDV-IgM ve HDVAg göstergelerinin araştırılması maliyet açısından önemlidir ancak tedavinin seyrini belirlemek ve kesin tanı için yeterli değildir.

HDV-RNA'nın hasta serumunda saptanması, delta Hepatitinin erken tanısı ve tedaviye yanıtın izlenmesinde oldukça önemli, spesifite ve sensitivitesi yüksek ve invaziv olmayan bir yöntem olduğu için diğer tanı yöntemlerine göre avantajlı duruma geçmiştir. HDV-RNA'sının serumda 10-100 genomu saptayabilecek duyarlılıktaki RT-PCR uyarınca araştırılması, tüm diğer tekniklerden daha kesin bir tanı yöntemi olarak ele alınabilir. Doğru primerler kullanıldığında yalancı pozitifliği önleyerek gerçek viral replikasyonu gösterir. Tedaviye bir diğer katkısı da kronik HDV enfeksiyonunun tedavisinin izlenmesi ve viremiyi göstermesidir.

HBsAg pozitif saptanan hastaların aynı zamanda HDV enfeksiyonu yönünden de araştırılması uygun olacaktır. Böylece HDV ile enfekte vakaların daha erken tanınması sağlanabilir. Bu hastalarda serum örneklerinde ELİSA yöntemi kullanılabilir, fakat anti-Delta antikörünün saptanması güvenli bir tanı için yeterli olmayabilir. Yaptığımız çalışmaya göre ELİSA yönteminin spesifitesinde az da olsa sapma olduğu için hastalara kesin tanı koymak için ve viremiyi ölçmek için, oldukça duyarlı bir yöntem olan real-time PCR yöntemi kullanılarak serumda HDV RNA'nın saptanmasıyla doğrulamak gerektiği kanaatindeyiz.

HBsAg taşııcılığıyla birlikte olabilecek HDV enfeksiyonlarına doğru tanı konulması ve viral replikasyonun gösterilmesi, bulaşın önlenmesi ile birlikte anti viral tedavinin başlanmasını ve izlenmesini böylece HDV'ye bağlı gelişebilecek karaciğer hasarının önlenmesini sağlayacaktır. Ülkemizde yüksek maliyet gerektiren moleküler tekniklerin rutin kullanımında "maliyet-yararlılık değerlendirmeleri" ayrıca tartışılması gereken bir konudur.

HDV enfeksiyonu, bir çok viral enfeksiyon gibi spesifik bir tedavisi olmadığı için hastalığın yayılmasını önlemek için koruma ilk yapılacakların başında yer almaktadır.

HBsAg pozitif veya anti-HBc' li her kişi anti-HDV IgG antikoru için test olmalıdır, özellikle yüksek risk grubunda olan bireyler (intravenöz uyuşturucu kullananlar ve endemik bölgelerden göç eden kişiler) test olmalıdır.

Ülkemizde tüm yeni doğan bebeklere Hepatit B aşısı yapıldığından Hepatit B'ye karşı immün yanıt gelişeceği için Hepatit B'nin gelecekte önemli ölçüde bir sorun olmaktan çıkacağı düşünölmektedir. Akut HBV, kronik HBV ve HBV taşıyıcısı hastaların yakınlarına HBV aşısı yapılarak HBV enfeksiyonunun yayılması önenecek dolaylı olarak da HDV enfeksiyonunun yayılması da önlenmiş olacaktır.

Türkiyede'de tüm HBV taşıyıcılarında, HDV enfeksiyonunun güncel sıklığını ortaya koymak için projelerle desteklenen ileriye yönelik çalışmalar yapılmalıdır. HDV enfeksiyonu prevalansının sürekli takip edilerek gerekli önlemlerin alınması gerektiğini düşünmekteyiz.

## 7. KAYNAKLAR

1. Rizzetto M, Canese MG, Arico S, et al. Immunofluorescence detection of new antigen antibody system (delta / anti-delta) associated to Hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers. Gut 1977; 18:997.
2. Gazi H, Ecemiş T, Özcan S, Çetinkaya, Z, Şengil A. Manisa'da Hepatit D virüs prevalansı. İnfeksiyon Dergisi 2001;15:425-427
3. Us T, Akgün Y, Durmaz G, Esengen S: HBV ile enfekte kişilerde anti-HDV pozitifliği. Viral Hepatit Dergisi 1999; 2:76-78
4. Zhang YY, Hansson BG: Introduction of a new Hepatitis agent in retrospect: genetic studies of Swedish Hepatitis D virus strains. J Clin Microbiol 1996; 34: 2713-2717
5. Özgüneş N. Kronik Hepatitlerde Güncel Durum EKMUD Bilimsel Platformu, 5-8 Ekim 2006.
6. Gretch DR. Diagnostic tests for Hepatitis C. Hepatology 1997; 26 3 suppl .:43-47
7. Türkdoğan M, Bozkurt H, Uygan I, et al. Chronic Hepatitis delta virus infection in Van region of Eastern Turkey. Turk J Gastroenterol 2005;16:17-20.
8. Davies S et al. J The Molecular Biology of Hepatitis Delta Virus Virol 1994; 68:1052
9. Rizzetto M, Hoyer B, Canese MG, Shih JW, Purcell RH, Gerin JL. delta Agent: association of delta antigen with Hepatitis B surface antigen and RNA in serum of delta-infected chimpanzees. Proc Natl Acad Sci U S A. 1980 Oct;77(10):6124-8.
10. Denniston KJ, Hoyer BH, Smediler A, et al. Cloned fragment of the Hepatitis delta virus genome: Sequence and diagnostic application. Science 1986; 232:873-875.
11. [http://www.cdc.gov/ncidod/diseases/Hepatitis/slideset/hep\\_d/slide\\_1.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/diseases/Hepatitis/slideset/hep_d/slide_1.htm)

12. Taylor J, Negro F, Rizzetto M. Hepatitis delta virus: from structure to disease expression. *Reviews in Medical Virology* 1992; 2:161-7.
13. Wang KS, Choo QL, Weiner AJ, Ou JH, Najarian RC, Thayer RM, Mullenbach GT, Denniston KJ, Gerin JL, Houghton M. Structure, sequence and expression of the Hepatitis delta viral genome. *Nature*, 1986; 323: 508-514.
14. Monjardino JP, Saldanha JA. Delta Hepatitis: the disease and the virus. In: Zuckerman AJ(ed). *Viral Hepatitis*. *British Medical Bulletin* 1990; 46(2):399-407.
15. Chadalavada DM, Senchak SE, Bevilacqua PC. The folding pathway of the genomic Hepatitis delta virus ribozyme is dominated by slow folding of the pseudoknots. *J Mol Biol*, 2002; 317:559-575
16. Taylor JM. Organization and expression of the Hepatitis delta virus genome. *Sem Virol*, 1997; 8: 59-64
17. Aygen B. Viral Hepatitler ders sunumu. Erciyes üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri, 2001
18. Sengezer T. Bozdayı M. Hepatit Delta Virüsünün Moleküler Biyolojisi Türkiye Klinikleri Gastroenterohepatoloji dergisi 2001, 12 95
19. Chou HC, Hsieh TY, Sheu GT, Lai MC. Hepatitis Delta Antigen Mediates the Nuclear Import of Hepatitis Delta Virus RNA. *Journal of Virology* 1998: 72:3684-3690
20. Lai MM. The molecular biology of Hepatitis delta virus. *Annu Rev Biochem*. 1995;64:259-86.
21. Polish LB, Gallengher M, Fields HA, Hadler SC. Delta Hepatitis: Molecular biology and clinical and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev*, 1993; 6: 211-229

22. Cunha C. Structure and replication of Hepatitis delta virus African Journal of Biotechnology 2008; Vol. 7 (25), pp. 4911-4916
23. Bilgiç A, Özacar T. Hepatit B ve D virusları. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. In: Ustaçelebi S. (eds). Ankara, Günes kitapevi, 1999; 878-880
24. Farci P. Delta Hepatitis: an update. J Hepatol 2003; 39:212–219.
25. Fattovich G, Giustina G, Christensen E, et al. İnşuence of Hepatitis delta virus infection on morbidity and mortality in compensated cirrhosis type B. The European concerted action on viral Hepatitis (Eurohep). Gut 2000; 46:420–6.
26. Er A. Hepatit B hastalarında Hepatit D sıklığı ve hasta yakınlarının kesitsel olarak incelenmesi uzmanlık tezi 2008-Van
27. Casey, J. L., Brown, T. L., Colan, E. J. et al. 1993. A genotype of Hepatitis D virus that occurs in northern South America. Proc Natl Acad Sci USA, 90, 9016–9020.
28. Dalekos, G. N., Zervou, E., Karabini, F. et al. 1995. Prevalence of viral markers among refugees from southern Albania: increased incidence of infection with Hepatitis A, B and D viruses. Eur J Gastroenterol Hepatol, 7, 553–558.
29. Heiner Wedemeyer & Michael P. Manns Epidemiology, pathogenesis and management of Hepatitis D: update and challenges ahead Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology 2010; 7, 31-40
30. Şengezer T. Hepatit Delta Virus RNA'sının PCR ile belirlenmesi ve kronikDelta Hepatitli Türk hastalarda HDV RNA genotiplendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara. 2000: 1-43.
31. Değertekin H. Dünyada ve Türkiye'de Hepatit Delta Virus infeksiyonunun epidemiyolojisi. 1. Baskı. Türkiye Karaciğer Araştırmaları Derneği, Diyarbakır. 2005: 36-44.

32. Okten A. Kronik viral Hepatitler ve hepatoselüler karsinoma etiyolojisinde yıllara göre dağılım. Pınarbaşı Şimşek B Gastroenterohepatoloji Yan Dal Uzmanlık Tezi İstanbul – 2010
33. Sun S. Ülkemizde universal (kitlese) HBV asılmasının 10.yıl sonuçlarının değerlendirilmesi. IX. Ulusal Viral Hepatit Kongresi, Kongre Kitabında, 3-6 Nisan 2008, Belek Antalya: 83-88
34. Cole, S., E.J. Gowans, T.B. Macnaughton, P.M. Hall, and C.J. Burrell.1991. Direct evidence for cytotoxicity associated with expression of Hepatitis delta virus antigen. *Hepatology* 13:845-851.
35. Verme G, Amoroso P, Lettieri G, Pierri P, David E, Sessa F, et al. A histological study of Hepatitis delta virus liver disease. *Hepatology* 1986;6:1303-1307.
36. Yurdaydın C. Kronik Delta Hepatit ve Tedavisi *T Klin Gastroenterohepatol* 2001, 120-107
37. Akkız H, Hepatoselüler Karsinomanın Moleküler Patogenezi. Değertekin H, Yalçın K, Türkiye’de Hepatit Delta Virüs İnfeksiyonu dünü, bu günü, yarını. Türkiye Karaciğer Araştırmaları Derneği Diyarbakır Şubesi Yayınları. 2005: 16-23.
38. Jardi R, Buti M, Rodriguez F, et al: Comparative analysis of serological markers of chronic delta infection: HDV-RNA, serum HD-Ag and anti-HD IgM. *Virol Methods* 1994, 50: 59-66.
39. Cariani, E., Ravaggi, A., Puoti, M. et al. 1992. Evaluation of Hepatitis delta virus RNA levels during interferon therapy by analysis of polymerase chain reaction products with a nonradioisotopic hybridization assay *Hepatology*, 15, 685-689
40. Wu, J. C. 2006. Diagnosis of Hepatitis D virus infection. Ed. Handa H., Yamaguchi Y. *Hepatitis Delta Virus*, Springer Science+Business Media, 81-92, New York.
41. Günaydın M. Hepatitlerde Laboratuvar Tanı Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD. Samsun 2002
42. Yalçın K. Hepatit Delta Virus infeksiyonunda klinik özellikler ve tanı. Değertekin H, Yalçın K eds. Türkiye’de Hepatit Delta Virus infeksiyonu dünü, bugünü, yarını. 1. Baskı. Türkiye Karaciğer Araştırmaları Derneği, Diyarbakır. 2005: 52-66.
43. Topalak O, Soytürk M, Okan G ve ark. DEÜTF Hepatoloji Kliniğinde HBV infeksiyonlu hastalarda Delta infeksiyon frekansı. 16. Ulusal Gastroenteroloji Haftası; Antalya 1999: 74.

44. Birben E. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Astım Allerji İmmünoloji 2006;4(2):92-94
45. Akçalı S. Şanlıgağ T. Özbakkaloğlu B. HBV DNA Saptanmasında sıvı Hibridizasyon ve Real-Time PCR Yönteminin Karşılaştırılması Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi 2005; 35:199-202
46. Reischl U, Bretagne S, Krüger D, Ernault P, Costa JM, 2003. Comparison of two DNA targets for the diagnosis of toxoplasmosis by real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. *BMC Infect Dis*, 3:7.
47. Purcell RH, Gerin JL. Hepatitis delta virus. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Raven Publishers, 1996; 2819-2829.
48. Stack G, Bove JR. Hepatitis viruses. In: Hsiung GD, Fong CKY, Landry ML, eds. *Hsiung's Diagnostic Virology*. 4th ed. New Haven: Yale University Press, 1994; 301-304.
49. Serter D. Virüs, Riketsiya ve Klamidya Hastalıkları. İstanbul: Nobel TIP Kitap evleri, 1997; 201-4.
50. Rizzetto M. The delta agent. *Hepatology* 1983;3:729-737.
51. Bayındır M, Eroğlu M, Yıldırım T, Bodur H, Alpaut S. HBsAg pozitif akut viral Hepatitlerde D Hepatiti sıklığı. *Viral Hepatit Derg* 1996;2:44-6
52. Yurdaydın C. Kronik Delta Hepatit ve Tedavisi T Klinik Gastroenterohepatol 2001, 12 s 106
53. Leblebicioğlu H. Hepatit D İnfeksiyonu : Tanı B5-2
54. Şodgren E, Bengtsson S, Knutsson M, Strebkova EA, Kidd AH, Alexeyev OA, Kidd-Ljunggren K:Recent high incidence of fulminant Hepatitis in Samara, Russia: molecular analysis of prevailing Hepatitis B and D virus strains. *J Clin Microbiol* 2000; 38:3311-3316
55. Niro GA, Laggett M, Tillman HL, et al. Efficacy of lamivudine therapy in chronic delta Hepatitis. *J Hepatol* 2003; 38(2):159A.
56. Sonsuz A. Kronik Hepatit B ve Delta Hepato-Bilier Sistem ve Pankreas Hastalıkları Sempozyum Dizisi No: 28 • Ocak 2002; 67-78



57. Erbaş O, Gürbüz Y, Acar N, Acar Y, Aytan F. HBV enfeksiyonlarında delta antikor sıklığı. *Gastroenteroloji* 1991; 2: 117-9.
58. Genç Ş. polimeraz zincir reaksiyonu arlab iv.hücresel, moleküler ve analitik teknikler kursu 2007; 12-14
59. EZ1 Virus Mini Kit v2.0 EZ1® Virus Handbook 2010
60. Quantification of Hepatitis Delta Virus genomes. genesig Advanced kit handbook HB 03.01.10
61. Meriç C, Sağlam K, tanı ve tarama testleri ile ilgili bir makalenin değerlendirilmesi <http://www.gata.edu.tr/dahilibilimler/ichastaliklari/files/dersler/334.pdf>
62. Yurdaydın C. Delta Hepatitis in Turkey: Decreasing but not vanishing and still of concern. *Turk J Gastroenterol* 2006; 17: 74-5.
63. Tang JR, Cova L, Lamelin JP, et al: Clinical relevance of the detection of Hepatitis delta virus RNA in serum by RNA hybridization and polymerase chain reaction. *J Hepatol* 1994, 21: 953-960.
64. Sakugawa H, Nakasone H, Shokita H, Kawakami Y, Nakachi N, Adaniya H, Mizushima T, Nakayoshi T, Kinjo F, Saito A, Taira M, Takaesu H, Onga N. Seroepidemiological study on Hepatitis delta virus infection in the Irabu Islands, Okinawa, Japan. *J Gastroenterol Hepatol.* 1997 Apr;12(4):299-304.
65. Viana S, Paraná R, Moreira RC, Compri AP, Macedo V. High prevalence of Hepatitis B virus and Hepatitis D virus in the western Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg.* 2005 Oct;73(4):808-814.
66. Roshandel G , Semnani S , Abdolahi N , Besharat S , Keshtkar AA , Joshagani H , Moradi A , Kalavi K , Jabbari A , Kabir MJ , H seyini SA , Sedaqat SM , Danesh A , Roshandel D , Hidayet-Mofidi SM . Prevalence of Hepatitis D virus infection in Hepatitis B surface antigen-positive subjects in Golestan province, northeast Iran. *J Microbiol İmmünoloji Infect Jun 2008; 41 (3) :227-230 abstract*
67. Djebbi A, Rebai WK, Bahri O, Hogga N, Sadraoui A, Triki H. Serological markers, viral RNA and genotype of Hepatitis delta virus in HBs antigen positive Tunisian patients *Pathol Biol (Paris).* 2009 Nov-Dec;57(7-8):518-523. Epub 2008 Nov 26.
68. Das K, Ali H, Mahmood T, Munir SM, Ahmed T, Farooq MU. Comparative analysis of disease activity in patients of chronic Hepatitis B virus, with and without superinfection with Hepatitis D virus; an experience at tertiary care centre. *J Ayub Med Coll Abbottabad.* 2008 Apr-Jun;20(2):39-42.

69. Nwokediuko SC , Ijeoma U. Seroprevalence of antibody to HDV in Nigerians with Hepatitis B virus-related liver diseases. *Niger J Clin Pract.* 2009 Dec;12(4):439-442. abstract
70. Mohammad Alizadeh AH, Ranjbar M, Tehrani AS, Keramat F, Mamani M, Rezazadeh M, Aini P, Khalilian A, Majlesi A, Hajilooi M. Seroprevalence of Hepatitis D virus and its risk factors in the west of Iran. *J Microbiol Immunol Infect.* 2010 Dec;43(6):519-523.
71. Kim HS , Kim SJ , Park HW , Shin WG , Kim KH , Lee JH , Kim HY , Jang MK . Prevalence and clinical significance of Hepatitis D virus co-infection in patients with chronic Hepatitis B in Korea. *J Med Virol.* 2011 Jul;83(7):1172-7. doi: 10.1002/jmv.22095. Epub 2011 May 3.
72. Genné D , Rossi I . Hepatitis delta in Switzerland: a silent epidemic. *Swiss Med Wkly.* 2011 Mar 18;141:w13176 doi: 10.4414/smw.2011.13176. abstract
73. Shaikh MA , Shaikh WM , Solangi GA , Shaikh BA , Soomro MA .Hepatit B yüzey antijeni pozitif karaciğer hastalıkları Hepatit D virusu enfeksiyonu sıklığı. Frequency of Hepatitis D virus infection in Hepatitis B surface antigen-positive liver diseases. *J Coll Physicians Surg Pak.* 2011 Jan;21 .:23-25. abstract
74. Khan AU, Waqar M, Akram M, Zaib M, Wasim M, Ahmad S, Niaz Z, Ali S, Ali H, Idrees M, Bajwa MA. True prevalence of twin HDV-HBV infection in Pakistan: a molecular approach. *Virol J.* 2011 Sep 4;8:420.
75. Soriano V, Grint D, d'Arminio Monforte A, Horban A, Leen C, Poveda E, Antunes F, de Wit S, Lundgren J, Rockstroh J, Peters L. Hepatitis delta in HIV-infected individuals in Europe. *AIDS.* 2011 Oct 23;25(16):1987-92.
76. De Paschale M, Manco MT, Belvisi L, Magnani C, Re T, Viganò P, Biagiotti S, Capelli F, Mazzone A, Baldacci MP, Ferrara A, Neri AL, Guastoni CM, Bonazzina RA, Brando B, Clerici P. Epidemiology of Hepatitis D virus (HDV) infection in an urban area of Northern Italy. *Enfeksiyon.* 25 Şubat 2012.
77. Gürakar M, Rizetto M, Ponzetto A, Gürakar A, Kavukçu N: Cerrahpaşa Tıp Fakültesi'nde HBsAg pozitif olgularda anti-delta sıklığı. Uluslararası V.Karaciğer Hastalıkları Sempozyumu, 25-26 Mayıs , İstanbul, Aktüel Hepatoloji S: 35-46, 1984.
78. Bozdayı M, Kural A, Özdemir S, Cengiz D, Türkvan M. Donörlerde HBsAg ve Delta Antikoru (anti-HD) Sıklığı *Endoskopi Dergisi Sayı 3 Yıl 1991*

79. Emel Türk Arıbaş, Bahar Tekin Hepatit B virus enfeksiyonlu olgularda Hepatit delta virus antikor araştırılması Genel Tıp Derg 2002;12(4):133-135
80. Özekinci T. Atmaca S. Akpolat N. Temiz H. Arıkan E. Hepatit D Virus (HDV) RNA Pozitifliği İle HDV Antikorları Arasındaki İlişkinin Değerlendirilmesi Mikrobiyoloji Bülteni 2005; 39: 345-349
81. Cesur S. Vasfi S. Çiftçi A. Balık İ. Kronik Hepatit B Enfeksiyonlu Hastalarda Anti-Hepatit Delta Virus (Anti-HDV) VE Anti-Hepatit C VİRUS (ANTI-HCV) Antikor Sıklığı. İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection) 2003; 17 (4): 395-397
82. Karaca Çetin, Karaca Nilay, Usta Taner, Demir Kadir, Kaymakoğlu Sabahattin, Beşışık Fatih, Sıdal Bilhan, Ökten Atilla Gebe popülasyonunda Hepatit B, C, D virus enfeksiyonu sıklığı ve Hepatit C virusunun perinatal yolla geçiş oranı
83. Güdücüoğlu H. , Altunbaş S. , Bozkurt H. , Baykal S., Berktaş M. Van Askeri Hastanesinde HBsAg Pozitif Askerlerde Delta Antikorumunun Araştırılması Van Tıp Dergisi: 2006;13 (4):118-120
84. İskender G. Oğan M. Sayılır K. Dirim E. Batı S. Çimentepe M. Yenigün A. Hepatit B Virüsü Enfeksiyonlu Olgularda Anti-HDV Sıklığı Acta Oncologica Turcica 2006; 39: 99-100
85. Meşe S. Hbsag Pozitif Kan Donörlerinde HDV'nin Serolojik Ve Moleküler Yöntemler Kullanılarak Araştırılması, Uzmanlık Tezi 2008 Diyarbakır
86. Koruk S , Duygu F, Karaağaç L , Koruk İ, Çakmak A, Sırmatel F Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde 2005-2009 Yılları Arasında Takip Edilen Çocuk Kronik Hepatit B Hastalarının Özelliklerinin İncelenmesi Viral Hepatit Dergisi 2010; 16(3): 87-92(103)
87. Bahcecioglu IH, Aygun C, Gozel N, Poyrazoglu OK, Bulut Y, Yalniz M. Prevalence of Hepatitis delta virus (HDV) infection in chronic Hepatitis B patients in eastern Turkey: still a serious problem to consider. J Viral Hepat. 2011 Jul;18(7):518-24. doi: 10.1111/j.1365-2893.2010.01329.x. Epub 2010 Jun 9.
88. Altınbaş Akif , Yılmaz Barış, Ekiz Fuat, Aktaş Bora, Çoban Şahin, Başar Ömer, Yüksel Osman HBsAg pozitif hastalarda delta Hepatit seropozitiflik sıklığı Cumhuriyet Med J 2012; 34: 56-59

## 8.ÖZGEÇMİŞ

### **Kişisel Bilgiler**

Adı, soyadı : Adem Ünal ULAKCI  
Uyruğu : T.C.  
Doğum tarihi ve yeri : 04.02.1982 Gaziantep  
Medeni hali : Evli  
Telefon : 0 (344) 2212337  
Faks : 0 (344) 2217239  
e-posta : ademunal27@yahoo.com

### **Eğitim**

<b>Derece</b>	<b>Eğitim Birimi</b>	<b>Mezuniyet tarihi</b>
Yüksek lisans	KSÜ Tıbbi Mikrobiyoloji	2012
Lisans	Gaziantep Üniversitesi Biyoloji bölümü	2006
Önlisans	İnönü Üniversitesi Tıbbi Laboratuvar bölümü	2003
Lise	Gaziantep M.R.Uzel End. Meslek Lisesi	1998

### **İş Denevimi**

<b>Yıl</b>	<b>Yer</b>	<b>Görev</b>
2005- 2011	KSÜ Tıp Fakültesi Hastanesi	Laborant
2011- .....	KSÜ Tıp Fakültesi Hastanesi	Biyolog

### **Yabancı Dil**

İngilizce