

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ
DOKTORA TEZİ

AFGANİSTAN POPÜLASYONUNDA HBV, HCV VE HDV MOLEKÜLER
EPİDEMİYOLOJİSİ

Abbas Ali Husseini

Danışman Öğretim Üyesi
Prof. Dr. A. Mithat Bozdayı

Şubat

2019

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Abbas Ali Husseini

İmzası

ONAY

Prof. Dr. A. Mithat Bozdayı danışmanlığında Abbas Ali Husseini tarafından hazırlanan bu çalışma 15/02/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. A.Mithat Bozdayı

İmza:

Üye: Prof. Dr Cihan Yurdaydın

İmza:

Üye: Prof. Dr. Ramazan İdilman

İmza:

Üye: Prof. Dr. Koray Ergünay

İmza:

Üye: Öğr. Üyesi. Dr. Doruk Engin

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

Afganistan Popülasyonunda HBV, HCV ve HDV Moleküler Epidemiyolojisi.

Abbas Ali Husseini

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Prof. Dr. A. Mithat Bozdayı

Afganistan genel popülasyonunda HBV, HCV ve HDV epidemiyolojik durumu ve moleküler profilini belirlemek için beş ana bölgeden rasgele 492 birey ve daha önce rapor edilen 234 HBsAg ve 44 anti-HCV pozitif hasta çalışmaya dahil edilerek HBsAg, Anti-HBc, Anti-HBs, Anti-HCV ve Anti-Delta pozitifliğini eliza testi ile ve popülasyonundaki genotipleri, alt genotipleri ve alt türleri HBV Pre S, HCV NS5B ve HDAg bölgelerinin dizilenmesi ve filogenetik analizi yöntemi ile araştırılmıştır. Ayrıca, HBV pol, HBsAg ve NS5B genlerindeki klinik açıdan önemli olan varyantları da incelenmiştir.

Anti-HBc ve HBsAg prevalensi sırasıyla % 30.28 ve % 6.3 olarak belirlenmiştir. Katılımcıların % 27.64'ü, Anti-HBs \geq 10.0 mIU / mL titresi gösterirken, % 59,95'i HBV'ye karşı duyarlıydı. Anti-HCV pozitifliği ise % 1,62 olarak tespit edilmiştir. HBsAg pozitif bireyler arasında Anti-HDV prevelansı % 2.5 tespit edilmiştir. HBV genotip D ve HDV-I'nin ilgili enfeksiyonların yaklaşık % 100'ü iken HCV genotip dağılımı % 75.86 1b, % 20.69 3a ve % 3.44 3b gösterilmiştir. HBsAg MHR'de Y100 (3/20), Q101 (1/20), G102 (3/20), T115 (9/20), P120 (1/20), T131 (1/20) mutant varyantlar gözlenmiştir. Benzer şekilde HBV pol geninde S213T (2/20), Q215P (1/20) ve N248H (20/20) mutasyonları saptanmıştır. Ayrıca C316N mutasyonu HCV 1b hastalarının % 72.7'sinde bulunmuştur.

Sonuç olarak, Afgan hastalarında çok az genotipik varyasyon olduğu söylenebilir. Nüfusun çoğunluğu, özellikle genç nesil, hassastır ve nüfustaki maruz kalma riski yüksektir.

2019, 99 sayfa

Anahtar kelimeler: HBV, HCV, HDV, epidemiyoloji, filogenetik, genotip.

ABSTRACT

PhD Thesis

Molecular Epidemiology of HBV, HCV and HDV in General Population of Afghanistan.

Abbas Ali HUSSEINI

Ankara University Biotechnology Institute

Prof. Dr. A. Mithat BOZDAYI

To determine the epidemiological and molecular profile of HBV, HCV and HDV among the general population of Afghanistan, 234 HBsAg and 44 anti-HCV positive patients and randomly selected 492 individuals from five main regions of Afghanistan included to the study to investigate HBsAg, Anti-HBc, Anti-HBs, Anti-HCV and Anti-Delta positivity by elisa test and the genotypes, sub genotypes and subtypes by sequencing and phylogenetic analysis of HBV Pre S, HCV NS5B and HDV regions. In addition, clinically important variants of HBV pol gene, HBsAg and HCV NS5B regions respectively were considered.

The Anti-HBc and HBsAg prevalence were 30.28% and 6.3% respectively. Totally 27.64% of samples presented titers of Anti-HBs \geq 10.0 mIU/mL while 59.95% was susceptible. Only 1.62% of persons were Anti-HCV positive. The Anti-HDV prevalence among HBsAg positive patient was 2.5%. The HBV genotype D and HDV-I are approximately 100% of the relevant infections, while the HCV genotype distribution is shown as 75.86% 1b, 20.69% 3a and 3.44% 3b. The observed mutant variant in HBsAg were Y100 (3/20), Q101 (1/20), G102 (3/20), T115 (9/20), P120 (1/20), T131 (1/20). Likewise, S213T (2/20), Q215P (1/20) and N248H 100% (20/20) mutations were detected in the HBV pol gene. The C316N mutation was also found in 72.7% of HCV 1b patients.

However there is little genotypic variation in Afghan patients. The majority of the population, especially the younger generation, is sensitive and the risk of exposure is high.

2019, 99 pages

Keywords: HBV, HCV, HDV, epidemiology, phylogenetic, genotype.

TEŞEKKÜR

Bu tez çalıőmasında Afganistan Ulusal Halk Sağlığı (ANPH) Enstitüsü, Halk Sağlığı Merkez Laboratuvarı (CPHL), Halk Sağlığı Bakanlığı (MoPH) Güzletim Departmanı'na, Sayın Burcu uhadar Uysal'a, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı çalıőanlarına ve Blm. Uzm. Sayın Esra Yurdcu'ya, Hepatoloji Enstitüsü'ne iőbirliklerinden dolayı teşekkür ederim.

Ayrıca bu çalışmanın gerçekleőtirilmesinde, değerli bilgilerini bizlerle paylaőan, bilim ve araştırma yönünde gösterdiği her yolun hayatıma kattığı önemini asla unutmayacağım saygıdeğer danışman hocam; sayın Prof. Dr. A. Mithat BOZDAYI'a sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	i
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
SİMGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	2
2.1. HBV, HCV VE HDV'NİN MOLEKÜLER BİYOLOJİSİ.....	2
2.1.1. HBV MORFOLOJİSİ VE FİZİKOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ.....	2
2.1.2. HBV GENOM YAPISI VE ORGANİZASYONU.....	3
2.1.3. HCV MORFOLOJİSİ VE FİZİKOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ.....	5
2.1.4. HCV GENOM YAPISI VE ORGANİZASYONU	6
2.1.5. HDV MORFOLOJİSİ VE FİZİKOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ.....	8
2.1.6. HDV GENOM YAPISI VE ORGANİZASYONU	8
2.2. VİRAL HEPATİTLERİN EPİDEMİYOLOJİSİ.....	9
2.3. HBV, HCV VE HDV GENOM VARIYANLARI VE KLİNİK ÖNEMİ.....	10
2.4. HEPATİT B, C VE DELTA SEROLOJİSİ VE TANI TESTLERİ.....	16
2.5. HBV, HCV VE HDV GENOTİPLEME YÖNTEMLERİ.....	20

2.5.1. DİZİLEME VE FİLOGENETİK ANALİZİ.....	20
2.5.2. RESTRİKSİYON FRAGMAN UZUNLUK POLİMORFİZM (RFLP).....	21
2.5.3. SEROLOJİK YÖNTEMLER.....	21
2.5.4. REAL-TİME PCR.....	21
2.5.5. OLİGONÜKLEOTİD MİKROARRAY.....	22
3. GEREKÇE VE AMAÇ.....	23
4. MATERYAL VE YÖNTEM.....	25
4.1. MATERYAL.....	25
4.2. YÖNTEM.....	27
4.2.1. SEROLOJİK TEST.....	27
4.2.2. VİRAL NÜKLEİK ASİT EKSTRAKSİYONU.....	27
4.2.3. VİRAL YÜK TAYİNİ.....	27
4.2.4. AMPLİFİKASYON.....	29
4.2.5. DİZİLEME YÖNTEMİ.....	31
4.2.6. GENOTİPLEME VE FİLOGENETİK ANALİZİ.....	31
4.2.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZİ.....	32
5. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	33
5.1. HBV, HCV VE HDV SEROLOJİK BELİRTEÇLERİN DAĞILIMI.....	33
5.2. HBV, HCV VE HDV MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİSİ SONUÇLARI.....	37
6. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	45
6.1. TARTIŞMA.....	45
6.1.1. HBV, HCV VE HDV SEROLOJİK BELİRTEÇLERİNİN EPİDEMİYOLOJİK DEĞERLENDİRİLMESİ.....	45

6.1.2. HBV, HCV VE HDV MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİK SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	47
6.2. SONUÇ.....	49
7. KAYNAKLAR	50
8. EKLER.....	66
EK-1 : VİRAL NA İZOLASYONU	67
EK-2: ÇALIŞMADA KULLANILAN PRİMER- PROBE SETLERİ	68
EK- 3: HBV REAL TİME PCR PROTOKOLU	69
EK-4: HCV REAL TİME PCR PROTOKOLU	70
EK-5: HDV REAL TİME PCR PROTOKOLU	71
EK- 6: HBV GENOTİPLEMESİ İÇİN AMPLİFİKASYON KOŞULLARI.....	73
EK- 7: HBV S VE HBV POL GENLERİ İÇEREN SEGMENTARIN AMPLİFİKASYON KOŞULLARI	74
EK- 8: HCV VE HDV RNA'DAN CDNA SENTEZİ PROTOKOLU.....	76
EK-9: NS5B AMPLİFİKASYON KOŞULLARI.....	77
EK-10: HDAG AMPLİFİKASYON KOŞULLARI	78
EK-11: SEKANSLAMA YÖNTEMİ PROTOKOLU	79
EK-12: ETİK MEKTUBU	81
9. ÖZGEÇMİŞ.....	82
10. TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR	85

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.1. HBV partiküllerinin çeşitli yapılarının şematik çizimi	2
Şekil 2.1.2. HBV genom yapısı ve organizasyonu	5
Şekil 2.1.3. HCV Virüsün şematik çizimi	6
Şekil 2.1.4. Hepatit C virüsü genom organizasyonu ve yarılmış viral proteinlerin membran topolojisi.....	7
Şekil 2.1.5. HDV genom yapısı ve organizasyonu.....	9
Şekil 2.3.1. HBsAg'ın majör hidrofilik bölgesi	11
Şekil 2.3.2. HBV global genotip dağılımı.	12
Şekil 2.3.3.Hepatit C genotiplerinin dünya çapında dağılımı.....	14
Şekil 2.3.4. HDV Global genotip dağılımı	15
Şekil 5.2.1. HBV'nin Pre-S bölgesinden distance matrix / UPGMA yöntemi ile (Kimura-2 correction ve 1000 bootstrap değeri) elde edilen filogenetik ağaç	39
Şekil 5.2.2. Afgan izolatlarının HBsAg bölgesinin 115-160 amino asit dizisi	40
Şekil 5.2.3. Afgan izolatlarının HBV polimeraz bölgesinin 160-257 revers transkriptaz (rt) domeninin amino asit dizisi.....	40
Şekil 5.2.4. HDV'nin HDAG bölgesinden distance matrix / UPGMA yöntemi (Kimura-2 correction ve 1000 bootstrap değeri) ile elde edilen filogenetik ağaç.	41
Şekil 5.2.5. HCV'nin NS5B bölgesinden distance matrix / UPGMA yöntemi (Kimura-2 correction ve 1000 bootstrap değeri) ile elde edilen filogenetik ağaç.....	43

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.3.1. Tanımlanmış HBV genotipleri ve alt genotipleri	10
Çizelge 2.3.2. HBsAg determinantlerini belirten amino asit lokasyonları	11
Çizelge 2.3.3. Tanımlanmış HCV genotipleri ve alt tipleri	13
Çizelge 2.4.1. Hepatit B serolojik test sonuçlarının yorumlanması	18
Çizelge 4.1.1. Çalışma popülasyonunun temel demografik özellikleri	26
Çizelge 4.1.2. Çalışmaya dahil edilen HbsAg ve Anti-HCV pozitif katılımcılarının temel demografik özellikleri	26
Çizelge 5.1.1. HBV ve HCV serolojik belirteçlerinin cinsiyete dayalı dağılımı	33
Çizelge 5.1.2. HBV ve HCV serolojik belirleyicilerinin coğrafi temelli dağılımı	34
Çizelge 5.1.3 Araştırılan serolojik belirteçlerin coğrafi ve cinsiyete dayalı dağılımı	35
Çizelge 5.1.4. HBV ve HCV serolojik belirteçlerin yaş tabanlı dağılımı	35
Çizelge 5.1.5 Çalışma popülasyonunun HBV serolojik yorumlama grupları	36
Çizelge 5.2.1. Çalışma popülasyonu arasında HBV, HCV ve HDV viral yük dağılımı	37
Çizelge 5.2.2. popülasyon çalışması arasında HBV, HCV ve HDV genotiplerinin ve alt tip/genotiplerinin sıklığı	44
Çizelge 5.2.3. Afgan izolatları arasında HBV S geni, HBV pol geni ve HCV NS5B bölgesinde klinik olarak önemli mutasyonların sıklığı	44
Çizelge 8.2.0.1. HBV, HCV ve HDV Viral yük tayininde kullanılan primer prob listesi ..	68
Çizelge 8.0.2.2. HBV, HCV ve HDV Genotip tespitinde kullanılan primer listesi	68

SİMGELER DİZİNİ

mM	Milimolar
μ g	Mikrogram
μ l	Mikrolitre
μ M	Mikromolar
aa	Amino asit
AMV RT	Avian Miyeloblastoz Virüsü Ters Transkriptazı
ANPH	Afganistan Ulusal Halk Sağlığı Enstitüsü
Anti-HBc	Hepatit B çekirdek antikoru
Anti-HBs	Hepatit B yüzey antikoru
Anti-HCV	Hepatit C antikoru
Anti-HDV	Hepatit C antikoru
C ⁰	Derece santigrat
cDNA	Tamamlayıcı deoksiribonükleik asit
CMIA	Kemilüminesans mikropartikül immünoassay
CPHL	Halk Sağlığı Merkez Laboratuvarı
ddH ₂ O	Çift distile su
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EMRO	Doğu akdeniz bölgesi
EtBr	Etidium bromide
HAV	Hepatit A virüsü
HbsAg	Hepatit B yüzey antijeni

HBV	Hepatit B virüsü
HCC	Hepatosellüler karsinoma
HCV	Hepatit C virüsü
HDAg	Hepatit delta antijeni
HDV	Hepatit D virüsü
HEV	Hepatit E virüsü
HIV	İnsan bağışıklık eksikliği virüsü
HTLV	İnsan T-lenfotropik Virüsü
IBBS	Integrated Biological & Behavioral Surveillance
IDU	İntravenöz ilaç kullanıcısı
IU	Uluslararası birim
KHB	Kronik HBV enfeksiyonu
KHC	Kronik HCV enfeksiyonu
mL	Mililitre
MoPH	Halk Sağlığı Bakanlığı
NA	Nükleik asit
ng	Nanogram
NS3	Yapısal olmayan protein 3
NS5A	Yapısal olmayan protein 5 A
NS5B	Yapısal olmayan protein 5 B
PCR	Polimeraz Zincirleme Tepkimesi
pmol	Pikomol
RNA	Ribonükleik asit
rt	Ters transkriptaz
SD	Standart sapma

sn	Saniye
UNICEF	Birleşmiş Milletler Çocuklara Yardım Fonu
UTR	Translasyon olmayan bölge
UV	Ultraviyole
WHO	Dünya Sağlık Örgütü



1. GİRİŞ

Viral hepatit, virüs enfeksiyonu nedeniyle ortaya çıkan karaciğer enflemasyonuna verilen isimdir. Viral hepatitin en sık görülen etmenleri hepatit A (HAV), hepatit B (HBV), hepatit C (HCV), Hepatit Delta (HDV) ve Hepatit E (HEV) virüsleridir. Kronik enfeksiyonlar HAV ve HEV virüslerinde görülmezken HBV, HCV ve HDV enfeksiyonlarında gözlemlenmektedir.(1) Siroz ve karaciğer kanserine kadar gidebilen kronik viral hepatit enfeksiyonları dünya üzerinde yüz milyonlarca insanı etkilemesiyle günümüzde global bir sağlık sorunu olmuştur.(2)

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), dünyada 3 kişiden birinin HBV veya HCV ile enfekte olduğunu ve bu hastalığın sonucunda 2015 yılında 1.3 milyon insanın öldüğünü tahmin etmiştir. Dünya çapında 2 milyar insan HBV ile enfekte olduğu ve bu kişilerin yaklaşık 185 milyonu HCV ve 20 milyon kişi de HEV ile enfekte olduğu bildirilmiştir. Yüksek endemik bölgelerde çocukların % 90'dan fazlası 10 yaşına gelene kadar HAV ile enfekte olduğu tahmin edilmiştir. Dünyanın yaklaşık 2,3 milyar insanı, bir veya daha fazla hepatit virüsü ile enfekteler. Viral hepatit her yıl yaklaşık 1,4 milyon ölümlerle sonuçlanır, bu ölümlerin yaklaşık % 90'ından HBV ve HCV sorumludur, geriye kalan % 10'luk kısım ise diğer hepatit virüslerinden kaynaklanmaktadır. Viral hepatit dünya genelinde önemli bir halk sağlığı sorunu olmasına rağmen, şimdiye kadar önceliklendirilmemiştir. Son zamanlarda, DSÖ'nün "2030 Sürdürülebilir Kalkınma Hedefleri Gündemi" viral hepatiti önlemek için özel eylemler tanımlamıştır [3].

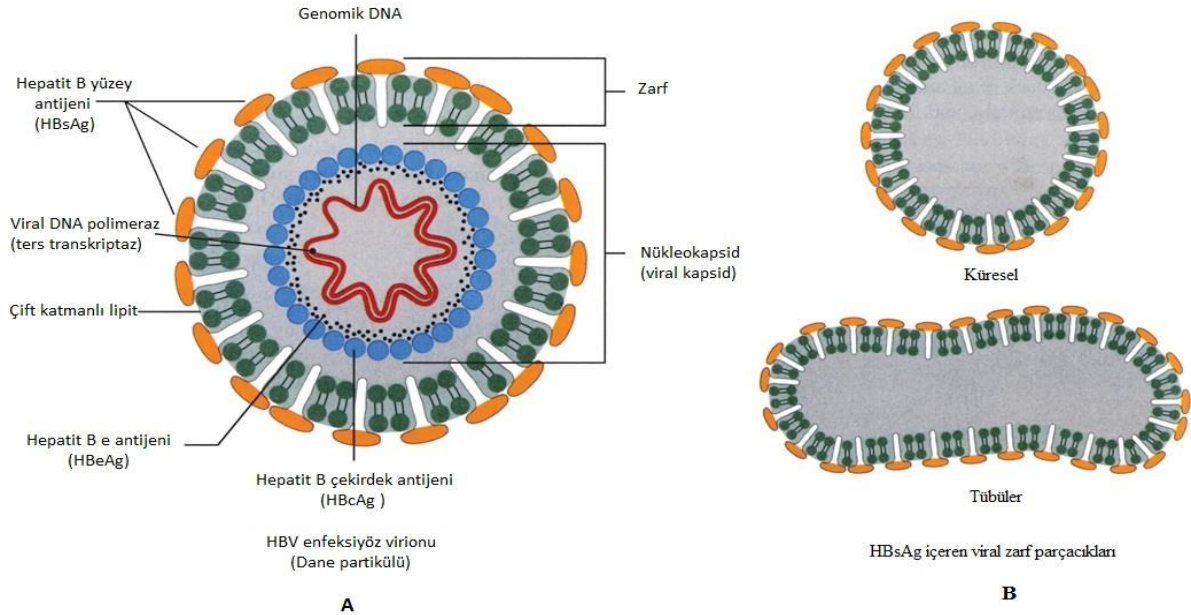
Kronik viral hepatit, çoğunlukla en az gelişmiş ülkeleri etkiler. En endemik bölgeler düşük insani gelişme endeksi ile sınırlı kaynaklara sahiptir(4). Afganistanda hepatit B ve hepatit C için endemik olmasına karşın enfeksiyonunun önlenmesi için özel bir ulusal strateji ve / veya politika / kılavuz veya gözetim sistemi bulunmamaktadır(5). Epidemiyolojik çalışmalar, önleme ve yönetimi için daha iyi stratejiler seçmenin temelini oluşturmaktadır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. HBV, HCV VE HDV'NİN MOLEKÜLER BİYOLOJİSİ

2.1.1. HBV MORFOLOJİSİ VE FİZİKOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ

HBV ile enfekte olan hastaların serumunda elektron mikroskobu ile üç tip HBV viral partikül görülmektedir. Viral partiküllerin ikisi, 20 ve 22 nm çapında daha küçük küresel veya tübüler yapılardır ve hepatit B yüzey antijeni ve konakçıdan türetilmiş lipitlerden oluşmaktadır. Bu partiküller viral nükleik asit içermediği için bulaşıcı özelliğe sahip değildir. Enfeksiyöz HBV virion (Dane partikül), yüzey antijeni (HBsAg) içeren bir dış lipoprotein kaplamasıyla çevrelenmiş 27 nm nükleokapsid çekirdekten (HBcAg) oluşan 42 nm'lik bir partiküldür. Virionun nükleokapsidi, genomik DNA'yı, ters transkriptaz (RT) aktivitesi olan bir DNA polimerazı ve primaz olarak da bilinen bir genom-bağlantılı terminal proteini (TP) içermektedir. Dış zarf, konakçı hücre zarından kaynaklanan lipit tabakası ve viral genomun kodlanlığı üç protein dizisi (Küçük (S), orta (M) ve büyük (L)) içermektedir(6).



Şekil 2.1.1. HBV partiküllerinin çeşitli yapılarının şematik çizimi (135)

(A) HBV enfeksiyöz virionunda bulunan anahtar elemanlar. (B) Küresel veya tübüler şeklinde bulunan ve enfeksiyöz olmayan HBV partikülleri

2.1.2. HBV GENOM YAPISI VE ORGANİZASYONU

Hepadnaviridae ailesine ait olan HBV, yaklaşık 3200 bazlık bir genoma sahiptir. Genomda kodlayıcı olmayan bölgeler yoktur ve tüm düzenleyici sinyaller aynı zamanda protein kodlayan dizilerin bir parçasıdır. Viral genom, kodlayan bir tam uzunlukt'a negatif zincir ve büyüklüğü değişen kodlamayan bir pozitif zincirden oluşan kısmi çift zincirli bir yapıdadır. Her iki iplikçik, genomun daireselleşmesini sağlayan iki 11-bazlık direkt tekrar dizisi olan DR1 ve DR2'yi kapsayan 200 nükleotid uzunluğunda yapışkan uçlara sahiptir. Terminal proteini, eksi iplikçiğin 5 'ucuna kovalent olarak bağlanmıştır. İki enhancer bölgesi, enhancer-I ve enhancer-II, bir U5 benzeri sekans, bir poliadenilasyon sinyali (TATA) ve glukokortikoid-duyarlı eleman (GRE) dahil olmak üzere birçok düzenleyici eleman da mevcuttur (6-8).

HBV ters transkripsiyon yöntemiyle RNA aracılı bir replikasyon sistemine sahiptir. Genom, birbiriyle çakışan 4 açık okuma çerçevesine (ORF) sahiptir ve bu okuma bölgelerinden HBV'nin tüm yapısal ve yapısal olmayan proteinleri kodlar.

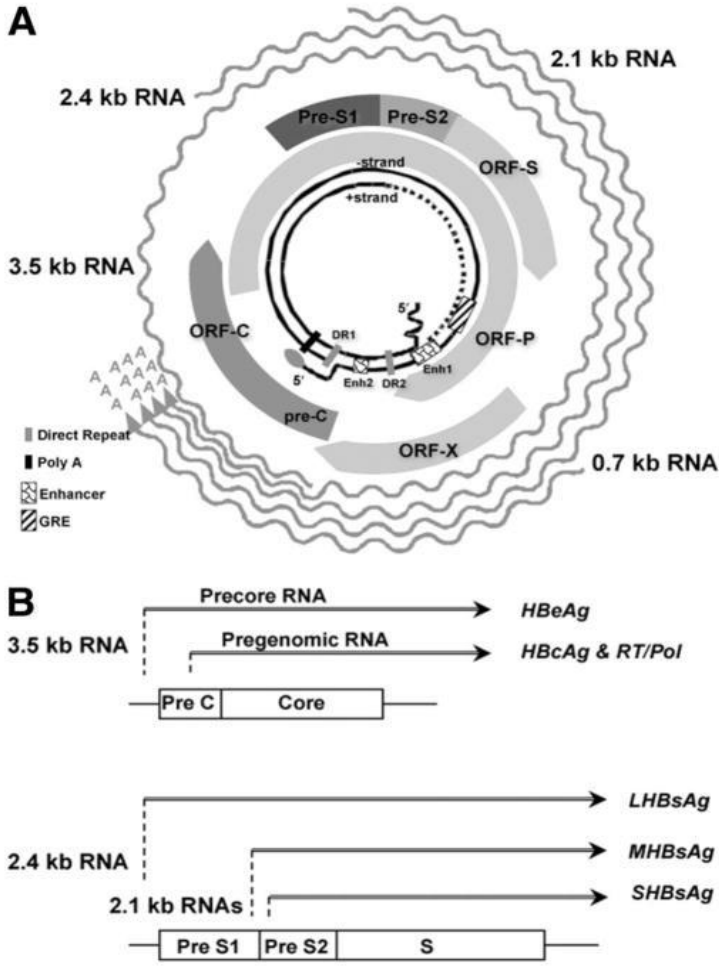
Pre S/S açık okuma çerçevesi küçük (S), orta (M) ve Büyük (L) zarf proteinlerini kodlar ve Pre-S1, Pre-S2 ve S bölgelerinden oluşmaktadır. Farklı başlama kodonları (AUG) ve ortak bir dur kodonu sahipler. Translasyon ilk AUG kodondan başladığında genin her 3 kodlama bölgelerini içeren Büyük zarf proteini (L) sentezlenir. L proteini glikozile (gp42) ve glikozile olmayan (p39) 2 formda bulunmaktadır. M proteini Pre-S2 ve S bölgeleri içerir ve ikinci AUG kodonundan translasyonu başlar. M proteini da (gp 33 ve gp36) 2 formda bulunur ve her ikiside glikozile formdadır. Pre-S1 bölgesi karaciğer membranında olan HepG2 hücreleri için bağlama bölgesi (aa 21-47) içermektedir. Pre-S2 bölgesi, HBV'nin insan hepatosit zarına bağlanmasında rol oynadığı düşünülen polimerize insan serum albümini için bağlanma bölgesi taşıdığı bulunmuştur. 226 amino asitli ana HBsAg proteini, en içteki AUG kodonundan başlatılarak üretilir ve glikozilasyon yerine bağlı olarak p24 ve gp27 olarak bulunur. HBsAg, koruyucu bağışıklık tepkisi için önemli olduğu düşünülen bir hidrofilik bölgenin katlanması için gerekli olan disülfid bağlarını oluşturan sistein kalıntıları bakımından zengindir (6).

C açık okuma çerçevesi HBcAg ve HBeAg proteinleri kodlar. Geni Pre-C ve C bölgesi olarak bölünen 2 farklı başlama kodonu içermektedir. Translasyon ilk AUG kodonundan

başladığında HBeAg öncüsü sentezlenir ve posttranslasyon modifikasyonlar sonrasında kan içinde salgılanır. HBeAg karmaşık bir biyolojik rola sahiptir ve enfeksiyon sırasında nükleokapsida özgü bağışıklık tepkisinin düzenlenmesinde rol oynar (6). P21 çekirdek proteini veya HBcAg C geninde translasyonu ikinci AUG kodonundan başlar ve kapsik oluşturmasında rol alır. Çekirdek partiküller, HBsAg'dan daha immünojeniktir ve T hücrelerine bağlı veya bağımsız immün tepkileri indükleyerek yüksek anti-HBc titreleri oluşturur (6).

P geni HBV genomunun %80'ini kaplar ve diğer 3 genleri ile kısmi olarak örtüşür ve viral polimerazı kodlar. Pol açık okuma çerçevesinin 90 kDa'luk ürünü, virüsün çoğalması için önemli olan A - D en az 4 alan içeren çok işlevli bir proteindir (6). N-terminal alanı eksi iplikçiğin 5' ucuna kovalent olarak bağlanan terminal proteinini kodlar. Sonrakı alan tanımlanmış bir fonksiyondan yoksundur ve boşluk bölgesi olarak (spacer) adlandırılır. Üçüncü alan ters transkriptaz aktivitesine sahip DNA-bağımlı DNA polimerazı kodlar. Karboksi-terminal D alanı ters transkripsiyon sırasında RNA-DNA hibritlerinde RNA'yı parçalayan bir ribonükleaz H aktivitesine sahiptir (6).

X okuma çerçevesi 154 amino asitlik ve 17.5 kDa'luk bir poliproteini kodlar. HBx, transkripsiyon faktörleri ile doğrudan etkileşime girerek çeşitli viral ve hücrel promotörler için transkripsiyonel transaktivatör olarak görev yapar. Ayrıca X proteini, hepatoselüler karsinomun agresif ilerlemesi sırasında anjiyogenez ve metastazda rol oynamıştır ve onkogenezele ilişkilendirilmiştir(6).

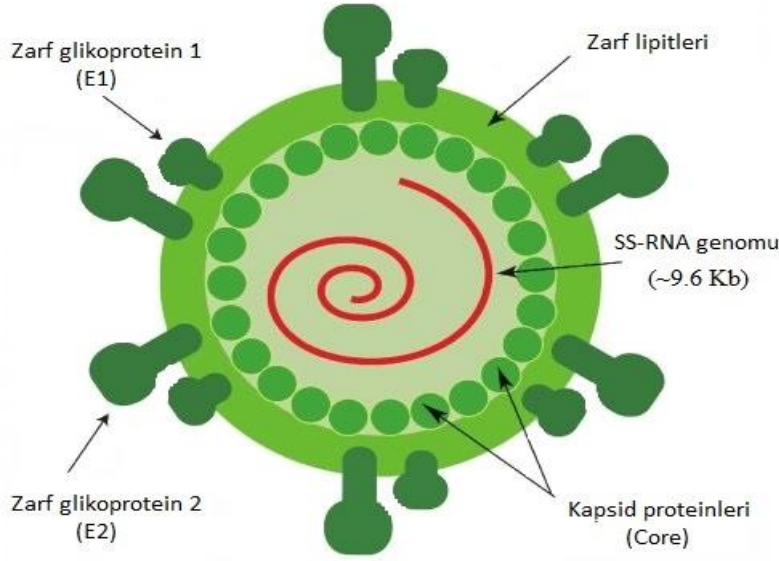


Şekil 2.1.2. HBV genom yapısı ve organizasyonu (136)

(A) Genomik organizasyon, RNA transkriptleri ve gen ürünleri birkaç önemli düzenleyici eleman ile gösterilmiştir. (B) Çeşitli HBV transkriptlerinin ve kodladıkları proteinlerin transkripsiyon başlangıç bölgeleri.

2.1.3. HCV MORFOLOJİSİ VE FİZİKOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ

HCV partikülü 40-70 nm çapındadır ve HCV genomunu içeren bir zarflı nükleokapsidden oluşup hücre içinde endoplazmik retikulumdan elde edilen membranlar ile toplanır. HCVnin zarfı, karbonhidrat ve proteinlerle (glikoprotein) birleşmiş lipidlerden oluşur ve çift katlıdır. Zarfın lipid komponentinin % 60'ı fosfolipid, geri kalanın da çoğu kolesteroldür. Peplomer denilen çıkıntıları vardır ve bunlar konakçı hücrelerine yapışmasını kolaylaştırır. Zarf, iki zarf proteinden, E1 ve E2, oluşur, bunlar virion üzerinde uzantılar oluştururlar. Zarfın içinde nükleokapsid bulunur ve genellikle ikozahedral şeklindedir (8-11).



Şekil 2.1.3. HCV virüsün şematik çizimi (137)

HCV çekirdek proteini, nükleokapsidi oluşturmak için viral genomik RNA ile etkileşir. İki membran ilişkili zarf glikoproteinleri, E1 ve E2, konakçıdan türetilen bir lipid zarf içine gömülür.

2.1.4. HCV GENOM YAPISI VE ORGANİZASYONU

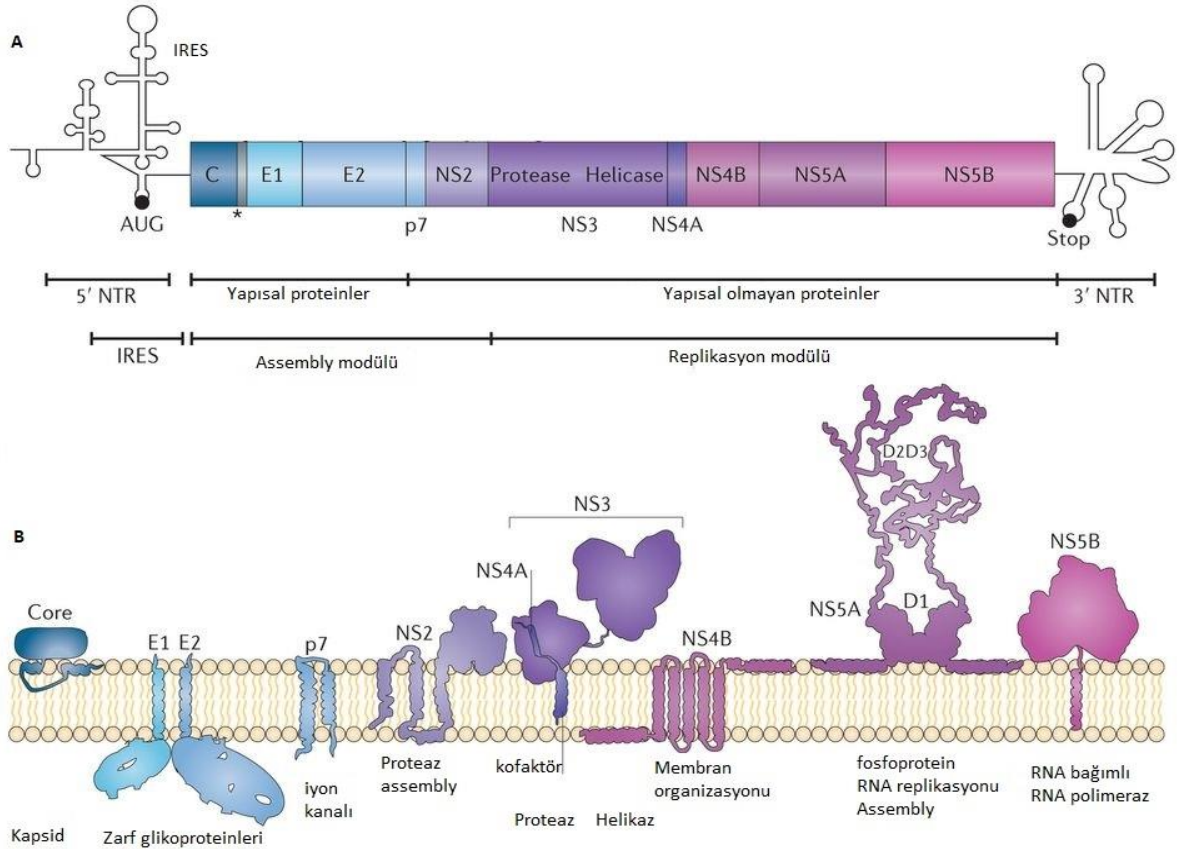
HCV virüsü *Flaviviridae* ailesi ve hepacivirüs cinsinde sınıflandırmaktadır. 9.6 kb uzunluğunda tek pozitif iplikli bir RNaya sahiptir ve 5' kodlama yapmayan bölge (5' UTR), uzun bir açık okuma çerçevesi (ORF) ve bir 3' UTR bölgesinden oluşmaktadır. Uzun açık okuma çerçevesi Kor (C), E1, E2, P7, NS2, NS3, A4, NS4B, NS5A ve NS5B bölgelerinden oluşmaktadır. HCV'nın en korunmuş bölgeleri olarak 5'UTR ve 3'UTR'nın son 99 bazı belirtilmiştir. E1 ve E2 bölgeleri de mutasyon oranı en yüksek olan bölgelerdir(6,8,12).

HCV açık okuma çerçevesi yaklaşık 3000 amino asitlik bir polipeptidi kodlar. Bu polipeptid translasyon sırasında ve sonrasında hücresel ve viral proteazlar tarafından işlenmesi ile yapısal ve yapısal olmayan (NS) olgun 10 farklı ürün olarak parçalanır(6).

HCV'nın yapısal proteinleri, polipeptidin ilk 191 amino asidinde bulunan ve nükleokapsidi oluşturan kor (C) bölgesi, HCV'nın hücresel girişinde büyük rol oynayan ve zarfı meydana getiren glikozile haldeki E1 ve E2 proteinleri ve NS2 sistein proteazının endoplazmik

retikulum lümenine translokasyondan sorumlu 63 amino asitlik P7 polipeptididir. Yapısal olmayan proteinleri arasında RNA bağımlı RNA polimeraz (RdRp), hidrofilik bir fosfoprotein olan NS5A ve NS3 serin benzeri proteaz, HCV matürasyonunda ve replikasyonunda görev yapan enzimlerdir ve bu yüzden anti-HCV moleküllerin geliştirmesinde en önemli hedef bölgeleri oluşturmaktadırlar(13).

Genomun 5' ucunda bulunan 341 nükleotidlik UTR bölgesi, HCV suşları arasında yüksek oranda korunmuş nükleotid dizisine sahiptir. Bu özellik, HCV viremisinin saptanması ve kantifikasyonu çalışmalarının hedef bölgesi olması sonucunu doğurmuştur. 5' UTR çok sayıda ' stem-loop' ve pseudoknot içeren, I ile IV numaralı dört yüksek yapısal alan içerir. II, III ve IV alanları, kor kodlama bölgesinin ilk 12-30 nükleotidi ile birlikte, ribozomlara doğrudan bağlanmaya olanak tanıyan bir 'internal ribosomal entry site' (IRES) oluşturmaktadır(14-15).



Şekil 2.1.4. Hepatit C virüsü genom organizasyonu ve yarılmış viral proteinlerin membran topolojisi (138).

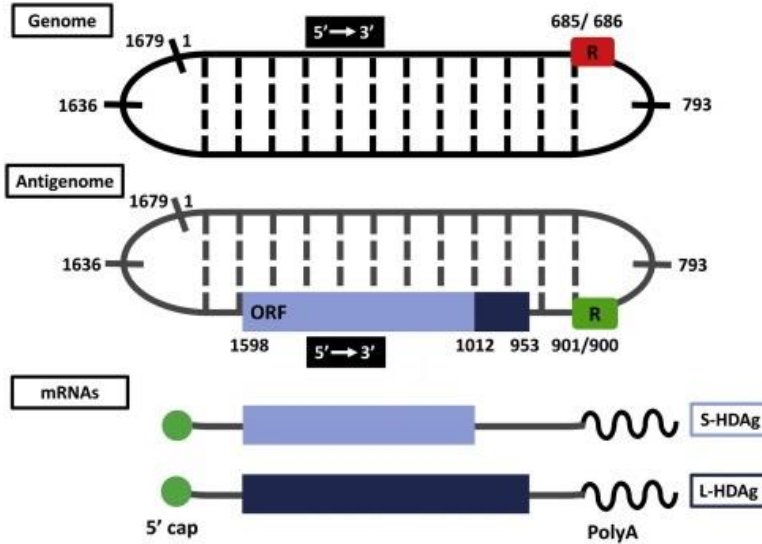
2.1.5. HDV MORFOLOJİSİ VE FİZİKOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ

Hepatit Delta virüsü, sadece hepatit B virüs enfeksiyonu olan kişilerde viral hepatit etkeni olabilen 36 nm'lik küresel bir defektif virüstür. HBsAg'den oluşan bir zarfı vardır. Zarfın içinde HDAg ve RNA'dan oluşan nükleokapsid bulunur. HDV'nin viral taksonomideki yeri satellit virüsler içerisinde kabul edilmektedir. Satellit virüslerinin özelliği, ancak kendine yardımcı ("helper") bir virüsle infekte olan konakta hastalık oluşturmasıdır. Delta hepatitin yalnızca HBV ile infekte bireylerde ortaya çıkmasının nedeni kendi zarf proteinini kodlamıyor olması ve geçiş için hepatit B yüzey antijenini (HBsAg) kendi zarf proteini olarak kullanmasıdır. Diğer satellit virüslerinden farklı olarak HDV bağımsız olarak replike olabilmekte ve yardımcı virüsü HBV ile dizi homolojisi göstermemektedir. HDV'nin dairesel RNA genomu ve replikasyon şekli subviral bitki patojenleri ve viroidlerine benzemektedir. Kısmen diğer hayvan virüsleri ile bir ilişki göstermemesinden dolayı taksonomik olarak tek başına Deltavirüs cinsine dahil edilmiştir (16).

2.1.6. HDV GENOM YAPISI VE ORGANİZASYONU

HDV RNA, dairesel, tek zincirli ve birbirini ile yüksek derecede komplementer olan yaklaşık 1700 nükleotitten oluşan, bugüne kadar tanımlanmış en küçük hayvan virüsü genomudur (17). HDV RNA, içerdiği komplementer nükleotitler ile kendi üzerine katlanabilir ve %70 oranında intra-moleküler baz eşleşmesi yaparak dallanmamış çomaksı ikincil yapı oluşturur (18). Bu nedenle viral RNA çift iplikli gibi görünür. HDV RNA'nın kararlılığı da buradan kaynaklanır.

HDAg, HDV tarafından kodlanan tek proteindir. HDAg'nin iki formu gözlenir: büyük formu (LHDAg), 27 kilodalton ve küçük formu (S-HDAg) 24 kilodaltondur. Nükleokapsid oluşumundaki rolünün yanı sıra, HDAg, viral replikasyonda önemli rol oynar. S-HDAg, viral RNA replikasyonu için gereklidir, L-HDAg ise RNA replikasyonunu engeller fakat virion oluşumu için gereklidir. Kendi nükleer lokalizasyonunu belirleyen, dimerizasyon için ve RNA başlanması için gerekli diziler içerir. Viral RNA içinde küçük bir bölge (85 nükleotidlik) bir ribozim aktivitesi gösterir. RNA, protein faktörlerin yokluğunda kendini kesebilir. Hastalığın seyri boyunca HDV RNA da evrimleşmekte ve nükleotid dizileri değişikliğe uğrayabilmektedir(8).



Şekil 2.1.5. HDV genom yapısı ve organizasyonu (139).

2.2. VİRAL HEPATİTLERİN EPİDEMİYOLOJİSİ

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre karaciğer yetmezliği ve karaciğer kanserinin en yaygın nedeni HBV ve/veya HCV ile uzun süreli enfeksiyonlardır. Viral hepatit, 2015 yılında 1.34 milyon ölüme neden olmuştur. 2015'teki viral hepatit ölümlerinin çoğu, kronik karaciğer hastalığına (siroza bağlı 720 000 ölüm) ve karaciğer kanserine (hepatosellüler karsinoma (HCC) bağlı 470 000 ölüm) bağlı olduğu bildirilmiştir. Küresel olarak, 2015'te tahmini olarak 257 milyon insan kronik HBV enfeksiyonu (KHB) ve 71 milyon kişi kronik HCV enfeksiyonu (KHC) ile yaşamıştır (19-20). HDV prevalansı ise nispeten daha düşüktür. HDV, replikasyon için HBV'ye ihtiyaç duyan satellit bir virüstür ve HBV enfeksiyonuyla karşılaşmış hastaların yaklaşık %5'inin HDV ile koenfekte olduğu tahmin edilmektedir ki bu da yaklaşık 10-15 milyon insanın HDV ile tanıştığı anlamına gelmektedir (21). HBV kaynaklı salgın çoğunlukla Afrika Bölgesi ve Batı Pasifik Bölgesi'ni etkiler. HCV'nin neden olduğu salgın ise tüm bölgelerde etkide bulunur ve bölgeler arasında büyük farklılıklar göstermektedir. Doğu Akdeniz Bölgesi ve Avrupa Bölgesi, bildirilen en yüksek HCV prevalansına sahiptir (19-20).

Doğu Akdeniz Bölgesinde (EMRO) genel nüfusun yaklaşık % 3,3 ve % 2.3'ü sırayla HBV ve HCV ile enfektelidirler(19-20). Afganistan'da 2015 yılında 1804 hepatit vakası teşhis edilip rapor edilmiştir. Bunlardan 1343'ü hepatit B ve 461'i hepatit C olarak bildirilmiştir ancak etkili bir raporlama sisteminin bulunmaması nedeniyle, bu ülkedeki gerçek hasta sayısı önemli derecede yüksek olabilir (22). HBV ve HCV'nin genel nüfusta tahmin edilen

prevalansı, ülkenin farklı kesimlerinde sırasıyla yaklaşık % 2 - % 5.6 ve % 0.2- % 1.1 teahmin edilmektedir (23-26). HDV prevalansı hakkında güncel bilgi bulunmamaktadır.

2.3. HBV, HCV VE HDV GENOM VARIYANTLARI VE KLİNİK ÖNEMİ

Viral hepatit enfeksiyonunun sonuçları konakçıya ve viral faktörlere bağlıdır. Virüslerin viral nükleotid dizilimindeki değişim, enfeksiyonların sonuçlarını etkileyen en önemli faktörlerden biridir (27-28). Genom sekanslarındaki varyasyona göre, hepatit virüsleri birçok genotipe ve alt genotipe ayrılmaktadır.

HBV genotipi, gruplar arası tüm genom dizisinde farklılık % 8'dan daha fazla olması ile veya S geni düzeyinde farklılık % 4'tan daha fazla olması ile tanımlanmaktadır (7,29-30). Alt genotipler arasında ise farklılık % 4 - % 8'dir (29). Bugüne kadar coğrafi dağılımında farklılık gösteren on tanınmış (A-J) HBV genotipi tespit edilmiştir. A-D, F ve I genotipleri çeşitli alt genotiplere ayrılmıştır; E, G, H ve J genotipleri için henüz alt genotip tanımlanmamıştır (Çizelge 1.2.1) (31-32).

Çizelge 2.3.1. Tanımlanmış HBV genotipleri ve alt genotipleri

		Genotipler									
Alt Genotipler		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
		A1	B1	C1	D1	-	F1	-	-	I1	-
		A2	B2	C2	D2		F2			I2	
		A3	B3	C3	D3		F3				
		A4	B4	C4	D4		F4				
			B5	C5	D5						
				C6-C12	D6						
				C13-C15							
				C16							

HBV, aynı zamanda HBsAg antijenindeki farklılıklara göre de farklı serotiplere ayrılmaktadır. HBsAg'nin 5 ayrı antijenik determinanı vardır. Bunlar; a, d, y, w ve r antijenleridir. HBsAg'lerin tümünde " a " antijenine ek olarak, d veya y ile w veya r antijenleri bulunur. Dolayısıyla HBV genotipleri, HBsAg determinantlarına göre ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adw2, adw4, adr q(-) ve adr q(+) olmak üzere 9 subtip'e ayrılır(7,30).

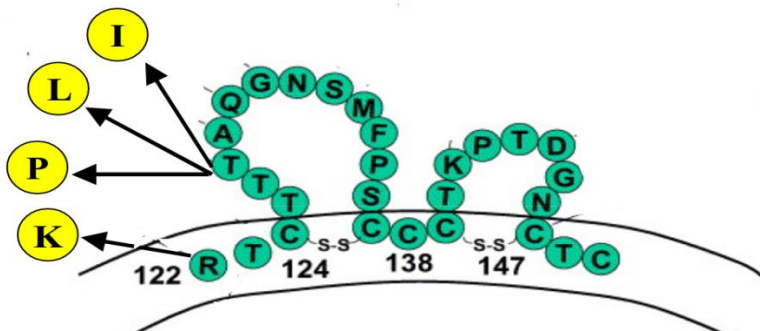
HBV'nin serolojik varyasyonların moleküler temeli, S geni ürünü olan HBsAg'nin amino asit dizisine dayanır. HBsAg'nin 122 ve 160 lokasyonlarındaki varyasyonları, sırasıyla d/y ve w/ r tanımlar ve lokasyon 127 w1 / w2, w3 ve w4 olarak adlandırılan bir alt belirleyiciler için önemlidir.

Çizelge 2.3.2. HBsAg determinantlarını belirten amino asit lokasyonları

Pozisyon	Amino Asit	Belirleyici
122	Lys	d
122	Arg	y
127	Pro	w1*/ w2
127	Thr	w3
127	Leu/Ile	w4
160	Lys	w
160	Arg	r

W1 reaktivitesi ayrıca Arg122, Phe134 ve / veya Ala159 gerektirir.

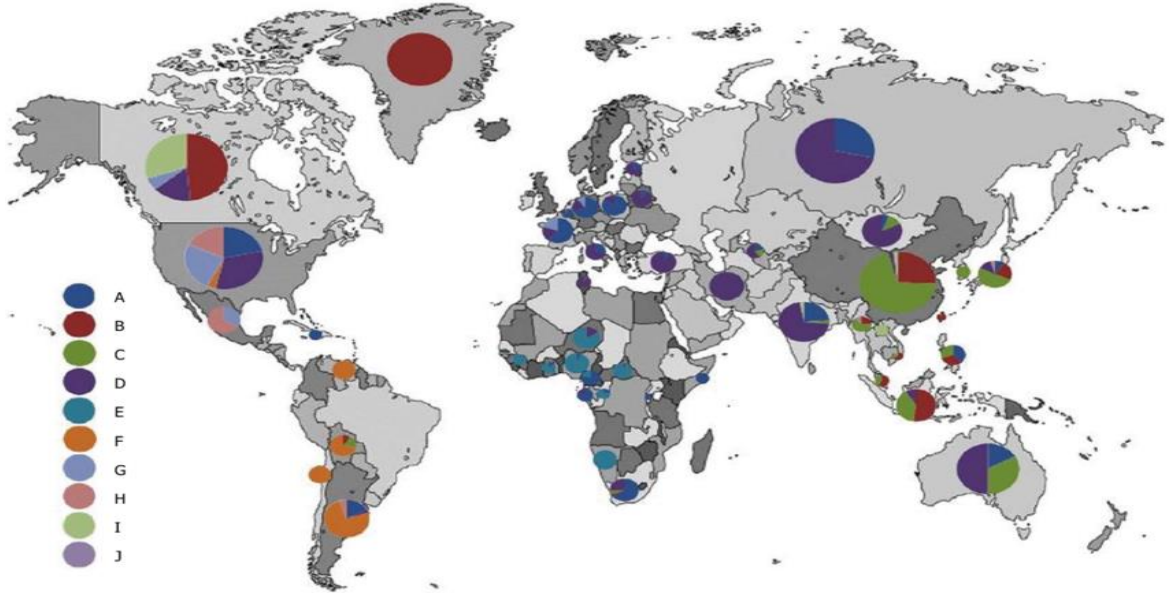
a determinanı, HBsAg'nin başlıca antijenik bölgesidir. Amino asit 122 ve 137 ile 139 ve 149 arasında yer almakta ve birkaç disülfid bağı tarafından tutulan iki konformasyonel loop oluşturur. a determinanı, doğal enfeksiyon veya aşılama ile ortaya çıkan anti-HBs antikorlarının nötralize edilmesinin hedefidir(6).



Şekil 2.3.1. HBsAg'in majör hidrofilitik bölgesi (6)

HBV'nin farklı genotipleri coğrafi dağılışıda farklılıklar göstermektedir. Genotip A genel olarak Kuzey Avrupa, Kuzey Amerika, Hindistan ve Afrika'da bulunurken, genotip B ve C Asya'da prevalanttır. Genotip D ise daha çok güney Avrupa, Orta Doğu ve Hindistan'da bulunmaktadır. E genotipi Afrika'da, F genotipi orta ve güney Amerika'da, G genotipi kuzey ve orta Amerika ve avrupanın bazı bölgelerinde, H genotipi ise orta ve güney Amerika'da yaygın olarak görülmektedir (33-36). Genotip I uzun bir süre Asya'nın geniş bir alanında endemik olmuştur. Genotip I, A / C / G / genotiplerinin bir rekombinantıdır. genotip 'J' Japonya'da bulundu ve aslında genotip C ve gibbon HBV'nin rekombinantıdır (7). Göçmenlik HBV'nin genotip ve altgenotipi coğrafi olarak yayılımını değiştirebilecek bir etkidir. Önümüzdeki birkaç on yıl içinde, HBV epidemiyolojik desenleri tamamen göç dalgaları tarafından değişeceği tahmin edilmiştir (37).

HBV genotiplerinin dünya çapındaki dağılımı aşağıda gösterilen şekil 1.2.1'de özetlenmiştir.



Şekil 2.3.2. HBV global genotip dağılımı(38).

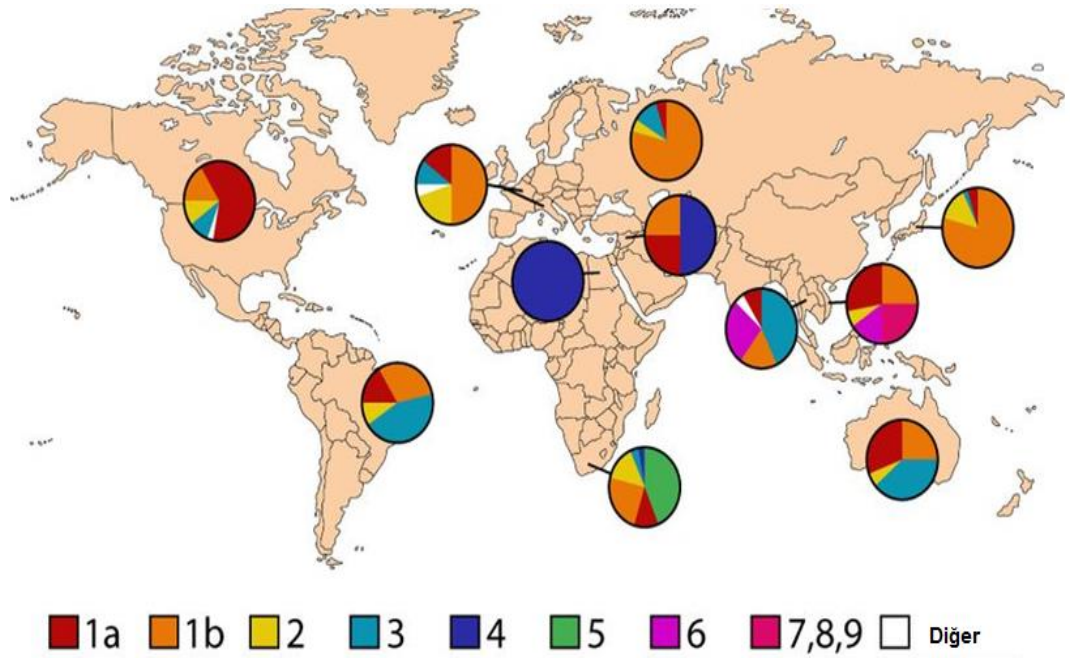
HCV genomunun analizi sonucunda (en korunmuş olan 5' UTR ve en değişken olan E bölgesi dahil), genom boyunca % 33 - % 35 sekans farklılıkları gösteren yedi farklı genotipi (1 ila 7) tespit edilmiştir. Her genotip, birbirinden en az % 15 dizi farkı gösteren birkaç alt türe (a, b, c olarak adlandırılır) ayrılmıştır (Çizelge 1.2.2) (12, 39-42).

Çizelge 2.3.3. Tanımlanmış HCV genotipleri ve alt tipleri

		Genotipler						
		1	2	3	4	5	6	7
Alt Tipler	1a	2a	3a	4a	5a	6a	7a	
	1b	2b	3b	4b		6b	7b	
	1c	2c	3d	4c		6c		
	1d	2d	3e	4d		6d		
	1e	2e	3g	4f		6e		
	1g	2f	3h	4g		6f		
	1h	2i	3i	4k		6g		
	1i	2j	3k	4l		6h		
	1j	2k		4m		6i		
	1k	2l		4n		6j		
	1l	2m		4o		6k		
	1m	2q		4p		6l		
	1n	2r		4q		6m		
		2t		4r		6n		
		2u		4s		6o		
				4t		6p		
				4v		6q		
				4w		6r		
						6s		
						6t		
					6u			
					6v			
					6w			
					6xa			
					6xb			
					6xc			
					6xd			
					6xe			
					6xf			

Viral replikasyon sırasında, gerçekleşen mutasyonlar yüzünden vücuttaki virüslerin dizisinde değişikliğe uğramakta ve türümsü (% 1-9 dizi farklılığı) denilen farklılığa neden olmaktadır. Bu mutasyonlar yüzünden sürekli baskın olan türümsüler ortadan kalkıp yeni türümsüler baskın hale gelmektedir. Bu süreç virüsün savunma sisteminden kaçmasına yardımcı olur ve hastalığın kronikleşmesinin bir nedenidir. Enfekte olan hastada milyonlarca farklı türümsü bulmaktadır (43).

Diğer bütün RNA virüslerinde olduğu gibi HCV genomu da buldukları coğrafi bölgelere göre farklılık göstermektedir. HCV 1, 2 ve 3 genotipleri dünya üzerinde yaygın bir dağılıma sahip olmasına rağmen relatif prevalansları bir bölgeden diğerine farklılık göstermektedir. HCV 1a ve 1b genotipleri Amerika'da ve Avrupa'da oldukça prevalanttır. HCV 1b alt-tipi Japonyadaki HCV enfeksiyonlarının %73'ünden sorumlu olduğu gösterilmiştir (44). HCV 2a ve 2b genelde Kuzey Amerika, Avrupa'da bulunurken, 2c genotipi kuzey İtalya'da tespit edilmiştir. Genotip 3a özellikle Avrupa ve Amerika'daki intravenöz ilaç bağımlılar (IDUs) arasında görülmektedir (45). HCV genotip 4 Kuzey Afrika'da ve Orta doğu'da gözlenirken (46-47), genotip 5 Güney Afrika'da ve genotip 6 da tipik olarak Honkong ve Güneydoğu Asya'da tespit edilmiştir (48). Genel olarak HCV genotip 1,2 ve 3 dünya çapında yaygın iken genotip 4 orta doğu ve afrikada dominant genotipler olup genotip 5 güney afrikada ve genotip 6 ve 7 güney doğu asyada dominant genotiplerdir (Şekil 1.2.2)(43).



Şekil 2.3.3.Hepatit C genotiplerinin dünya çapında dağılımı(49)

Aynı şekilde hepatit Delta, tüm genomda yaklaşık % 40 dizi çeşitliliği ile veya hepatit delta antijeninin amino asit sekansı boyunca yaklaşık % 35 fark ile HDV1-HDV8 genotiplerine sınıflandırılmıştır (50-51). Genotipler içinde dizi değişikliği %5-%14 (< %14-%15.7) değişmektedir. HDV türümsü heterojenitesi ise %2'den daha küçüktür (51). HDV II genotipi 2a, 2b ve 2c alt tiplere ayırmaktadır. Diğer genotiplerinde ise alt tipi tanınamamaktadır.

HDV-1 genotipi dünya üzerinde Avrupa, Kuzey Amerika, Afrika ve bazı Asya bölgelerini kapsayan geniş bir yayılımı vardır. HDV-2 Japonya, Tayvan, Rusya gibi Asya'nın bazı bölgelerinde prevalanttır. Genotip 3 en fazla Orta ve Güney Amerika'da ve özellikle Amazon Bölgesi'nde görülmektedir. Genotip 4'ün en prevalant olduğu yerler Japonya ve Tayvan'dır. HDV 5-8 genotipleri ise Afrika'da görülmektedir (52-57).

HDV genotipleri dünya çapında dağılımı şekil 1.2.3'te özetlenmiştir.



Şekil 2.3.4. HDV Global genotip dağılımı(58)

Bu sekans değişiklikleri, viral hepatit enfeksiyonunun seyri ve sonucunda farklılıklara yol açmaktadır. Farklı hepatit B genotipleri, karaciğer hastalığının şiddeti ve kronikliği,

hepatoselüler karsinom gelişimi, antiviral tedaviye yanıt ve karaciğer transplantasyonu gibi farklı klinik paternler ile ilişkili olduğu gösterilmiştir(59).

HDV genotipleri hastalığın seyrini etkilemektedir. Genotip 1 hastalığın hem şiddetli hem de ılımlı formunda gözlemlenirken, kronik HDV-2 enfeksiyonu seyri daha ılımlıdır. HDV-3 genotipi ise HDV enfeksiyonlarının en agresif formuyla ilişkilendirilmiştir (60-61). Farklı HDV genotiplerinin yanı sıra, farklı bölgelerde bulunan aynı genotipe sahip HDV izolatlarının patojenitelerinde bile farklılıklar görmek mümkündür (62).

Benzer şekilde, hepatit C virüsünün farklı genotipleri, hastalığın doğal seyri, hepatosellüler karsinom gelişimi ve tedaviye yanıt gibi sonuçların üzerine etkisi çeşitli çalışmalarda kanıtlanmıştır (63-68).

Ayrıca genomdeki varyantlar, enfeksiyonun spesifik bir klinik seyri ile de ilişkili olabilir. Spesifik mutasyonlar, bağışıklık kaçışı veya antiviral direnci üzerinden viral klirensi azaltabilir. Dahası, zarf epitoplarının mutasyonları, 'teşhisten kaçış' veya 'aşı kaçışına neden olan antikolar tarafından tanınmayan varyantlara yol açabilir (69-71).

2.4. HEPATİT B, C VE DELTA SEROLOJİSİ VE TANI TESTLERİ

Hepatit B serolojik testi, birkaç hepatit B virüsü (HBV) spesifik antijen ve antikorun ölçümünü içerir. Farklı serolojik “belirteçler” veya markör kombinasyonları, HBV enfeksiyonunun farklı fazlarını tanımlamak ve bir hastanın akut veya kronik HBV enfeksiyonu olup olmadığını belirlemek, daha önce enfeksiyon veya aşılama sonucu HBV'ye karşı bağışıklık kazandırmak veya enfeksiyona yatkın olup olmadığını belirlemek için kullanılır. HCV enfeksiyonunun virolojik teşhisi, iki kategorideki laboratuvar testine dayanır, yani HCV'ye özgü antikor (anti-HCV) (dolaylı testler) tespit eden serolojik testler ve HCV viral partiküllerinin bileşenlerini tespit edebilen, ölçen veya karakterize eden HCV RNA ve çekirdek antijeni (doğrudan testler) analizler. Doğrudan ve dolaylı virolojik testler, enfeksiyonun teşhisinde, terapötik karar vermede ve tedaviye verilen virolojik cevabın değerlendirilmesinde kilit bir rol oynar (75). HDV ile enfekte olan tüm hastalarda ise, HDV'nin kodlanmış tek protein olan delta antijenine karşı antikolar geliştirir. HDV tanısı, total anti-HDV antikolarının saptanmasına dayanır (80).

HBV enfeksiyonu serolojik tanısını olanak tanıyan tanı paneli aşağıda belirlenen markörler içermektedir:

HBsAg: Hepatit B yüzey antijeni, mevcut enfeksiyonun bir belirteçidir ve varlığı, aktif enfeksiyonun kanıtı olarak kabul edilir. Enfeksiyonun ileşmesi halinde HBsAg'nın 4-6 ay içinde kaybolur. Aksine HBsAg'nın kanda 6 aydan daha uzun bir süre bulunması hastalığın kronikleşmenin bir işareti olabilir (72-74).

Anti-HBs: HBsAg'ye karşı oluşan antikordur ve HBsAg'nin serumdan kaybolmasından bir süre sonra saptanabilir. Varlığı, HBV enfeksiyonuna, aşılama veya doğal enfeksiyon sonucunda elde edinilmiş bir bağışıklık yanıtı göstermektedir. AntiHBs titresi ≥ 10 IU/ml koruyucu düzey olduğu kabul edilir. Enfeksiyon sonrasında oluşan anti-HBs, anti-HBc ile beraber ömür boyu saptanabilir düzeyde kalır. Aşılama sonrasında ise serumda tek başına tespit edilir. Bazı kronik HBV enfeksiyonu olgularında HBsAg ile beraber düşük titrede anti-HBs saptanabilir (72-74).

Anti-HBc (total): Akut hepatit B'deki semptomların başlangıcında ortaya çıkar ve yaşam boyu devam eder. Anti-HBc'nin varlığı, HBV enfeksiyonuna daha önce maruz kalmış olması veya devam eden enfeksiyonu göstermektedir (72-74).

IgM anti-HBc: Pozitiflik, hepatit B virüsü (<6 ay) ile yakın zamanda bulaştığını göstermektedir ve varlığı akut enfeksiyonu işaret etmektedir. Pencere döneminde tek pozitif göstergedir. 3-12 ayda serumdan kaybolur (72-74).

HBeAg: Hepatit B "e" antijeni yüksek derecede HBV enfektivitesinin bir belirteçidir ve yüksek düzeyde HBV replikasyonu ile korelasyon gösterir. Varlığı, virüsün çoğaldığını ve enfekte kişinin yüksek düzeyde HBV'ye sahip olduğunu gösterir. HBsAg ile beraber veya çok kısa bir süre sonra serumda tespit edilebilir ve iyileşen bireylerde HBsAg'nin kaybolmasından birkaç gün önce negatifleşir (72-74).

Anti-HBe: Hepatit B "e" antijenine karşı antikor, enfekte olmuş veya bağışıklık kazanılmış bir insanda mevcut olabilir. Kronik HBV enfeksiyonu olan kişilerde varlığı düşük viral titresi ve düşük derecede enfektivite olduğunu düşündürmektedir (72-74).

Yukarıda belirlenen belirteçlerin bir veya daha fazlası pozitif olması halinde enfeksiyon ile ilgili farklı şekilde yorumlanmaktadır. HBV ile ilgili serolojik belirteçlerin yorumlanması hakkında detaylı bilgi çizelge 2.4.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.4.1. Hepatit B serolojik test sonuçlarının yorumlanması

HBsAg Anti-HBc Anti-HBs	Negatif Negatif Negatif	Duyarlı
HBsAg Anti-HBc Anti-HBs	Negatif Pozitif Pozitif	Doğal enfeksiyon yolu ile kazanılmış bağışıklık
HBsAg Anti-HBc Anti-HBs	Negatif Negatif Pozitif	Aşılama sonucunda kazanılmış bağışıklık
HBsAg Anti-HBc IgM anti-HBc Anti-HBs	Pozitif Pozitif Pozitif Negatif	Akut enfeksiyon
HBsAg Anti-HBc IgM anti-HBc Anti-HBs	Pozitif Pozitif Negatif Negatif	Kronik enfeksiyon
HBsAg Anti-HBc Anti-HBs	Negatif Pozitif Negatif	Belirsiz: 3 ihtimal 1-çözülmüş enfeksiyon 2-yanlış pozitif 3-“Düşük seviye” kronik enfeksiyon

Serum veya plazmada HBV-DNA'nın varlığı aktif HBV enfeksiyonunu belirtir ve viral yüke bağlı olarak hastanın enfektivitesi ile koreledir. Testler hassasiyet ve standardizasyon bakımından farklılık gösterir. Bu testler prognozu değerlendirmek ve HBV tedavisini yönlendirmek için kullanılabilir(74).

HCV enfeksiyonu tanısı için bugün kullanılan en pratik yöntem antikor aranmasıdır. Bu amaçla, Bugüne dek dört kuşak eliza testi kullanılmıştır. İlk kuşak testler (EIA-1), tek bir rekombinant HCV klonundan elde edilmiştir. NS3 genin bir kısmı ile NS4 geni ürününün tamamını içermişlerdir. Duyarlılık ve özgüllük düşük olup, serokonversiyonu saptamada yetersiz kalmışlardır. İkinci kuşak eliza testleri (EIA-2), kor ve NS3 bölgelerinden rekombinant proteinler içermektedirler. Üçüncü kuşak testlerde (EIA-3) bunlara ek NS5ten bir rekombinant protein eklenmiştir. Üçüncü kuşak testlerinin duyarlılık ve özgüllüğü ikinci kuşak testlerden daha yüksek olup % 97-99dur. Dördüncü kuşak testlerde kullanılan

proteinler daha da çeşitlendirilerek genotip 1a, 1b, 2 ve 3 virüslerin NS3 ve NS4 proteinleri de eklenerek duyarlılık üçüncü kuşak testlere göre % 10-20 arttırılmıştır. Ayrıca üçüncü ve dördüncü kuşak testler serokonversiyonu daha kısa sürede saptayabilmektedirler (76-79).

HCV ile enfeksiyon teşhisinde esas dayanak başlangıçta HCV (anti-HCV) antikoları için taramaktır. Nükleik asit amplifikasyon testleri (NAT) doğrulayıcı araçlar olarak ve ayrıca tedaviye başlamadan önce viral yükü belirlemek için kullanılır. Genotipleme, yanıt olasılığını tahmin etmek ve optimal tedavi süresini belirlemek için klinik yönetimde önemli bir araçtır (75).

Eliza ile HCV'nin çekirdek antijeninin tespiti için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bu analizler, maliyet sorunları nedeniyle moleküler laboratuvar hizmetlerinin bulunmadığı veya yaygın olarak kullanılmadığı, kaynak sınırlı ortamlarda kullanılacak NAT alternatifleri olarak öngörülmüştür. Bu analizler eliza'ya dayandığından, kullanıcı dostudur, daha az teknik uzmanlık gerektirir ve moleküler tekniklere kıyasla daha ucuzdur. Değerlendirmeler, HCV çekirdek antijen testinin, mevcut üçüncü kuşak anti-HCV tarama analizlerinden yaklaşık 40-50 gün önce, HCV enfeksiyonunun NAT kadar etkili olduğunu tespit ettiğini göstermiştir. HCV çekirdek antijen seviyeleri, HCV RNA dinamiklerini yakından takip eder ve HCV genotipinden bağımsız olarak bir hastanın tedavisinin klinik izlenmesine izin verir. HCV çekirdek antijen testinin en büyük kısıtlılığı, faydasını sınırlayan düşük duyarlılığıdır(75).

Anti-HDV IgM , kronik olarak HDV ile enfekte olan hastalarda kalıcıdır. HDV serolojisi için ticari testler uzun yıllardır mevcuttur ve dünya çapında rutin olarak kullanılmaktadır. HDV RNA tespiti / kantifikasyonu şu anda HDV replikasyon durumunu doğrulayan ve enfekte olmuş hastaların optimal yönetimini sağlayan tek doğru teşhis aracıdır (80).

Moleküler temelli analizler kronik viral hepatit tedavisi için paha biçilmez bir araçtır. Kan bağışlarını test etmek, aktif enfeksiyonu teşhis etmek, prognozu belirlemeye yardımcı olmak, tedavi kararlarını yönlendirmek ve tedaviye verilen virolojik cevabı değerlendirmek için kullanılabilirler. Günümüzde hem kalitatif hem de kantitatif yönden viral genomu araştırmaya yönelik çok duyarlı PZR yöntemleri bulunmaktadır. Moleküler tanı konusunda en önemli gelişme real time PZR tekniğinin ortaya çıkmasıdır. Böylece kantitatif sonuçlar daha kısa sürede verilmektedir. Ancak çeşitli kantitatif test sonuçları arasında

standardizasyon sorunu bulunmaktadır. Bununla birlikte, az gelişmekte olan ülkelerde finansal kısıtlamalar ve klinik ortamlardaki teknik uzmanlık eksikliği nedeniyle, bu testlerin yapılması zor ve zaman alıcıdır. Bu ortamlarda, en yaygın kullanılan tarama testleri, hızlı immünolojik tahlilleridir.

2.5. HBV, HCV VE HDV GENOTİPLEME YÖNTEMLERİ

Virolojik testler, enfeksiyonu teşhis etmek ve en önemlisi tedavi kararlarını yönlendirmek ve antiviral tedaviye virolojik cevabı değerlendirmek için gerekli hale gelmiştir. Değişken duyarlılık, özgüllük, zaman alıcı ve maliyete sahip farklı genotipleme metodları geliştirilmiştir. Aşağıda HBV, HCV ve HDV genotiplemede yaygın olarak kullanılan yöntemler özetlenmiştir.

2.5.1. DİZİLEME VE FİLOGENETİK ANALİZİ

HBV genotipleme için altın standart yöntem, tüm genom dizilemesi ve ardından filogenetik analizdir. Bu teknik oldukça hassas olmasına ve yeni ve rekombinant genotiplerin saptanmasına izin verse de, pahalı, zaman alıcıdır ve esas olarak genotip karışımlarında baskın genotipi tespit etmektedir. Tüm genom dizilemeye bir alternatif olarak, HBsAg ve polimeraz gibi tek gen dizilemesi ile da genotipleme yapılmaktadır(59). HCV genotipinin belirlenmesi için referans metot, “in-house” teknikleri ile HCV genomunun NS5B veya E1 bölgelerinin doğrudan sekanslanması, ardından prototip sekanslar ve filogenetik analiz ile dizi hizalamasıdır. Bu teknikler, tam alt tiplemenin gerekli olduğu moleküler epidemiyoloji çalışmalarında kullanılmalıdır. Klinik pratikte, HCV genotipi, 5' kodlamayan bölgenin doğrudan dizi analizi kullanılarak veya 5' kodlamayan bölgede bulunan genotip spesifik probalar kullanılarak ters hibridizasyon analizi kullanılarak çeşitli ticari kitler tarafından belirlenebilir (77). HDV genotipleme, ters transkripsiyon (RT) -PCR ve restriksiyon fragman uzunluk polimorfizmi (RFLP), hibridizasyon ve doğrudan sekanslama gibi çeşitli yöntemler ile gerçekleştirilmiştir. RT-PCR'nin RFLP'sinin analiz edilmesi daha basit bir yöntem olmasına rağmen, HDV'nin genotiplemenin altın standardı, dizilemeye dayanan filogenetik analizdir (83).

2.5.2. RESTRİKSİYON FRAGMAN UZUNLUK POLİMORFİZM (RFLP)

HBVda RFLP ile genotipleme, S geninin PCR amplifikasyonuna (genellikle), restriksiyon enzimleri ile kesilmesi ve kesilen parçaların elektroforez ile ayrılmasına bağlıdır. GenBank'ta farklı HBV genotip sekanslarına göre RFLP için farklı restriksiyon enzimler kombinasyonu kullanılmıştır. Bu yöntem A-F genotiplerini belirlemek için kullanılmıştır(59). HCV için RFLP ile genotipleme, PCR ile amplifiye edilmiş bir 5'UTR cDNA fragmanı her genotip için spesifik restriksiyon alanlarını tanıyan enzimler kullanılarak yapılmıştır (134). Ters transkripsiyon (RT) -PCR ve restriksiyon fragman uzunluk polimorfizm (RFLP) analizi HDV genotiplemede de basit bir yöntem sunmaktadır(83).

2.5.3. SEROLOJİK YÖNTEMLER

Bu yöntemde, HBsAg serotiplerine karşı antikorlar kullanılmasına ve dokuz serolojik alt tip olan ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adw2, adw4, adr_q + ve adr_q⁻ coğrafi dağılımını dikkata alarak belli bir genotype karşılık geleceğine dayanmaktadır. Genotip A, adw2 (Avrupa, ABD, Doğu Afrika) ve ayw1 (Afrika) ile eşleşirken, B adw2 (Asya) ve ayw1 (Vietnam) 'a karşılık gelmektedir. Genotip C, adr ve ayr ile eşleştirilmiştir, ayw2 ve ayw3 D genotipi ile, ayw4 E ile, adw4 F ile, adw2 G ve adw4 genotip H ile eşleşmektedir. PCR ve dizileme, genotipleme için standart yöntemler olarak kullanılmasına rağmen, dizileme, geniş epidemiyolojik çalışmalar ve popülasyon taraması için uygun değildir. Buna karşılık, bir enzim immünoassay formatındaki subtip spesifisiteleri olan monoklonal anti-HBs antikorları kullanan serolojik analizler, daha düşük maliyetli, gerçekleştirilmesi kolay ve daha yüksek verime sahiptir (59).

HCV genotipi, rekabetçi bir EIA ile genotipe özgü HCV epitoplarına yönelik antikorlar aranarak belirlenebilir. Halihazırda mevcut olan assay, 1'den 6'ya kadar olan türünü tanımlar, ancak alt tipler arasında ayırım yapmaz ve kronik olarak enfekte olmuş bağışıklığı olan hastaların yaklaşık% 90'ında yorumlanabilir sonuçlar sağlar (77).

2.5.4. REAL-TİME PCR

Erime sıcaklığı (T_m) değeri, prob ile hedef ve / veya hibridizasyon dizisinin GC içeriği arasındaki tamamlayıcılığa bağlı olarak farklı genotipler arasında farklılık göstermektedir.

Genotipleme için diğer yöntemlerden farklı olarak, gerçek zamanlı PCR, apraz kontaminasyona izin vermez, zaman tasarrufu sağlar, yüksek bir verime sahiptir ve oldukça hassastır. Bu yöntemin ana dezavantajı, yakın genotipleri ayırt etme yeteneğinin daha düşük olmasıdır. HBV A ve C gibi Tm değerleri arasındaki yakınlık ve bu nedenle farklı genotipler içeren Kuzey Amerika gibi bazı ülkelerde uygulanamaz. Ayrıca genotipe spesifik primerler kullanılarak farklı real time PCR sistemleri da geliştirmektedir (59). Multipleks gerçek zamanlı PCR'ler ile genotipine özgü segmentlerini hedef alan genotipleme metodları da yaygın olarak kullanılmaktadır (81).

2.5.5. OLİGONÜKLEOTİD MİKROARRAY

HBV DNA pozitif hastalardan alınan serum örneklerinde HBV genotiplerinin tespiti için oligonükleotit ipini kullanan bir assay geliştirilmiştir. Bu yöntem, ip üzerinde immobilize edilmiş tipe özgü oligonükleotit problemlerine hibritlenen Cy5 etiketli amplikonlarla ters hibridizasyon prensibine dayanmaktadır. Yıkama ve kurutma işleminden sonra, tarayıcı kullanılarak floresan sinyalleri alındı. Bu yöntemin spesifiktir ve hem tek hem de miks genotipleri saptamada duyarlı olduğu bulunmuştur(82).

3. GEREKÇE VE AMAÇ

Afganistan'da viral hepatitle ilgili özellikle moleküler temelli araştırmalar sınırlı sayıda çalışma vardır ve mevcut çalışmaların sonuçları çelişkilidir. Mevcut verilerin çoğu, uyuşturucu kullanıcıları, mahpuslar, seks işçileri ve intrapartum kadınlar gibi özel gruplardan gelmektedir (84).

'Integrated Biological & Behavioral Surveillance'(IBBS) 2012 raporlarına dayanarak HBV prevalansı uyuşturucu kullanıcıları, mahpuslar ve seks işçilerinde sırasıyla %3.2 - %8.3, %4.8 -% 6 ve % 3.5 tahmin edilmiştir. Bu çalışmada, HCV prevalansı aynı gruplarda sırasıyla %10 -%70, %1.4 -%4.6 ve % 1.7 tespit edilmiştir (85). HDV ile ilgili son çalışma 1984 yılına ilişkindir. Kronik karaciğer hastaları, HBV'nin asemptomatik taşıyıcıları ve akut HBVlarda 1984'e kadar HDV prevalansı sırasıyla %18, %2 ve % 5'tir (86). Güncel bilgi literatürde bulunmamaktadır.

Kohat bilim ve teknoloji üniversitesinde (pakistan) kabil bulaşıcı hastalıklar hastanesi, merkez kan bankası ve Merkez laboratuvarı'ndan toplam 169 Afganistanlı HbsAg pozitif örneği üzerine yapılmış olan bir çalışmada HBV genotip prevalansını A (%19.53), B (%7.10), C (%32.54), D (%36.09) olarak rapor edilmiştir (87). İran'da Tahran hepatit merkezinde kayıt edilmiş 12 Afgan HBV hastası üzerine yapılan bir çalışmada ise tüm Afgan izolatlarında HBV genotipi D, alt genotip D1 ve alt tip ayw2'yi ortaya koymuştur (88). Afganistan'daki HCV genotip dağılımını gösteren tek çalışma, uyuşturucu kullanıcılar arasında yapılmıştır ve diğer tüm derleme çalışmaları bu verilere yönlendirilmiştir. Bu çalışmanın sonucuna dayanarak 113 HCV RNA pozitif uyuşturucu kullanıcısı arasında alt tip 3a, dominant olarak % 62.0, ardından alt tip 1a,% 35.2 ve 1b %2.8 oranında izlenmiştir (89).

Viral hepatit ciddi sonuçlara yol ačan önemli hastalıklardır ve enfeksiyonunun sonuçları konakçıya ve viral faktörlere bağlıdır. Kan dolaşımındaki viral yük ve viral nükleotid dizilimindeki değişim, enfeksiyonların sonuçlarını etkileyen en önemli faktörlerden birileridir. Ayrıca viral hepatitin popülasyonda prevalansı ve moleküler profilinin değerlendirilmesi hepatit kontrol programının planlanması için gereklidir.

Bu çalışma Afghanistan popülasyonu üzerine ilk kez gerçekleşmiş olup Afganistan genel popülasyonunda HBV, HCV ve HDV'nin serolojik ve moleküler epidemiyolojisi üzerine odaklanmıştır. Genel popülasyonda HBV, HCV ve HDV enfeksiyon oranlarını değerlendirmek için HBsAg, Anti-HCV ve Anti-Delta pozitifliğini değerlendirilmiştir. Ayrıca, HBV epidemiyolojik durumunun daha iyi değerlendirilmesi ve popülasyonun duyarlılığı, maruziyeti ve bağışıklık oranı hakkında bilgi elde etmek için Anti-HBc ve Anti-HBs da değerlendirmeye alınmıştır. Ayrıca klinik açıdan önemli mutasyonlarının prevalensi da incelenmiştir.



4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. MATERYAL

Afganistan Ulusal Halk Sağlığı Enstitüsü, Dünya Sağlık Örgütü ile işbirliği içinde Nangarhar (doğu bölgesi), Herat (batı bölgesi), Mazar-e Şerif (kuzey bölgesi), Kandahar (güney bölgesi) ve Kabil (merkezi bölge) olmak üzere beş ilden "WHO STEP WİSE" yöntemi ile rasgele 5897 kışından örnek alınmıştır. Çalışmanın temel amacı Afganistan'ın ana bölgesel illerindeki bulaşıcı olmayan hastalıklar için risk faktörü düzeyini belirlemektir ancak bu fırsat HBsAg ve Anti-HCV'nin hızlı taraması için de kullanılmıştır.

Örneklemede 25-70 yaş arasındaki yetişkinler hedef popülasyon olarak seçilmiştir. Bu nedenle, bu şehirlerde sürekli ikamet eden ve katılma izni veren tüm 25-70 yaşları arasındaki erkek ve kadınlar çalışma kapsamına alınmıştır. Geçici sakinler (yerleşim yeri <6 ay) ve kamplarda ya da asiler tarafından kontrol edilen güvensiz bölgelerde yaşayanlar çalışma kapsamına hariç tutulmuştur. Kan örnekleri seçilen kişilerden elde edilmiştir ve bir laboratuvar teknisyeni tarafından işlenmiştir. Daha sonra Kabil'deki Merkez Halk Sağlığı Laboratuvarı'na (CPHL) gönderilen numuneler, -80 ° C'de saklanmıştır. Serolojik inceleme için her bir bölgeden 100 kişi bu örnek havuzundan rasgele seçilmiştir. Seçilen örnekler arasında numunelerin serum kalitesi değerlendirmesi sonrasında toplam 492 örnek (269 [% 54.7] kadın ve 223 [% 45.3] erkek) 38.9 ±12 yaş ortalaması ile çalışmaya alınmıştır . Serolojik çalışma için seçilen bireylerin temel demografik bilgileri çizelge 4.1.1'de verilmiştir. Ayrıca bu beş ilden Afganistan Ulusal Halk Sağlığı Enstitüsü tarafından hızlı tarama testi ile pozitif olarak bildirilen toplam 234 HBsAg (40.4±14.5 yaş ortalaması ve 143:91 erkek-kadın oranı ile) ve 44 anti-HCV pozitif numunesi (45.5±14.2 yaş ortalaması ve 22:22 erkek- kadın oranı ile) da çalışmaya dahil edilmiştir (moleküler analizi için çalışmaya dahil edilen popülasyonun coğrafi, yaş ve cinsiyet temelli dağılımı Çizelge 4.1.2'de gösterilmiştir.). Örnekler serolojik ve moleküler çalışması için soğuk zincir altında Ankara Üniversitesi Hepatoloji Enstitüsüne transfer edilmiştir.

Bu çalışma Afganistan halk sağlığı bakanlığının kurumsal gözden geçirme kurulu tarafından *şubat.10.2016* tarihinde 361537 sayılı maktup ile onaylanmıştır. Çalışmaya dahil edilen tüm katılımcılardan bilgilendirilmiş onam formu alınmıştır.

Çizelge 4.1.1. Çalışma popülasyonunun temel demografik özellikleri

Bölgeler	n	Kadın	Erkek	Yaş ortalaması	Standart sapma	Medyan	Mod
Kandahar	100	63	37	39.6	12	38	40
kabul	100	59	41	34.6	8.9	33.5	35
Mazar	99	45	54	43	15	40	26
Nangarhar	93	46	47	34.9	8.9	35	40
Herat	100	56	44	42.4	13	40	30
Toplam	492	269	223	38.9	12	35	40

Çizelge 4.1.2. Çalışmaya dahil edilen HbsAg ve Anti-HCV pozitif katılımcılarının temel demografik özellikleri

Katılımcılar	Hızlı tarama testinde HBsAg pozitif				Hızlı tarama testinde Anti-HCV pozitif			
	Cinsiyet / Yaş ortalaması ±SS				Cinsiyet / Yaş ortalaması ±SS			
	Ekek	kadın	Toplam	Yaş Ortalaması	Ekek	kadın	Toplam	Yaş Ortalaması
Herat	17	26	43	41.9±14.2	2	0	2	70±00.0
Kabul	23	13	36	40.3±13.9	9	4	13	46.6±14.6
Kandahar	15	8	23	39.1±10.7	6	6	12	40±7.8
Mazar	43	28	71	39.9±14.8	0	4	4	47±3.46
Nangarhar	36	25	61	36.4±9.9	5	8	13	43.2±11
Toplam	134	100	234	39.3±13	22	22	44	45.5 ±13.6

4.2. YÖNTEM

4.2.1. SEROLOJİK TEST

Havuz örneğinden çalışmaya dahil edilen 492 örnek (269 [% 54.7] kadın ve 223 [% 45.3] erkek) arasında Abbott Architect otomatik platform üzerinden Abbott Architect kemilüminesanslı mikropartikül immünoassay (CMIA) ticari kitleri kullanılarak Anti-HBc, Anti-HBs, HBsAg, Anti-HCV ve Anti-HDV pozitifliği tespit edilmiştir.

4.2.2. VİRAL NÜKLEİK ASİT EKSTRAKSİYONU

Viral nükleik asit izolasyonu için 750 µl Lizis tamponu + 3.75 µl polyA + 20 µl Proteinaz K (+ 2.5 µl iç kontrol), 250 µl seruma ilave edilerek iyice Vorteks yapıldıktan sonra 57 C⁰ da 15 dakika bekletilmiştir. Lizis süreci bittikten sonra üzerine 750 µl etanol ekleyip 3 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ardından lizat Silikalı tüplere aktarıp 1 dakika boyunca 5000 rpm'da santrifüj edilmesi sonrasında, kolon temiz bir tübe transfer edilip alttaki tüpte toparlanmış çözelti atılmıştır. Karışım kalanı için işlem tekrar yapılmıştır.

Yıkama işlemi için kolona 700 µl Wash1 tamponu (1/1 oranla etanol eklenmiş) ilave ettikten sonra 1 dakika 5000 rpm'da santrifüj edilmiştir. Yıkama işlemin devamında kolon üzerine 700 µl Wash 2 tamponu (1/4 etanol eklenmiş) ilave edip 1 dakika 13000 rpm'da santrifüj edilmiştir. Wash tamponları ile yıkama işlemleri bittikten sonra kolon üzerine 700 µl etanol ekleyip 13000 rpm'da 1 dakika santrifüj edilmiştir. Ardından Kolon 10 dakika boyunca 60 C⁰ kurutulmuştur. Kurutma sonrasında kolon çeperlerinde tutulan nükleik asitleri kolona indirmek amacıyla 1 dakika 14000 rpm'da santrifüj edilmiştir. Viral nükleik asidi elde etmek için 50 µl elüsyon tamponu eklenip 3 dakika oda sıcaklığında bekledikten sonra 1 dakika 5000 + 1 dakika 13000 rpm'da santrifüje edilerek kolonun altındaki tüpte nükleik asidi izole edilmiştir

4.2.3. VİRAL YÜK TAYİNİ

Viral nükleik asit, 250 µl serum örneklerinden RTA viral NA izolasyon kiti (RTA, Türkiye) ile izole edilmiştir. (İlgili viral NA izolasyon protokolü Ek-1'de gösterilmiştir).

Gerçek zamanlı PCR kiti ile birlikte verilen standart bir iç kontrol miktarı, örneklerin ekstraksiyon verimliliğini izlemek için ilgili lizis tamponuna ilave edilmiştir. Çalışmaya negatif ve pozitif kontroller dahil edilmiştir.

HBV viral yükün belirlenmesi için 'RTA HBV real time PCR kiti' üretici talimatlarına göre 6 µl HBV Mix A, 4 µl HBV Mix B ile 10 µl HBV viral DNA karıştırarak BioRad sistemleri kullanılarak 95 °C'de 10 dakika sıcak başlangıç sonrasında 45 döngü 95 °C'de 30 saniye denatürasyon, 57 °C'de 60 saniye bağlama ve 30 saniye 72 °C'de uzatma ile amplifikasyon gerçekleştirilmiştir.

HCV viral yükünü belirlemek için, 'RTA HCV real time PCR kiti', aşağıdaki koşullar ile kullanılmıştır.

9.4 µl HCV Reaction Mix, 0.6 µl HCV Enzyme Mix ile 10 µl HCV viral RNA karıştırarak BioRad sistemde 45 °C'de 30 dakika cDNA sentezinden sonra 95 °C'de 10 dakika sıcak başlangıç ve 45 döngü 95 °C'de 30 saniye denatürasyon, 58 °C'de 60 saniye bağlama ve 30 saniye 72 °C'de uzatma tek aşamalı bir real time PCR sistemi ile amplifikasyon gerçekleştirilmiştir.

HBV ve HCV kantifikasyonu WHO standartları ile standardize edilmiş hedef bölgeyi içeren ve yükü 10^7 IU/ml, 10^6 IU/ml, 10^5 IU/ml, 10^4 IU/ml olan plasmidlar, standard olarak kullanılmıştır. (HBV ve HCV real time PCR ile ilgili PCR koşulları ve protokolları sırasıyla Ek-3 ve Ek- 4'te gösterilmiştir).

HDV viral yük tayininde ise Ankara Üniversitesi Hepatoloji Enstitüsü bünyesinde Light Cycler 480 cihazı kullanılarak geliştirilmiş 2 aşamalı bir HDV real time PCR sistemi kurulmuştur.

İlk aşamada Transcriptor First Strand cDNA kiti aşağıdaki koşullar altında cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

Ekstrakte edilmiş 10 µl HDV RNA (kalıp RNA), 2 µl random hexamer primer solüsyonu ve 1 µl ddH₂O karıştırarak 10 dakika 65°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında

4 µl Transcriptor RT reaction buffer, 0.5 µl Protector RNase Inhibitor, 2 µl dNTP Mix, 0.5 µl Transcriptor Reverse Transcriptase ile toplam hacim 20 µl olacak şekilde 25 °C'de 10 dakika, 55 °C'de 30 dakika, 85 °C'de 5 dakika uygulanarak cDNA sentezlenmiştir.

İkinci aşamada Light Cycler 480 cihazı ve Light Cycler 480 Probes Master kiti (Kitin talimatlarına göre 0.6 µl probe, 0.6 µl primer F, 0.6 µl primer R, 10 µl probe master, 5 µl sentezlenmiş cDNA veya 5 µl standart ve 3.2 µl ddH₂O karıştırılır) kullanarak 95°C'de 5 dakika sıcak başlamanın ardından 40 döngüde 94°C'de 20 saniye denatürasyon, 60°C'de 60 saniye bağlama ve 40°C'de 30 saniye uzama ile amplifikasyon gerçekleştirilmiştir.

HDV real time PCR ile ilgili PCR koşulları ve protokolları sırasıyla Ek-5'te gösterilmiştir. Ayrıca kullanılan primer ve probe setleri Ek-2'de listelenmiştir).

4.2.4. AMPLİFİKASYON

HBV genotiplemesi için amplifiye edilmiş HBV Pre S1 bölgesinin doğrudan sekanslaması kullanılmıştır. HBsAg antijenisitesi ve Anti-viral direnç ile ilgili varyasyonların prevalansını belirlemek için sırasıyla HBsAg'nin (aa 99-166) majör hidrofilik alanındaki “a” determinantı (aa 124-147) ve HBV polimerazın ters transkriptaz alanı (aa160–257) amplifiye edilmiş ve dizilenmiştir. Ayrıca HBV serotipleme analizi için de HBV S geninin dizisi kullanılmıştır.

HBV Pre S1 bölgesini amplifiye etmek için 5 µl Viral DNA, 2.5 µl (10 pmol konsantasyonunda) F-preS1- 5'- GGG TCA CCA TAT TCT TGG GAA CAA GA -3'; 2.5 µl (10 pmol konsantasyonunda) R-preS1- 5'- GCA GGG GTC CTA GGA ATC CTG ATG -3'), 4 µl (2 mM) dNTPmix, 1.5 µl (25 mM) MgCl₂, 2.5 U Taq DNA polymeraz, 5 µl buffer ve 6 µl ddH₂O, toplam hacmi 25 µl olacak şekilde bir PCR sistemi kullanılmıştır. Amplifikasyon, 35 döngü PCR (95 °C'de 30 saniye denatürasyon, 45 s için 53 °C'de bağlama ve 1 dakika 72 °C'de uzama) ile gerçekleştirilmiştir. (İlgili PCR protokolün detayları Ek-6'da verilmiştir) .

HBV S ve Pol genleri 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,35 mM Tris-HCl (pH 8.3), 200 µM dNTP, 5 U Taq DNA polymeraz ve, 0,3µM HBV-P1 (5'-CCG GAA AGC TTG AGC TCT TCT TTT TCA CCT CTG CCT AAT CA-3'; ve HBV-P2 (5'-CCG GAA AGC TTG AGC TCT TCA AAA AGT TGC ATG GTG CTG G-3'; primerleri ve 2 µl

ekstre edilmiş Viral DNA toplam hacmi 50 µl olan ve PZR reaksiyonu 94 °C'de 40 saniye denatürasyon, 60 °C'de 1.5 dakika bağlama ve 68 °C'de 3 dakika uzama (her 10 döngüde uzama süresi 2 dakika eklenerek toplam 40 döngü) uygulanmıştır. Sekanslamada F-Pol-5'-GCT ATG CCT CAT CTT CTT GTT GGT-3' ve F-S- 5'-GGC AGG TCC CCT AGA AGA AGA ACT-3' primerleri sırasıyla HBV Pol ve HBV S genelerinin dizilenmesinde kullanılmıştır (İlgili PCR protokolların detayları Ek-7'de gösterilmiştir. Ayrıca Ek-11'de dizileme yöntemi detayları belirtilmiştir).

HCV ve HDV RNA'dan Ters Transkripsiyon aşağıdaki koşullara göre gerçekleştirilmiştir: 5 µl elüte RNA, 5 µl 2 mM dNTPmix ve 2.5 µl 10 pmol ters primer ile 3 dakika boyunca 95 °C'de denatüre edilmiştir. Tamamlayıcı DNA (cDNA) daha sonra 4 µl 5x reaksiyon tamponu, 4U AMV RT-PCR ve 4.3 µl ddH₂O ilavesiyle toplam 20 µl'lik bir hacimde 1.5 saat 42 °C'de sentezlenmiştir. (HCV ve HDV RNA'dan cDNA sentezi protokolu Ek-8'de detaylandırılmıştır) .

Gerçek zamanlı PCR'de HCV pozitif olarak belirtilen tüm örnekler, HCV NS5B bölgesini amplifiye edilip sekanslanmıştır (İlgili PCR koşulları ve sekanslama protokolları sırasıyla Ek-9 ve Ek 11'de gösterilmiştir).

HCV NS5B bölgesi, NS5B F (sense;), 5'- TAT GAY ACC CGY TGC TTT GAC -3'; NS5B R (anti- sense;), 5'- GAG GAG CAA GAT GTT ATC AGC TC -3' ve NS5B R2 (anti- sense;) 5-GAA-TAC-CTG-GTC-ATA-GCC-TCC-G-3 Primer setlerini kullanılarak yarı-nested bir PZR sistemi kurarak amplifiye edilmiştir.

Her bir primerin 2.5 µl (10 pmol), 5 µl 2 mM dNTPmix, 3 µl 25 mM MgCl₂, 2.5 U Taq DNA polimeraz, 5 µl 1 x tampon ve 26.5 µl ddH₂O ve 5 µl cDNA ile toplam hacmi 50 µl olacak şekilde bir karışım hazırlanmıştır. 95 ° C'de 5 dakika süreyle başlangıç denatürasyonu ardından 95 °C'de 30 s denatürasyon, 56 ° C'de 30 saniye bağlama 72 ° C'de 1 dakika uzama 35 döngü uygulanmıştır. Çalışmada uygulanmış NS5B bölgesi amplifiye koşulları Ek-9'da detayları ile gösterilmiştir.

Tüm anti-HDV pozitif örnekler, gerçek zamanlı PCR ile doğrulanıp tüm genom dizilemesini denenmiştir ancak düşük pozitifliğinden dolayı uygun olarak amplifiye edilememiştir; Bu nedenle, yalnızca bir numunenin Anti-HDV bölgesini HDV-B1 (sense;

), 5'-ACC TCC AGA GGA CCC CTT CAG CGA A-3'; HDV-B2 (anti- sense;) 5'-GAG GGA GCT CCC CCG GCG AAG AG-3' primerleri kullanarak amplifiye edilmiştir. HDV-B primer seti ile HDV cDNA amplifikasyonu için 5 µl cDNA, her primerden 2.5 µl (10 pmol), 5 µl 2 mM dNTPmix, 2 µl 25 mM MgCl₂, 2.5 U Taq DNA polymeraz, 1× buffer ve ddH₂O toplam 50 µl'lık bir reaksiyon karışımı hazırlandıktan sonra 94 ° C'de 5 dakika boyunca başlangıç denatürasyonu, ardından 35 döngüde 94 ° C'de 40 s denatürasyon, 65 ° C'de 1.5 dakika bağlama ve 68 ° C'de 3 dakika uzatma uygulanmıştır. (İlgili PCR koşulları Ek-10'da gösterilmiştir).

Genotiplemede kullanılan primer setleri Ek-2'de listelenmiştir.

4.2.5. DİZİLEME YÖNTEMİ

PCR ürünleri, silika bazlı bir yöntemle saflaştırıldı. Dizileme Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kitin imalatçı talimatlarına göre ABI 310 Automated Sequencer cihazında yapılmıştır. Dizileme protokolu Ek-11'de detaylandırılmıştır.

4.2.6. GENOTİPLEME VE FİLOGENETİK ANALİZİ

HBV, HCV ve HDV pozitif serumlardan elde edilen tüm diziler manuel olarak düzeltilmiş ve GenBank veri tabanında karşılık gelen referans dizilerinin bölgeleri ile hizalanmıştır. Filogenetik karşılaştırma, MEGA7 yazılım paket programı kullanılarak mesafe matrisi / UPGMA yöntemi ile Kimura 2- parametresi ve 1000 bootstrap değeri ile yapılmıştır(90).

Ayrıca HBV ve HCV genotiplemesi için sırasıyla Hepatit B Virüs Veritabanı genotiplendirme aracını ve geno2Pheno veri tabanından da faydalanmıştır.

Sırasıyla 61 HBV, 29 HCV ve 1 HDV Afgan izolatlarının dizilenmiş Pre-S1, NS5B ve HDAg bölgeleri sırasıyla MH048707 - MH048767, MH048808 - MH048836 ve MH048837 accession numaraları ile GenBank'ta mevcuttur.

Ayrıca, varyant analizler için kullanılan HBsAg protein geni ve HBV polimeraz geni, sırasıyla MH048768 - MH048787 and MH048788 - MH048807 numaralarıyla GenBank'ta mevcuttur.

4.2.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZİ

Analizler, VassarStats İstatistik Hesaplama programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir (ilgili programın web tabanlı sayfasına <http://vassarstats.net/> adresinden ulaşılmaktadır) (91).

Serolojik markörlerin ve tespit edilen genotiplerin cinsiyet, yaş ve coğrafi dayalı prevalansını saptamak için, sonuçlar betimsel istatistik kullanılarak gruplar halinde özetlenmiştir.

Hepatit göstergelerinin gruplar içinde ve gruplar arası anlamlı farklılıklarını saptamak için, Pearson chi square ve Fisher exact testleri kullanılmıştır.

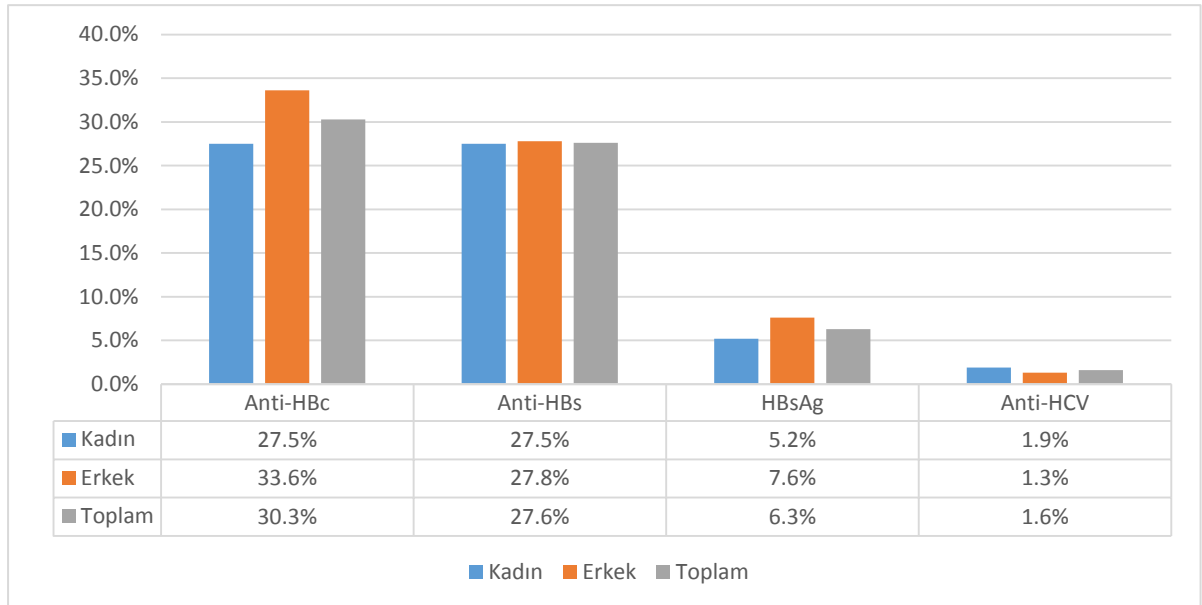
Her bölgedeki değişken frekansları Z-Testi kullanılarak çalışma popülasyonu ile karşılaştırılmıştır. Değişkenler arasındaki korelasyonun belirlenmesi için Pearson Korelasyon Katsayısı ve Spearman'ın değişkenler arasındaki Rho analizi de yapılmıştır. Tüm analizler %95 güven aralığı ile yapılmıştır ve istatistiksel anlamlılık 0.05'den küçük bir P-değeri olarak tanımlanmıştır.

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. HBV, HCV VE HDV SEROLOJİK BELİRTEÇLERİN DAĞILIMI

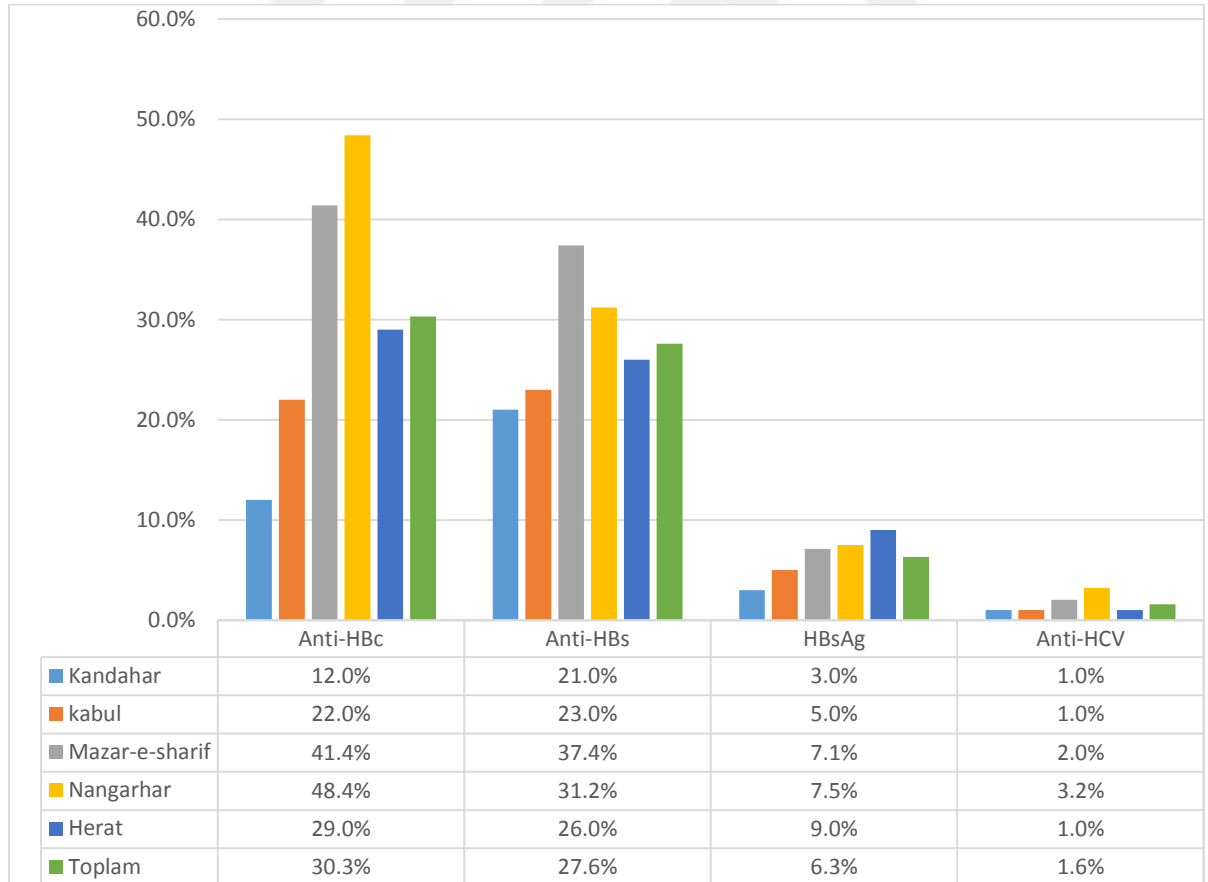
Serolojik göstergelerin değerlendirilmesi için çalışmaya katılan popülasyonun temel demografik özellikleri çizelge 4.1.1'de gösterilmiştir. Çalışmaya katılan 269 kadın ve 223 erkek'ten sırasıyla 74 (% 27.5) ve 75 (% 33,63) bireyde Anti-HBc pozitif olarak sonuçlandırılmıştır. Çalışma popülasyonunun genelinde ise 149 (%30.28) belirlenmiştir. Çalışılan bireylerin 136'sında (% 27.64), Anti-HBs \geq 10.0mIU / mL titresi saptanmıştır. Bunlardan 74'ü (% 27) kadın, 62'si (% 27,80) erkektir. Sadece Anti-HBs pozitif olan bireyler 40 (% 8.13) kişiydi. Doksan altı kişi (% 19.51) aynı anda Anti-HBc ve Anti-HBs pozitifliği göstermiştir. HBsAg seropozitifliği kadınlarda ve erkeklerde sırasıyla 14 (% 5.2) ve 17 (% 7.62) iken çalışma popülasyonu için HBsAg pozitiflik oranı 31 (% 6.3) olarak belirlenmiştir. Anti HCV pozitif sadece 8 (% 1.62) kişide (beş kadın ve üç erkek) saptanmıştır; bunlardan dördünde (1 kadın ve 3 erkek) Anti-HBc pozitiflik de gösterilmiştir. Serolojik çalışma popülasyonumuzda Anti-delta pozitifliği hiç bir bireyde saptanmamıştır. HBV ve HCV çalışılan serolojik belirteçlerin cinsiyete dayalı dağılımı çizelge 5.1.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 5.1.1. HBV ve HCV serolojik belirteçlerinin cinsiyete dayalı dağılımı



Belirteçlerin en düşük prevalansı sırasıyla Kandahar'da ve kabil'de görülmüştür. Kandahar'da anti-HBc ve HBsAg pozitiflik oranı diğer bölgelere göre daha düşük olsada erkeklerde kadınlardan anlamlı derecede yüksekti ($p = 0.02$ ve $P = 0.04$). En yüksek anti-HBc pozitiflik oranı sırasıyla Nangarhar'da %48.4, Mazar i şerif'de %41.4 ve Herat'ta %29 görülmüştür. Ayrıca Nangarhar bölgesinde erkek ve kadın arasında anlamlı derecede farklılık vardır ($p = 0.01$). Mazar-i-şerif'de anti-HBs pozitifliği diğer bölgelere kıyasla önemli derecede yüksekti (%37.4) ($P = 0.02$). Ardından Nangarhar %31.2 ve Herat'ta %26 ile sırasıyla en yüksek anti-HBs pozitif oranına sahiptir. Herat'ta ise HBsAg pozitiflik oranı diğer bölgelere göre daha yüksekti (%9). Nangarhar ve Mazar i şerif ise ardından sırasıyla %7.5 ve %7.1 pozitiflik oranı ile en yüksek bölgelerdir. Anti-HCV pozitiflik oranı ise en yüksek Nangarharda (%3.22) tespit edilmiştir. Çalışma popülasyonunun genelinde serolojik belirteçlerin dağılımında erkeklerle kadınlar arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır. Araştırılan serolojik belirteçlerin coğrafi ve cinsiyet temelli dağılımı çizelge 5.1.2 ve çizelge 5.1.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 5.1.2. HBV ve HCV serolojik belirleyicilerinin coğrafi temelli dağılımı

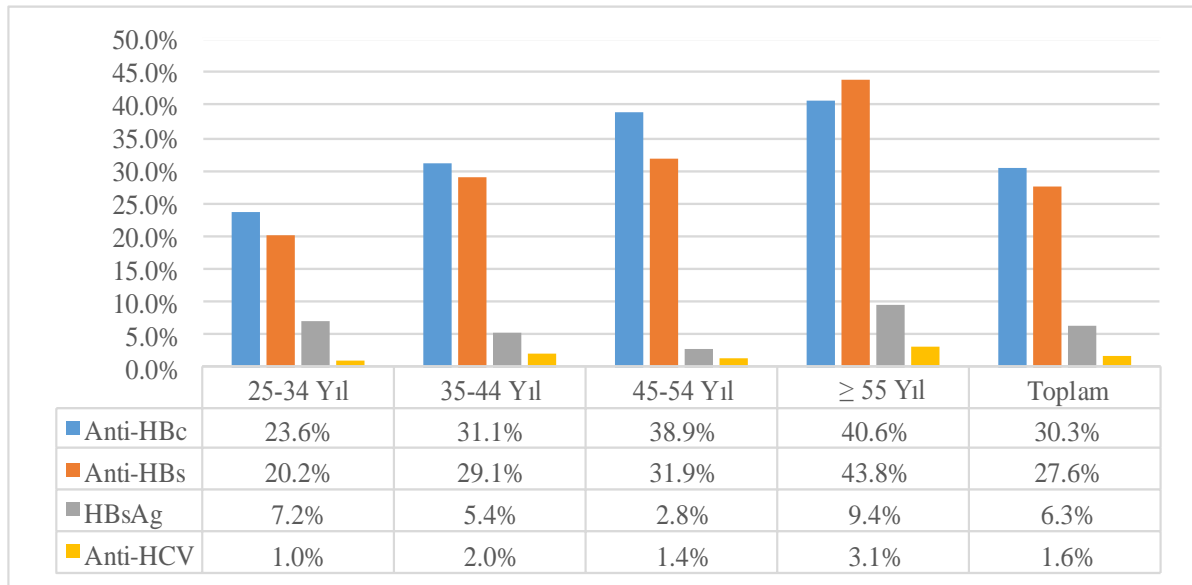


Çizelge 5.1.3 Araştırılan serolojik belirteçlerin coğrafi ve cinsiyete dayalı dağılımı

Berlirteç	Anti-HBC	Anti-HBs	HBsAg	Anti-HCV	Anti-HDV
	Kadın:Erkek	Kadın:Erkek	Kadın:Erkek	Kadın:Erkek	Kadın:Erkek
Kandahar	4:8 [% 12.0]	14:7 [% 21.0]	0:3 [% 3.0]	1:0 [% 1.0]	0:0 [% 0.0]
Kabil	14:8 [% 22.0]	15:8 [% 23.0]	4:1 [% 5.0]	1:0 [% 1.0]	0:0 [% 0.0]
Mazar	15:26 [% 41.4]	16:21 [% 37.4]	2:5 [% 7.1]	2:0 [% 2.0]	0:0 [% 0.0]
Nangarhar	28:17 [% 48.4]	16:13 [% 31.2]	4:3 [% 7.5]	1:2 [% 3.2]	0:0 [% 0.0]
Herat	13:16 [% 29.0]	13:13 [% 26.0]	4:5 [% 9.0]	0:1 [% 1.0]	0:0 [% 0.0]
Toplam	74:75 [% 30.3]	74:62 [% 27.6]	14:17 [% 6.3]	5:3 [% 1.6]	0:0 [% 0.0]

Anti-HBc ve anti-HBs prevalansı yaş grupları arasında anlamlı bir farklılık göstermektedir ve yaşla birlikte artmaktadır ($P = 0.01$, $P = 0.001$). Öte yandan, HBsAg prevalansı yaş arttıkça görece bir düşüş göstermesine karşın, 55 yaş üzerindeki yaş grubundaki HBsAg ve anti-HCV pozitifliği diğer yaş gruplarına göre daha yüksektir. Bununla birlikte, HBsAg oranı ile yaş arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. HBV ve HCV serolojik belirteçlerin yaş grupları arasında dağılımı çizelge 5.1.4'te gösterilmiştir.

Çizelge 5.1.4. HBV ve HCV serolojik belirteçlerin yaş tabanlı dağılımı



Genel olarak, çalışma popülasyonununun 296 [% 60.16] örneği, çalışılan tüm hepatit B belirteçleri için negatif olup duyarlı popülasyon olarak değerlendirilmiştir (çizelge 5.1.5). Kandahar'daki duyarlı nüfus oranı genel nüfus oranından belirgin şekilde yüksekti (P= 0.008). Duyarlılık oranı yaşla negatif korelasyon göstermektedir (yaşla birlikte azalmaktadır) (P = 0.01). Öte yandan, anti-HBs pozitiflik oranı yaşla birlikte önemli bir artış göstermektedir (P = 0.001).

Çizelge 5.1.5 Çalışma popülasyonunun HBV serolojik yorumlama grupları

Grup	Durum	Sayı	Oran %
Anti-HBC Anti-HBs HBsAg	Negatif Negatif Negatif	296	% 60.16
Anti-HBC Anti-HBs HBsAg	Pozitif Pozitif Negatif	96	% 19.51
Anti-HBC Anti-HBs HBsAg	Negatif Pozitif Negatif	41	% 8.33
Anti-HBC Anti-HBs HBsAg	Pozitif Negatif Negatif	28	% 5.69
Anti-HBC Anti-HBs HBsAg	Pozitif Negatif Pozitif	23	% 4.67
Anti-HBC Anti-HBs HBsAg	Negatif Negatif Pozitif	7	% 1.42
Anti-HBC Anti-HBs HBsAg	Negatif Pozitif Pozitif	1	% 0.20

5.2. HBV, HCV VE HDV MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİSİ SONUÇLARI

Daha önce Afganistan Ulusal Halk Sağlığı Enstitüsü tarafından HBsAg pozitif olarak bildirilen 234 hasta (yaş ortalaması 40.4±14.5 olan 143 [61.1%] erkek ve 91 [38.8%] kadın) ve serolojik çalışmamızdaki 31 HBsAg pozitif katılımcı (yaş ortalaması 40.2±14.1 olan 17 [% 54.8] erkek ve 14 [%45.1] kadın) arasında 225 kişide HBV DNA saptanmıştır.

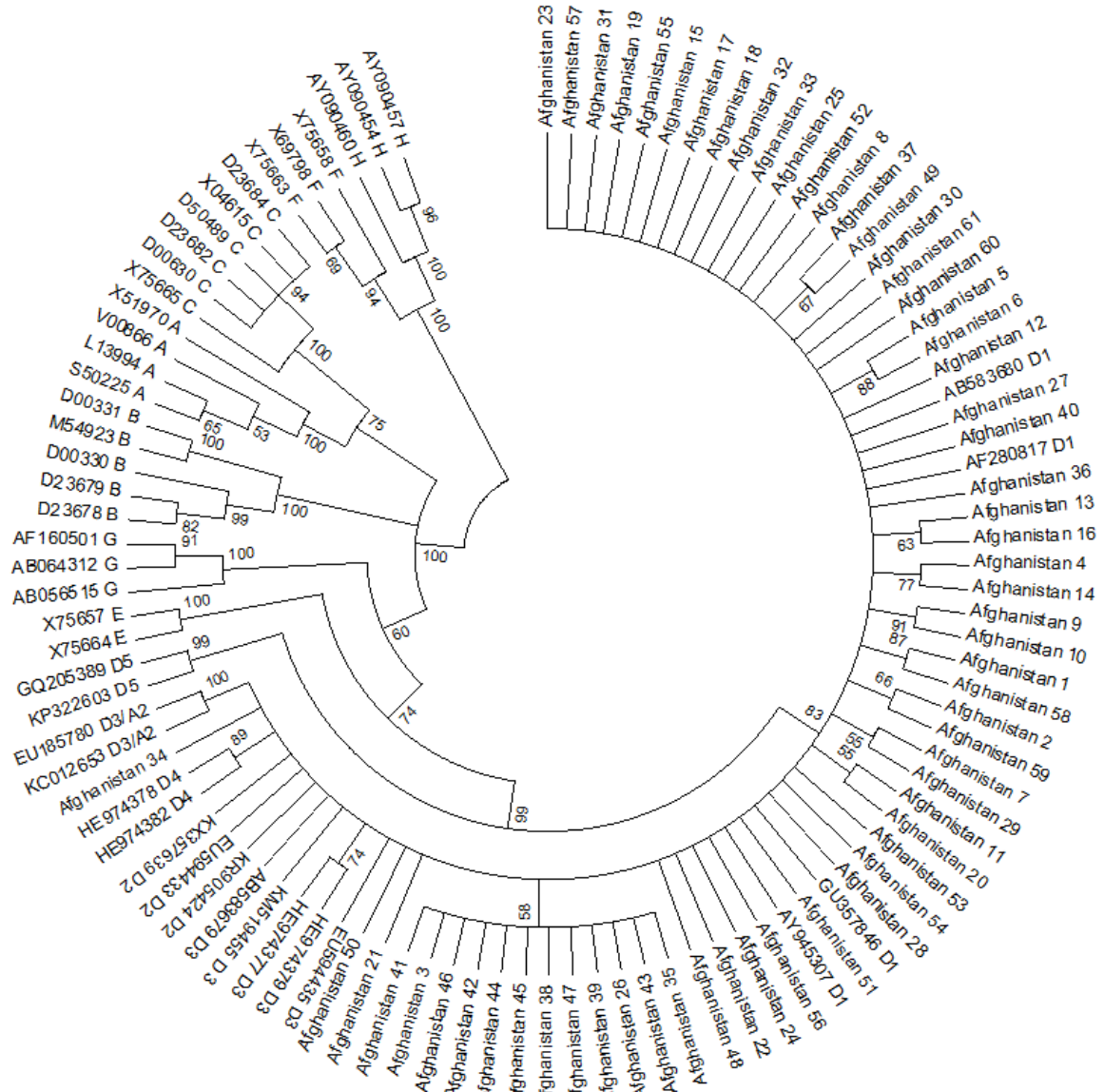
HBV DNA'nın viral yükü, Real-Time PCR testi ile 6.1×10^1 ile 1.2×10^9 IU / mL aralığında ölçülmüştür. Bunların arasında yüksek viral yük ($\geq 10,000$ IU/mL) ve orta viral yük (2,000 -10,000 IU/mL) oranları sırasıyla % 21.3 ve %17.7 iken düşük viral yük ($\leq 2,000$ IU/mL) oranı % 60.8 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 5.2.1).

Çizelge 5.2.1. Çalışma popülasyonu arasında HBV, HCV ve HDV viral yük dağılımı

Bölgeler	Erkek: Kadın						Genel		
	Herat	Kabil	Kandahar	Mazar	Nangarhar	Toplam	Toplam	YO ±SS	
Viral Yük									
HBV	$\leq 2,000$ IU/mL	15:20	14:7	9:6	18:6	25:17	81:56	137	38.8±13.2
	2,000 -10,000 IU/mL	1:2	5:1	2:0	12:11	4:2	24:16	40	41.7±12.5
	$\geq 10,000$ IU/mL	2:3	4:3	3:2	12:10	6:3	27 :21	48	37.5±12.7
	Toplam	18:25	23:11	14:8	42:27	35:22	132:93	225	39.1±13
HCV	$< 800,000$ IU/mL	2:5	3:3	2:1	4:3	3:3	15:14	29	45.5±14.2
	$> 800,000$ IU/mL	0:0	0:0	0:0	0:0	0:0	0:0	0	00.0±0.0
	Toplam	2:5	3:3	2:1	4:3	3:3	15:14	29	45.5±14.2
HDV	<10000 Kopya/ml	0:1	0:1	1:1	1:0	0:0	2:3	5	47.4±6.5
	≥ 100000 Kopya/ml	0:0	0:0	0:0	0:0	0:0	0:0	0	00.0±0.0
	Toplam	0:1	0:1	1:1	1:0	0:0	2:3	5	47.4±6.5

Real time PCR ile HBV DNA'sı pozitif tespit edilen örnekler, HBV genotiplendirmesi için geleneksel PCR ile Pre S bölgesini amplifiye edilmesi planlanmıştır ancak çoğu örneklerde HBV DNA konsantrasyonu düşük olduğu için çoğunda amplifikasyon başarısız olmuş olup sonuç olarak 61 HBV pozitif numunesinde pre-S bölgesinin amplifikasyonu ve sekanslaması sonrasında HBV DNA genotiplendirmesi yapılmıştır.

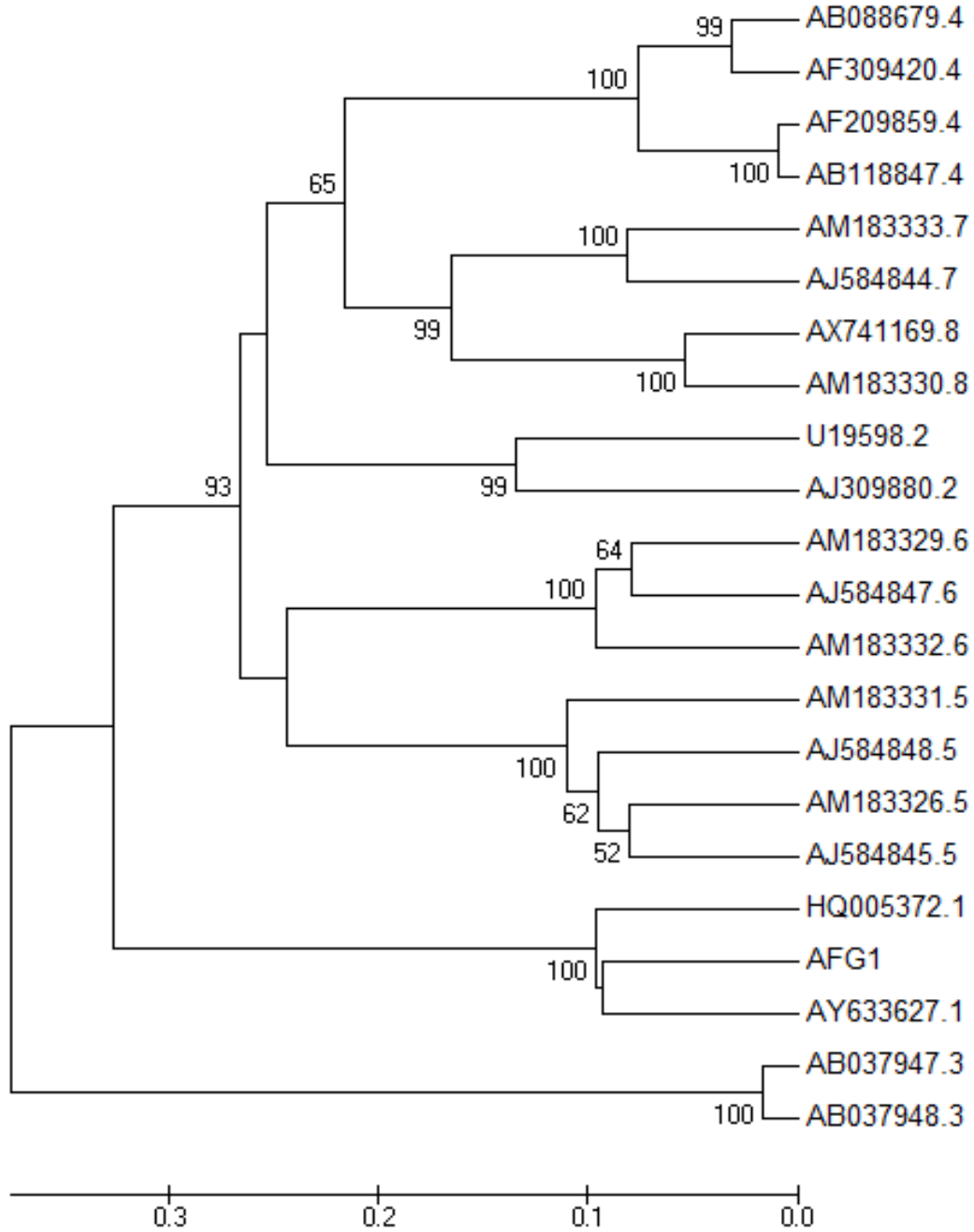
Afgan hastalarının sekansları daha önce GenBank'da yayınlanan HBV referans suşları ile karşılaştırarak ve sonrasında da <https://hbvdb.ibcp.fr/HBVdb/HBVdb> adresinden (92) Hepatit B Virüs Veritabanı genotiplendirme aracını kullanarak, genotip D olarak sınıflandırılmıştır. Filogenetik analizinde, tüm Afgan izolatları % 99 bootstrap değeri ile genotip D dalına (60 numune alt-genotip D1 ve bir numunenin alt genotip D4'te) dağıldığını doğrulamıştır. (HBV'nin Pre-S bölgesinden distance matrix / UPGMA yöntemi ile (Kimura-2 correction ve 1000 bootstrap değeri) elde edilen filogenetik ağaç şekil 5.2.1'de gösterilmiştir).



Şekil 5.2.1. HBV'nin Pre-S bölgesinden distance matrix / UPGMA yöntemi ile (Kimura-2 correction ve 1000 bootstrap değeri) elde edilen filogenetik ağaç

Buna ek olarak 20 hastada HBV küçük yüzey antijen bölgesi ve polimeraz geninin ters transkriptaz (rt) bölgesi da amplifiye edilmiştir ve daha sonra sekanslanmıştır. HBsAg bölgesindeki alt tip ile ilişkin amino asit kalıntıları , tüm Afgan hastalarında 122 Arg, 127 Pro, 140 Thr, 159 Gly ve 160 Lys olup, sonuç olarak bulduğumuz baskın alt tip ayw2 olduğu tespit edilmiştir. (İlgili protein dizisi Şekil 5.2.2'de gösterilmiştir). Ayrıca, küçük yüzey proteininin "a" belirleyicisinde Y100 %15 (3/20), Q101 %5 (1/20), G102 %15 (3/20), T115 %45 (9/20), P120 %5 (1/20), T131 %5 (1/20) mutasyonları tespit edilmiştir (İlgili protein dizisi Şekil 5.2.2 gösterilmiştir).

HBV DNA'sı pozitif olan 225 hasta arasında 5 kişide HDV ile ko-enfeksiyon tespit edilmiştir (yaş ortalaması 49.2 ± 5 ve viral yük aralığı 5.3×10^3 ile 2.2×10^4 IU / mL) (çizelge 5.2.1). Bunların arasında yalnızca bir örneği amplifiye edip dizilenmiştir. Filogenetik analizinde da HDV genotip I olarak tanımlanmıştır(Şekil 5.2.4).



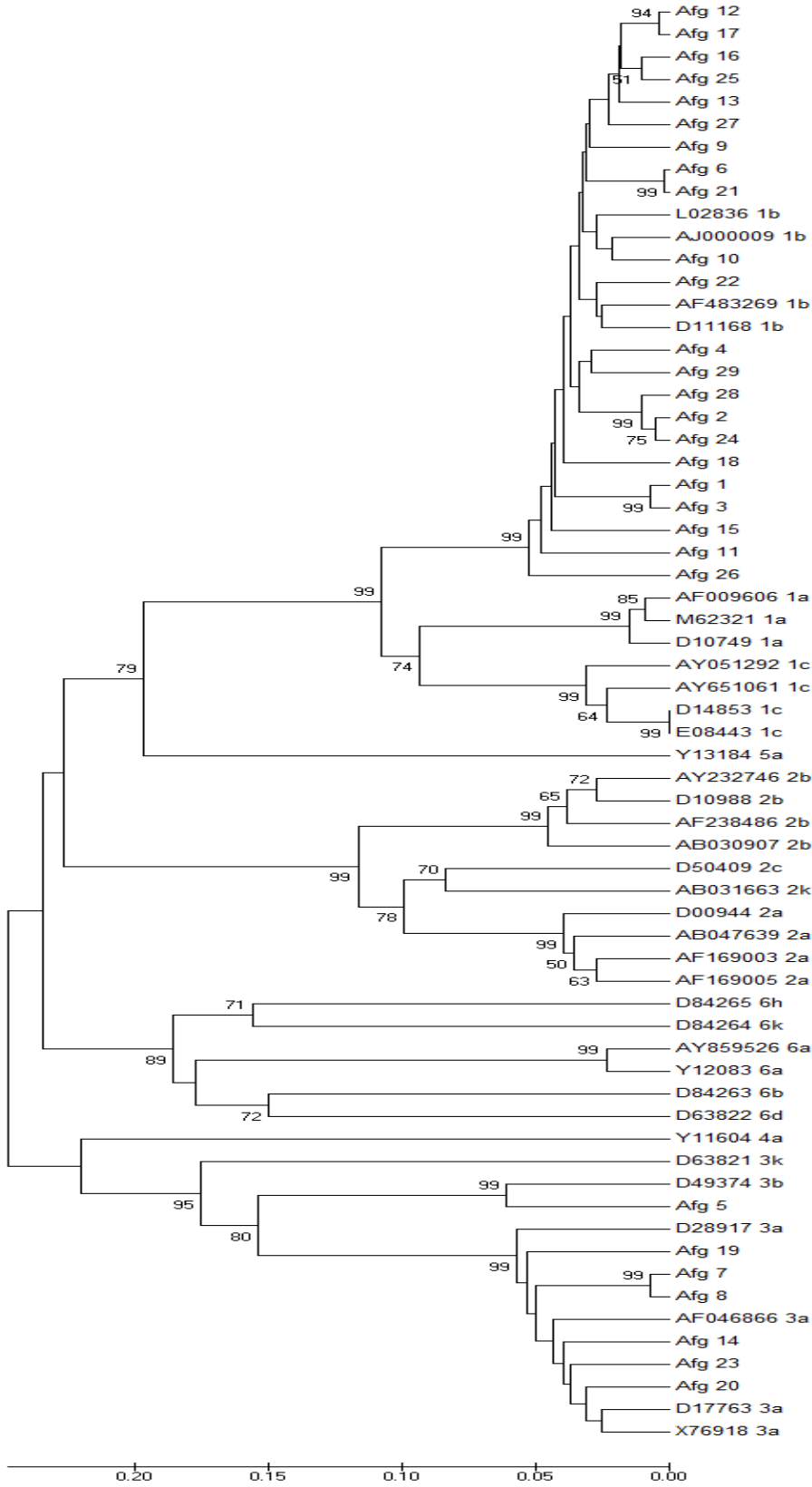
Şekil 5.2.4. HDV'nin HDAg bölgesinden distance matrix / UPGMA yöntemi (Kimura-2 correction ve 1000 bootstrap değeri) ile elde edilen filogenetik ağaç.

Diğer yandan, 44 Anti-HCV pozitif (yaş ortalaması 45.5 ± 14.2 olan 22 (% 50) erkek ve 22 (% 50) kadın) katılımcılar arasında real time PCR ile yapılan viral yük tayininde 29 bireyde viral yükü 9.5×10^0 ile 6.7×10^4 IU / mL aralığında olan HCV-RNA saptanmıştır. HCV RNA yükünü değerlendirilen katılımcıların hepsi $< 800,000$ IU/mL olmasından düşük viral yük olarak değerlendirilmiştir (çalışma popülasyonu arasında coğrafi ve cinsiyete dayalı HCV viral yük dağılımı çizelge 5.2.1'de gösterilmiştir).

Viral yükü pozitif olan örneklerde HCV genomun NS5B bölgesi (kodon 242-340) amplifiye edilmiştir ve daha sonra dizilenmiştir. Filogenetik analizi sonucunda , HCV-1b 22 (75.86%), HCV-3a 6 (20.69%) ve HCV-3b 1 (3.44%) hastada saptanmıştır.

HCV'nin NS5B bölgesinden distance matrix / UPGMA yöntemi (Kimura-2 correction ve 1000 bootstrap değeri) ile elde edilen filogenetik ağaç Şekil 5.2.5'te gösterilmiştir. Ayrıca çalışma popülasyonu arasında HCV genotiplerinin ve alt genotiplerinin sıklığı çizelge 5.2.2'de gösterilmiştir.

Ek olarak, geno2Pheno veri tabanını (93) kullanarak ekstra genotipleme analizi yapılmıştır ve filogenetik analizi ile elde edilen sonuçları doğrulanmıştır. Ayrıca geno2Pheno veri tabanını kullanılarak NS5B bölgesinde (kodon 242-340) yapılan mutasyon analizi sonucunda 22 HCV 1b katılımcılarında 16 bireyde C316N mutasyonunu tespit edilmiştir. Afgan izolatları arasında HCV NS5B bölgesinde klinik olarak önemli mutasyonların sıklığı çizelge 5.2.3'te gösterilmiştir.



Şekil 5.2.5. HCV'nin NS5B bölgesinden distance matrix / UPGMA yöntemi (Kimura-2 correction ve 1000 bootstrap değeri) ile elde edilen filogenetik ağaç

Çizelge 5.2.2. popülasyon çalışması arasında HBV, HCV ve HDV genotiplerinin ve alt tip/genotiplerinin sıklığı

	Serolojik olarak pozitif	Real time PCR pozitif	Dizilenmiş	Genotip	Alt tip/genotip
HBV	234	225	61	D 61 [%100]	D1 60 [%98,37]
					D4 1 [%1.63]
HCV	44	29	29	1 22 [%75,86] 3 7 [%24.13]	1b 22 [%75.86]
					3a 6 [%20,69]
					3b 1 [%3,44]
HDV	5	5	1	I 1 [%100]	[-]

Çizelge 5.2.3. Afgan izolatları arasında HBV S geni, HBV pol geni ve HCV NS5B bölgesinde klinik olarak önemli mutasyonların sıklığı

İlgili gen	Mutasyon	Sıklık	%
HBV S geni ((aa100-167) (MHR alanı))	Y100	3/20	% 15
	Q101	1/20	% 5
	G102	3/20	% 15
	T115	9/20	% 45
	P120	1/20	% 5
	T131	1/20	% 5
HBV pol geni (aa160–257)	S213T	2/20	% 10
	Q215P	1/20	% 5
HCV NS5B (aa 242-340)	C316N	16/29	% 55,1

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

6.1. TARTIŞMA

HBV ve HCV, Afganistan'da endemiktir. Bu ülkede HDV prevalansı hakkında güncellenmiş bir veri yoktur (94). Bu hastalıklarla ilgili birçok çalışma, uyuşturucu kullanıcıları, mahpuslar, seks işçileri gibi yüksek risk grupları arasında yapılmıştır ancak genel popülasyonu çok daha az dikkate alınmıştır (95). Bunun yanısıra, bu tür spesifik gruplarda veya genel popülasyonda viral hepatitlerin moleküler profil verileri çok yetersizdir.

HBV, HCV ve HDV'nin serolojik ve moleküler epidemiyolojilerini daha iyi değerlendirebilmesi için erişkinlerde Anti-HBc, Anti-HBs, HBsAg, Anti-HCV ve Anti-HDV araştırılması yanısıra Afgan popülasyonunda dolaşan viral genotipler, alt genotipler ve alt tipler de incelenmiştir. Ayrıca HBsAg antijenitesi, HBV ve HCV antiviral direnci ile ilişkili olan HBsAg, HBV polimeraz ve HCV NS5B gen mutant varyantlarının prevalansı da dikkate alınmıştır.

6.1.1. HBV, HCV VE HDV SEROLOJİK BELİRTEÇLERİNİN EPİDEMİYOLOJİK DEĞERLENDİRİLMESİ

HBV veya HCV için potansiyel olarak enfeksiyöz bireyler, kan örneklerinde sırasıyla HBsAg ve Anti-HCV artı saptanabilir HCV RNA'nın varlığı ile tanımlanmaktadır[95-97]. HDV enfeksiyonu sadece HBsAg-pozitif bireylerde görülmektedir (86). Afgan popülasyonunda HBsAg veya anti-HCV pozitifliğini araştıran birkaç sınırlı çalışma bulunmaktadır, ancak Anti-Delta prevalansı konusunda güncel bir çalışma yoktur.

Mart-Aralık 2006 tarihleri arasında Kabil'deki Merkez Kan Bankası'nda yapılan araştırmalar, kan donörlerinde HBsAg ve anti-HCV prevalansı sırasıyla %3.9 ve %1.9 olduğunu gösterilmiştir (98). Ayrıca, 2003 ve 2011 yılları arasında yapılan çalışmalar, HBV ve HCV enfeksiyon oranları sırasıyla % 1,9 ve % 1,1 tespit edilmiştir (99-101). Son yıllardaki çalışmalarda, ülkenin farklı bölgelerinde HBV ve HCV prevalansı sırasıyla %2 - %5,6 ve %0,2 - %1,1 olarak belirlenmiştir (23-26). Hepatit B enfeksiyonunun prevalansı 2003-2011 yılları ile karşılaştırıldığında, göreceli bir artış gösterse de, çalışmamızın

bulguları yakın tarihli çalışmalarla uyumludur. Aksine, hepatit C virüsünün prevalansı değişmemiştir ve % 1.1 - % 1.9 aralığında kalmıştır.

HBV ile doğal enfeksiyona maruz kalan bireylerde bulunan ve Anti-HBs'lerin kaybolmasından sonra uzun süre devam edebilen anti-HBc, sıklıkla geçmiş HBV enfeksiyonunun kanıtı olarak yorumlanmaktadır (102). Anti-HBc pozitif bireylerin çoğunluğu sağlıklı görünse de, bazılarında saptanabilir HBV DNA'nın varlığı nedeniyle potansiyel olarak enfeksiyözdür (103). Afganistan'da Anti-HBc'nin yaygınlığına ilişkin bilgi eksikliği vardır. Tek kaynak olan İran'ın güneybatısındaki Bushehr mülteci kamplarından birinde (Dalaki kampı) yaşayan mülteciler üzerine yapılan bir çalışma, Anti-HBc için %85,1'lik bir yaygınlık göstermektedir (101). Mevcut çalışmada, illerdeki yaygınlık farklı bölgelerde düşük ile yüksek (%12 - %48,4) arasında değişmektedir, ancak ulusal yaygınlık nispeten yüksektir. Bu nedenle, kan donörlerinde Anti-HBc taranması tartışılabilir durumdadır.

Yeterli Anti-HBs varlığı genellikle doğal enfeksiyon veya başarılı aşılama ile elde edilmektedir ve HBV enfeksiyonuna karşı bağışıklık olarak yorumlanmaktadır (104). Afganistan'da yetişkinler için kapsamlı bir aşılama programı olmadığı için, çalışmadaki popülasyonun % 27,6'sı doğal enfeksiyon sonucu bağışıklık kazandığı (Anti-HBs titreleri ≥ 10.0 mIU / mL) düşündürülmektedir. Hepatit B aşısı 2006'dan bu yana Bağışıklama Genişletilmiş Programına entegre edilmiştir. WHO-UNICEF 2016'da tahminine göre bebeklerin yüzde 65'i doğum dozunu takiben 3. doz hepatit B aşısı almıştır (105). Aşı kapsamını artırarak, toplumun duyarlı nüfusunun azalacağı umulmaktadır.

Kan dolaşımındaki viral yük viral aktivitenin önemli bir göstergesidir (106). viral yükü $\leq 2,000$ IU/mL ve HBsAg seviyesi <1000 IU / mL olan hastaları inaktif enfeksiyon veya taşıyıcılar olarak tanımlanmaktadır (107). İnaktif taşıyıcılar, önemli bir bulaşma kaynağı olabilen en geniş hasta grubunu oluştururlar (108). Dikey geçiş, Afganistan gibi endemik bölgelerde hepatitin asıl bulaşma yoludur. Enfeksiyonunu annelerinden alan bebeklerin yüzde 90'ından fazlasında en son kronik enfeksiyon gelişecektir (109). Yüksek maternal viral yük, aynı zamanda, doğumdaki aşılamının başarısızlığında da en önemli faktördür (110). Hepatit viral yükü tayini pahalı ve Afganistan'ın tüm bölgelerindeki herkes için henüz mevcut değildir.

6.1.2. HBV, HCV VE HDV MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİK SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

Araştırmanın bulguları, genotip D'nin HBsAg pozitif olan Afgan hastalarında bulunan tek genotip olduğunu ve dominant alt genotip olarak D1'in bulunduğunu göstermektedir. Aynı zamanda, bu çalışmada S genini inceleyen tüm katılımcıların serotip olarak ayw2 alt tipine sahip olduğu tespit edilmiştir. İran'da on iki HBsAg pozitif Afgan hastası üzerinde yapılan bir çalışmada, elde ettiğimiz sonuçlar ile aynı profili göstermiştir (87). Kohat Bilim ve Teknoloji Üniversitesi-Pakistan Afganistan nüfusu arasında 214 HBsAg pozitif örneklemeyle yaptığı bir başka çalışmada HBV genotiplerinin heterojen bir dağılıma sahip olduğunu beyan etmektedir(88).

Çalışmamızın bulguları Afganistan'da HCV'nin 1b alt tipi dominant olduğu ifade etmektedir. Literatür araştırmasında Afganistan'da HCV genotipinin dağılımını gösteren sadece bir çalışma mevcuttur ve diğer tüm derleme çalışmaları bu verilere işaret edilmiştir. Bu çalışmaya dayanarak, intravenöz uyuşturucu kullanıcıları arasında, HCV-3a (% 62), baskın alt tiptir. Ardından HCV alt tip 1a %35.2'de izlenmiştir, bunu takiben genotip 1b (% 2.8) izlenmiştir (89). Dünya çapında çeşitli çalışmalar, intravenöz uyuşturucu kullanıcılar arasında hepatit C genotiplerinin dağılımının genel popülasyondan farklı olduğunu kanıtlamıştır (111). Bu nedenle, bu çalışmada ilk kez Afganistan'ın genel popülasyonu arasında dolaşan HCV genotiplerinin moleküler profili sunulmaktadır.

HBV, alt genotip D1, D2 ve D3 dünya çapında yaygındır. Alt-genotip D3, Asya (Doğu Hindistan), Güney Afrika ve Avrupa'da yaygın olarak bulunurken, alt genotip D4 Avustralya'da bulunur ve D5 alt-genotipi doğu Hindistan ve Japonya'da sıktır (112-113). Afganistan'ın batı komşusu olan İran'da, birçok çalışma, genotip D'nin çoğu ilde baskın olduğunu, ancak ülkenin bazı bölgelerinde genotip B'nin de rapor edildiğini göstermiştir (114). Ayrıca HCV'nin en sık görülen alt tipleri sırasıyla 1a, 3a ve 1b'dir (115-117). Benzer şekilde, HBV genotip D, Pakistan'ın tüm bölgelerinde en sık rastlanan genotip olup, bunu sırasıyla A + D kombinasyonu ve A genotipi izlemektedir (118). Pakistan'ın tüm bölgelerinde HCV genotip 3 baskındır. Genotip 1 ve 2 sırasıyla ikinci ve üçüncü sıklıkta görülmektedir (119). Kanıtlar, Orta Asya ülkelerinde de genotip D'nin (% 88'e kadar) dominant HBV enfeksiyonu olduğunu göstermektedir (120). HCV genotipi 1 (% 70.4),

özellikle 1b, bu bölgedeki en sık HCV enfeksiyonu olup, bunu sırasıyla genotip 3 (% 19.6) ve genotip 2 (% 8.6) izlemektedir (121-122). Çalışmamızın bulgularına dayanarak Afganistan'daki HBV enfeksiyonun moleküler özellikleri, komşuları olan batıda İran, güneydoğuda Pakistan, kuzeyde Orta Asya ülkelerine benzer olduğu, ancak HCV'nin baskın genotipi batı ve güneydoğu bölgedekinden farklı olup orta doğudakına benzer olduğunu göstermektedir.

HDV üzerine yapılan son çalışma 1984'e kadar uzanmaktadır. 1984'e kadar HDV prevalansı kronik karaciğer hastalığı olanlarda % 18, asemptomatik hepatit B taşıyıcılarında % 2 ve akut hepatit B hastalarda % 5 olarak bildirilmiştir (86). Çalışmamızda saptanabilir DNA'ya sahip HBsAg pozitif katılımcılarında Anti-HDV prevalansı % 2.2 olarak belirlenmiştir ve bu da yıllar içinde anlamlı bir değişiklik olmadığını göstermektedir. Genotipleme için bir örneğin analizi, popülasyonun tüm popülasyona genelleştirilmesi için gerçekten yetersiz olmakla birlikte, HDV-I, dünyada en yaygın genotip olması sebebiyle, Afganistan'da da yaygın bir genotip olması beklenmektedir (123).

Genotip, viral yük ve spesifik viral mutasyonlar dahil olmak üzere birçok viral faktör hastalığın seyri ve tedaviye yanıtla ilişkili bulunmuştur (29). HBV polimeraz geninin ters transkriptaz alanı (aa160-257) ve HBsAg'nin (aa 99-166) majör hidrofilik alanındaki "a" determinantı (aa 124-147) sırasıyla HBV'ye karşı yeni antiviral ajanları ve aşılama veya serolojik immunoassay antikorlarının ana hedefleridir (124).

HBV polimeraz genindeki N248 ve Q215 loküslerindeki mutasyonlar sıklıkla bulunur, fakat ilaç direnci ile olan ilişkisi tartışmalıdır (125-126). Bununla birlikte, literatürde, rtQ215S mutasyonu olan hastaların karaciğer hastalığının progresyon riskinin daha yüksek olduğunu (125), S213T'nin hepatoselüler karsinomla ilişkili bir aday mutasyon olduğunu (127) ve tedavi sırasında N248H'nin antiviral ilaçlara HBV duyarlılığını azaltabileceğini öne sürmektedir (126). HBV genotip D, çalışılan diğer HBV genotiplerine kıyasla ciddi hastalıklara ve ilaç direncinin daha yüksek olmasına neden olabilir. Aksine, genotip A ve B hastaları interferon bazlı tedaviye C ve D genotiplerine göre daha iyi yanıt verirler (59). Benzer şekilde, HCV alt tip 1b'nin, diğer HCV genotiplere kıyasla daha şiddetli karaciğer hastalığı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (128). Farklı çalışmalar, NS5B bölgesindeki C316N / H mutasyonunun muhtemelen genotip 1b HCV kronik enfekte hastalarda sofosbuvire karşı

azaltılmış yanıt oranları ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir (129). Bununla birlikte, antiviral tedaviye direnç özellikle kronik HCV-1b enfeksiyonunda önemli ve tartışmalı bir konu olmaya devam etmektedir.

G145R substitüsyonu en yaygın immün kaçış mutasyonu olmasına rağmen, P120S de bilinen bir immün kaçış mutasyonudur (130-131). T131I varyantı, okült enfeksiyonu olan hastalarda ve belki de başarısız HBsAg tespitiyle ilişkili bulunmuştur (132). Bununla birlikte, HBsAg'nin antijenisitesini etkileyebilecek veya HBV antiviral direncine yol açabilen majör mutasyonların Afgan izolatlarında sık olmadığı, fakat aynı durumun HCV için geçerli olmadığı görülmüştür. HCV antiviral ilaçların ana hedefi olan NS3, NS5A ve NS5B bölgelerinin Afganistan için daha detaylı ve ayrıntılı olarak çalışılması önerilmektedir.

6.2. SONUÇ

Mevcut veriler Afganistan'ın HBV ve HCV enfeksiyonu için bir orta endemik bölge olduğunu göstermektedir (HBV belirteçleri % 20-60, HbsAg % 2-7 ve anti-HCV % 1-2) (133). Nüfusun çoğunluğu, özellikle genç nesil, HBV'ye duyarlıdır ve popülasyonda maruz kalma riski yüksektir. Afgan popülasyonundaki HBV, HCV ve HDV genotipik varyasyonları heterojen olmayabilir. HBV alt genotip D1 ve Alt tip ayw2 ilgili enfeksiyonların neredeyse % 100'dür. Ayrıca, klinik olarak önemli olan HBsAg ve HBV polimeraz genindeki mutant varyasyonlar Afgan popülasyonunda yaygın değildir. Benzer şekilde, Afgan hastalarında HCV-1b (% 75.86) ve HCV-3a (% 20.69) en yaygın alt genotiptir. HDV'nin serolojik ve moleküler incelemesini içeren daha kapsamlı çalışmalar yapılmalıdır.

7. KAYNAKLAR

1. Baron S (Ed.). Medical Microbiology. 4th edition. University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996.
2. El-Serag HB. Epidemiology of Viral Hepatitis and Hepatocellular Carcinoma. Gastroenterology May 2012 142(6):264–1273 doi: 10.1053
3. Jefferies M, Rauff B, Rashid H, Lam T, Rafiq S. Update on global epidemiology of viral hepatitis and preventive strategies. World J Clin Cases Nov 2018 6; 6(13): 589-599
4. Lemoine M, Nayagam S, and Thursz M. Viral hepatitis in resource-limited countries and access to antiviral therapies: current and future challenges. Future Virol. 2013 April ; 8(4): 371–380
5. WHO. Afghanistan hepatitis country profile, 2017. www.emro.who.int
6. Tallo T. Molecular epidemiology of hepatitis A, B and C in Estonia. karolinska institute.2008
7. Kramvis A, Genotypes and Genetic Variability of Hepatitis B Virus, Intervirology 2014;57:141–150
8. Ergül A.A. Hepatit Virüslerinin Moleküler Biyolojisi. Güncel Gastroenteroloji. 2003, 7/1
9. Sunnen G.V. Hepatitis C and ozone therapy. Ozone in medicine. 2001
10. Andre P, Perlemuter G, Budkowska A, Brechot C, Lotteau V. Hepatitis C virus particles and lipotrotein metabolism.
11. Moradpour D, Penin F, Rice C.M. Replication of hepatitis C virus. Nature reviews microbiology. 2007;5(6):453-463.
12. Zein, N.N. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. Clin Microbiol Rev. 2000, 13, 223-235.

13. De francesco R, Tomei L, Altamura S, ??? Approching a new era for hepatitis C virus therapy: inhibitors of the NS3-4A serine protease and the NS5B RNA-dependent RNA polymerase. *Antiviral Res* 2003, 58:1-16
14. Durmaz R, Tabak F, Balık İ, Tekeli E. HCV mutasyonları. *Viral hepatit* 2005: 170-174
15. S T. Hepatit C virüsü: Viroloji ve seroloji. *Viral hepatit*. 2003: 186-198
16. Altınoğlu Y.Ç, Karataylı S.C, Bozdayı A.M, Hepatit Delta Virolojisi: Toksonomi, Sınıflandırma, Yapısal ve Genomik Organizasyon, Viral Replikasyon, Viral Heterojenite, Deney hayvanlarda infeksiyon, Güncel gastroenteroloji, 2011
17. Wang KS, Choo QL, Weiner AJ, ve ark. Structure, sequence and expression of the hepatitis delta (delta) viral genome. *Nature* 1986;323:508-14.
18. Kuo MY, Goldberg J, Coates L, ve ark. Molecular cloning of hepatitis delta virus RNA from an infected woodchuck liver: sequence, structure, and applications. *J Virol* 1988;62:1855-61.
19. WHO. GLOBAL HEPATITIS REPORT, 2017.
20. WHO. Hepatitis C Fact sheet. Oct 2017. <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c>
21. WHO. Hepatitis C Fact sheet. Jul 2017. <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-d>
22. WHO. World Health Organization. (<http://www.emro.who.int/afg/afghanistan-news/hepatitis-day-2016.html>). Accessed July 2016.
23. Saeed KMI. Burden of Hepatitis B, Hepatitis C and HIV Infections Among Adult Citizens in Kandahar City, Afghanistan. *IOSR Journal Of Pharmacy* Jan 2017;Volume 7(Issue 1):78-85

24. Saeed KMI. Descriptive Study of Hepatitis B, C and HIV Infections and Associated Factors among Adult Population in Kabul City, . IOSR Journal Of Pharmacy Jan 2017;Volume 7(Issue 1):69-77
25. Saeed KMI. Prevalence and Associated Factors of Hepatitis B, Hepatitis C and HIV Infection in Jalalabad City,Afghanistan GMJ June 2016;Volume 1(Issue 1):62-74
26. Saeed KMI. Prevalence and associated factors of Hepatitis B, Hepatitis C and HIV infections among adult citizens in Mazar-e-Sharif city, Afghanistan OSR Journal Of Pharmacy Nov 2016;Volume 6(Issue 11):61-72
27. Bozdayı A. M, Aslan N, Bozdayı G, Türkyılmaz A. R, Sengezer T, Wend U, Erkan Ö, Aydemir F, Zakirhodjaev S, Orucov Ş, Bozkaya H, Gerlich W, Karayalçın S, Yurdaydın C and Uzunalimoğlu Ö. Molecular epidemiology of hepatitis B, C and D viruses in Turkish patients. Arch Virol. 2004, 149, 2115–2129.
28. Gori A, Gheorgita S, Spinu C, Pinzaru I, Halacu A, Sajen O, Suveica L, Sausy A, Muller C.P, Hübschen J.M. Hepatitis B, C and D virus genotypes detected in HBsAg- or anti-HCV-positive people from the Republic of Moldova. Arch Virol. 2018, 163, 431-438.
29. Sunbul M. Hepatitis B virus genotypes: Global distribution and clinical importance. World J Gastroenterol May 2014 Volume 20(Issue 18):5427-34
30. Kramvis A, Kew M, François G, Hepatitis B virus genotypes, Vaccine 23 (2005) 2409–2423.
31. Girones R, Miller R.H. Mutation rate of the hepadnavirus genome. Virology 1989; 170:595.
32. Kurbanov F, Tanaka Y and Mizokami M, Geographical and genetic diversity of the human hepatitis B virus, Hepatology Research 2010; 40: 14–30.
33. Stuyver L, De Gendt S, Van Geyt C, Zoulim F, Fried M, Schinazi R.F, Rossau R. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. J Gen Virol 2000; 81:67.

34. Lok A.S. Progress in hepatitis B: A 30-year journey through three continents. *Hepatology*. 2014 Mar 11. hep.27120.
35. Norder H, Hammas B, Lee SD, Bile K, Couroucé AM, Mushahwar IK, Magnius LO. Genetic relatedness of hepatitis B viral strains of diverse geographical origin and natural variations in the primary structure of the surface antigen. *J Gen Virol* 1993; 74 (Pt 7):1341.
36. Lindh M, Andersson A.S, Gusdal A. Genotypes, nt 1858 variants, and geographic origin of hepatitis B virus--large-scale analysis using a new genotyping method. *J Infect Dis* 1997; 175:1285.
37. Pourkarim M.R, Amini-Bavil-Olyae S, Kurbanov F, Ranst M.V, Tacke F, Molecular identification of hepatitis B virus genotypes/ subgenotypes: Revised classification hurdles and updated resolutions, *World J Gastroenterol* 2014 June 21; 20(23): 7152-7168.
38. Shi W, Zhang Z, Ling C, Zheng W, Zhu C, Carr MJ, Higgins DG. Hepatitis B virus subgenotyping: history, effects of recombination, misclassifications, and corrections. *Infect Genet Evol* 2013; 16: 355-361
39. Bukh J, Purcell R.H, and Miller R.H, Sequence analysis of the core gene of 14 hepatitis C virus genotypes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994, 91, 8239–8243.
40. Robertson B, Myers G, Howard C, Brettin T, Bukh J, Gaschen B, Gojobori T, Maertens G, Mizokami M, Nainan O, Netesov S, Nishioka K, Shin I.T, Simmonds P, Smith D, Stuyver L and Weiner A. Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization. *Arch Virol*. 1998, 143, 2493-2503.
41. Stuyver L, Arnhem W, Wyseur A, Hernandez F, Delaporte E and Maertens G. Classification of hepatitis C viruses based on phylogenetic analysis of envelope 1 and nonstructural 5b regions and identification of five additional subtypes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994, 91, 10134-10138.

42. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), HCV Classification available at: <https://talk.ictvonline.org/>
43. Franciscus A , HCV Genotype, Quasispecies and Subtype, Hepatitis C Support Project(HCSP) FACT SHEET, October 2014, VERSION 7.
44. Takada N, Takase S, Takada A, Date T. Differences in the hepatitis C virus genotypes in different countries. *J Hepatol* ,1993;17, 277-283
45. Pawlotsky JM, Tsakiris L, Roudot-Thoraval F, Pellet C, Stuyver L, Duval J, Dhumeaux D.. Relationship between hepatitis C virus genotypes and sources of infection in patients with chronic hepatitis C. *J Infect Dis* ,1995; 171, 1607-1610
46. Chamberlain RW, Adams N, Saeed AA, Simmonds P, Elliott RM. Complete nucleotide sequence of a type 4 hepatitis C virus variant, the predominant genotype in the Middle East. *J Gen Virol* , 1997; 78, 1341-1347.
47. Agha S, Tanaka Y, Saady N, Kurbanov F, Abo-Zeid M, El-Malky M, Khalaf M, Ohta N, Yoshizawa H, Mizokami M. Reliability of hepatitis C virus core antigen assay for detection of viremia in HCV genotypes 1, 2, 3, and 4 infected blood donors: A collaborative study between Japan, Egypt, and Uzbekistan. *J Med Virol*, 2004: 73,216-222.
48. Cha TA, Beall E, Irvine B, Kolberg J, Chien D, Kuo G, and Urdea M.S. (1992). At least five related, but distinct, hepatitis C viral genotypes exist. *Proc Natl Acad Sci USA* , 1992; 89, 7144-7148.
49. Epidemiology of infectious diseases. available at: <http://ocw.jhsph.edu/> john hopkins bloomberg school of public health.
50. Wu J.C, Huang I.A, Huang Y.H, Chen J.Y, and Sheen I.J, Mixed Genotypes Infection With Hepatitis D Virus, *Journal of Medical Virology*, 1999, 57:64–67
51. Pascarella S and Negro F, HepatitisD virus: an update, *Liver International* (2010).

52. Radjef N, Gordien E, Ivaniushina V, Gault E, Anaïs P, Drugan T, Trinchet JC, Roulot D, Tamby M, Milinkovitch MC, Dény P. Molecular Phylogenetic Analyses Indicate a Wide and Ancient Radiation of African Hepatitis Delta Virus, Suggesting a Deltavirus Genus of at Least Seven Major Clades. *JOURNAL OF VIROLOGY* Mar. 2004;Volume 78(5):2537–44.
53. Su C.W, Huang Y.H, Huo T.I, Shih H.H, Sheen I.J, Chen S.W, Lee P.C, Lee S.D, Wu J.C. Genotypes and Viremia of Hepatitis B and D Viruses Are Associated With Outcomes of Chronic Hepatitis D Patients. *GASTROENTEROLOGY* 2006;Volume 130:1625–35
54. Watanabe H, Nagayama K, Enomoto N, Chinzei R, Yamashiro T, Izumi N, Yatsushashi H, Nakano T, Robertson BH, Nakasone H, Sakugawa H, Watanabe M. Chronic hepatitis delta virus infection with genotype IIb variant is correlated with progressive liver disease. *Journal of General Virology* 2003;Volume 84:3275–89
55. Wu J.C, Huang I.A, Huang Y.H, Chen J.Y, and Sheen I.J, Mixed Genotypes Infection With Hepatitis D Virus, *Journal of Medical Virology*, 1999, 57:64–67
56. Wang T.C and Chao M, RNA Recombination of Hepatitis Delta Virus in Natural Mixed-Genotype Infection and Transfected Cultured Cells, *JOURNAL OF VIROLOGY*, Feb. 2005, p. 2221–2229 Vol. 79, No. 4
57. Fridell R.A, Wang C, Sun J.H, O'Boyle D.R, Nower P, Valera L, Qiu D, Roberts S, Huang X, Kienzle B, Bifano M, Nettles RE, Gao M. Genotypic and phenotypic analysis of variants resistant to hepatitis C virus nonstructural protein 5A replication complex inhibitor 34 BMS-790052 in humans: in vitro and in vivo correlations. *Hepatology* 2011;54:1924–1935.
58. . Abdominal keys. 19 Hepatitis D. available at: <https://abdominalkey.com/>
59. Guirgis B.S, Abbas R.O, Azzazy H.M. Hepatitis B virus genotyping: current methods and clinical implications. *International Journal of Infectious Diseases* March 2010;14:e941–e53

60. Su C.W, Huang Y.H, Huo T.I, Shih H.H, Sheen I.J, Chen S.W, Lee P.C, Lee S.D, Wu J.C. Genotypes and Viremia of Hepatitis B and D Viruses Are Associated With Outcomes of Chronic Hepatitis D Patients. *GASTROENTEROLOGY* 2006;Volume 130:1625–35
61. Radjef N, Gordien E, Ivaniushina V, Gault E, Anaïs P, Drugan T, Trinchet JC, Roulot D, Tamby M, Milinkovitch MC, Dény P.. Molecular Phylogenetic Analyses Indicate a Wide and Ancient Radiation of African Hepatitis Delta Virus, Suggesting a Deltavirus Genus of at Least Seven Major Clades. *JOURNAL OF VIROLOGY* Mar. 2004;Volume 78(5):2537–44
62. Watanabe H, Nagayama K, Enomoto N, Chinzei R, Yamashiro T, Izumi N, Yatsunami H, Nakano T, Robertson BH, Nakasone H, Sakugawa H, Watanabe M. Chronic hepatitis delta virus infection with genotype IIb variant is correlated with progressive liver disease. *Journal of General Virology* 2003;Volume 84:3275–89
63. Benvegna L, Pontisso P, Cavalletto D, Noventa F, Chemello L, Alberti A. Lack of correlation between hepatitis C virus genotypes and clinical course of hepatitis C virus-related cirrhosis. *Hepatology* 1997;Volume 25:211–15
64. Bruno S, Silini E, Crisignani A, Borzio F, Leandro G, Bono F, Asti M, Rossi S, Larghi A, Cerino A, Podda M, Mondelli M.U, Hepatitis C virus genotypes and risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis: a prospective study. *Hepatology* 1997;Volume 25:754–58
65. Hatzakis A, Katsoulidou A, Kaklamani E, Touloumi G, Koumantaki Y, Tassopoulos NC, Karvountzis G, Gioustozi A, Hadziyannis S, Trichopoulos D, Hepatitis C virus 1b is the dominant genotype in HCV related carcinogenesis: a case-control study. *Int J Cancer* 1996;68:51–53
66. Martinot-Peignoux M, Marcellin P, Pouteau M, Castelnau C, Boyer N, Poliquin M, Degott C, Descombes I, Le Breton V, Milotova V, et al. Pretreatment serum hepatitis C virus RNA levels and hepatitis C virus genotype are the main and independent prognostic factors of sustained response to interferon alfa therapy in chronic hepatitis C. *Hepatology* 1995;22:1050–56

67. Pozzato G, Kaneko S, Moretti M, Croce L.S, Franzin F, Unoura M, Bercich L, Tiribelli C, Crovatto M, Santini G, et al Different genotypes of hepatitis C virus are associated with different severity of chronic liver disease. *J Med Virol* 1994;43:291–96
68. Silini E, Bottell R, Asti M, Bruno S, Candusso M.E, Brambilla S, Bono F, Iamoni G, Tinelli C, Mondelli M.U, Ideo G. Hepatitis C virus genotypes and risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis, a case-control study. *Gastroenterology* 1996;111:199–205
69. Tong S, Li J, Wands J.R, and Wen Y.M, Hepatitis B virus genetic variants: biological properties and clinical implications *Emerg Microbes Infect.* 2013 Mar; 2(3): e10.
70. Hamadani Y.M and Bakheit S, Hepatitis B Virus_Surface Gene Mutations and their Clinical Implications, *Sudan Journal of Medical Sciences (SJMS): Volume 12 (2017), Issue No. 2 | pages: 101-113*
71. Nishiya AS, de Almeida-Neto C, Ferreira SC, Alencar CS, Di-Lorenzo-Oliveira C, Levi JE, Salles NA, Mendrone A Jr, Sabino EC. HCV Genotypes, Characterization of Mutations Conferring Drug Resistance to Protease Inhibitors, and Risk Factors among Blood Donors in São Paulo, Brazil. *PLOS ONE.* January 2014 | Volume 9 | Issue 1 | e86413
72. Çelik Z. Kronik hepatit Bli hastalarda pegile interferon tedavi tekilliğinin retrospektif değerlendirilmesi.uzmanlık tezi. İnönü üniversitesi. 2010
73. CDC. interpretation of Hepatitis B Serologic Test Results. Available at : <https://www.cdc.gov/hepatitis/>
74. Krajden M, McNabb G, and Petric M. The laboratory diagnosis of hepatitis B virus *Can J Infect Dis Med Microbiol.* 2005 Mar-Apr; 16(2): 65–72.
75. Gupta E, Bajpai M, and Choudhary A. Hepatitis C virus: Screening, diagnosis, and interpretation of laboratory assays . *Asian J Transfus Sci.* 2014 Jan-Jun; 8(1): 19–25

76. Barrera JM, Francis B, Ercilla G, Nelles M, Achord D, Darner J, Lee SR. Improved detection of anti-HCV in post-transfusion hepatitis by a third-generation ELISA. *Vox Sang.* 1995;68(1):15-8
77. Chevaliez S and Pawlotsky J.M. Hepatitis C Virus Serologic and Virologic Tests and Clinical Diagnosis of HCV-Related Liver Disease. *Int J Med Sci.* 2006; 3(2): 35–40.
78. maertens G, Vorsters A, Royens B, Dekeyser F, Zrein M. A fourth generation assay for the screening of HCV antibodies. European association for the study of the liver, 34th annual meeting, Naples (Italy) 1999.
79. Colin C, Lanoir D, Touzet S, Meyaud-Kraemer L, Bailly F, Trepo C. Sensitivity and specificity of third-generation hepatitis C virus antibody detection assays: an analysis of the literature. *J Viral Hepat.* 2001 Mar;8(2):87-95
80. Brichler S, Gal F.L, Neri-Pinto F, Mansour W, Roulot D, Laperche S, and Gordien E. Serological and Molecular Diagnosis of Hepatitis Delta Virus Infection: Results of a French National Quality Control Study. *J Clin Microbiol.* 2014 May; 52(5): 1694–1697.
81. Sebastian Malmström, Ida Berglin-Enquist, Magnus Lindh. Novel Method for Genotyping Hepatitis B Virus on the Basis of TaqMan Real-Time PCR. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, Apr. 2010, p. 1105–1111
82. Xiang-Rong Tang, Ji-Shen Zhang, Hui Zhao, Yu-Hua Gong, Yong-Zhong Wang, and Jian-Long Zhao. Detection of hepatitis B virus genotypes using oligonucleotide chip among hepatitis B virus carriers in Eastern China. *World J Gastroenterol.* 2007 Apr 7; 13(13): 1975–1979.
83. Theamboonlers A, Hansurabhanon T, Verachai V, Chongsrisawat V, Poovorawan Y. Hepatitis D virus infection in Thailand: HDV genotyping by RT-PCR, RFLP and direct sequencing. *Infection.* 2002 Jun;30(3):140-4.
84. Berger D.S. Infectious disease of Afghanistan: GIDEON Informatics, Incorporated, 2016

85. Integrated Biological & Behavioral Surveillance (IBBS) in Selected Cities of Afghanistan. In: National AIDS Control Program (NACP). Ministry of Public Health A, ed. Findings of 2012 IBBS survey and comparison to 2009 IBBS survey 2012.
86. Abbas Z, Jafri W, Raza S. Hepatitis D: Scenario in the Asia-Pacific region. *World J Gastroenterol* Feb 2010 Volume 16(Issue 5):554-62
87. Attaullah S, Rehman S, Khan S, Ali I, Ali S and Niaz Khan S. Prevalence of Hepatitis B virus genotypes in HBsAg positive individuals of Afghanistan. *Virology Journal* 2011;8(1):281
88. Amini-Bavil-Olyae S, Alavian S.M, Adeli A, Sarrami-Forooshani R, Sabahi F, Sabouri E, Tavangar H.R, Azizi M, Mahboudi F. Hepatitis B Virus Genotyping, Core Promoter, and PreCore/Core Mutations Among Afghan Patients Infected With Hepatitis B: A Preliminary Report. *Journal of Medical Virology* 2006;78
89. Sanders-Buell E, Rutvisuttinunt W, Todd C.S, Nasir A, Bradfield A, Lei E, Poltavee K, Savadsuk H, Kim J.H, Scott P.T, de Souza M, Tovanabutra S. Hepatitis C genotype distribution and homology among geographically disparate injecting drug users in Afghanistan. *Journal of Medical Virology* Jul 2013;85(7):1170–79
90. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol.* 2016, 33, 1870-1874.
91. VassarStats: Website for Statistical Computation. Available online: <http://vassarstats.net/>
92. The Hepatitis B Virus Database genotyping tool. Available online: <https://hbvdb.ibcp.fr/HBVdb/HBVdbGenotype>
93. Genafor – Open Services for Medical Research. Available online: <http://hcv.geno2pheno.org/index.php>
94. Khan S, Attaullah S. Share of Afghanistan populace in hepatitis B and hepatitis C infection's pool: is it worthwhile? . *Virology Journal* 2011;8:216

95. Amsalu A, Worku M, Endale Tadesse E, Shimelis T. The exposure rate to hepatitis B and C viruses among medical waste handlers in three government hospitals, southern Ethiopia. *Epidemiology and Health* 2016;38:e2016001
96. Bonino F, Piratvisuth T, Brunetto M.R, Liaw Y.F, Diagnostic markers of chronic hepatitis B infection and disease, *Antiviral Therapy*,2010, 15 Suppl 3:35–44
97. CDC. Testing for HCV infection: An update of guidance for clinicians and laboratorians. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 2013;62:362-365.
98. Central blood bank: Afghanistan report of testing of blood donors from March - December 2006. Kabul, Afghanistan: Ministry of Public Health Afghanistan; 2006.
99. Seighali F, Hosseini Divkolaye N.S, Koochi E, Pourfathollah A.A, Rahmani A.M. The status of blood safety in ECO member states. *Blood transfus* 2015; 13: 583-7 DOI 10.2450/2015.0035-15
100. Olszewski A, Korzeniewski K, Lass A, Selected epidemiological aspects of fresh whole blood application in the Polish field hospital in Afghanistan. *Int Marit Health* 2014; 65, 1: 23–27
101. Pourkarim M, Zandi K, Amini-Bavil-Olyae S, An aberrant high prevalence of hepatitis B infection among Afghans residing in one of the Bushehr refugee camps. *International Journal of Infectious Diseases* 2008; 12:101-102.
102. Giarcia-Montalvo B.M, Farfar-Ale J.A, Acosta-Vidna K.Y, Puerto-Marzano F.I. Hepatitis B virus DNA in blood donors with anti-HBc as a possible indicator of active hepatitis B virus infection in Yucatan, Mexico. *Transfus Med.* 2005;15:371–8.
103. Ramia S, Ramlawi F, Kanaan M, Klayme S and Naman R, 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, *Epidemiol. Infect.* 2005; 133:695–699.
104. Sernia S, Ortis M, Antoniozzi T, Maffongelli E, and La Torre G, Levels of anti-HBs antibody in HBV-vaccinated students enrolled in the faculty of medicine, dentistry

and health professions of a large Italian university, *BioMed Research International* Volume 2015, Article ID 712020, 6 pages

105. WHO and UNICEF estimates of national immunization coverage. 2016 revision, (<http://www.data.unicef.org/child-health/immunization>) Accessed July 2017.
106. Kukka C.M. What is HBV DNA and how is it measured? Hepatitis B fact sheet HCSP • Version 2.2 (www.hbvadvocate.org) Accessed June 2015.
107. Brunetto M.R, Oliveri F, Colombatto P, Moriconi F, Ciccorossi P, Coco B, Romagnoli V, Cherubini B, Moscato G, Maina AM, Cavallone D, Bonino F., Hepatitis B surface antigen serum levels help to distinguish active from inactive hepatitis B virus genotype D carriers. *Gastroenterology*. 2010;139:483-490.
108. Sharma S.K, Saini N and Chwla Y, Hepatitis B virus: inactive carriers, *Virology Journal* 2005, 2:82
109. Esposti S.D, Shah D. Hepatitis B in pregnancy: challenges and treatment. *Gastroenterol Gastroenterology clinics of North America* 2011; 40:355-372.
110. Song Y.M, Sung J, Yang S, Choe Y.H, Chang Y.S, Park W.S. Factors associated with immunoprophylaxis failure against vertical transmission of hepatitis B virus. *European journal of pediatrics* 2007; 166:813-818.
111. Üçbilek E, Abaylı B, Koyuncu M.B, Mıdıklı D, Gözüküçük S, Akdağ A, Özdoğan O, Altıntaş E, Sezgin O. Distribution of hepatitis C virus genotypes among intravenous drug users in the Çukurova region of Turkey. *Turk J Med Sci*. 2016, 46, 66-71.
112. Kramvis A, Kew M, François G. Hepatitis B virus genotypes. *Vaccine*. 2005, 23 2409–2423.
113. Mohebbi S.R, Amini-Bavil-Olyae S, Zali N, Noorinayer B, Derakhshan F, Chiani M, Rostami Nejad M, Antikchi M.H, Sabahi F and Zali M.R. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Iran. *Clin Microbiol Infect*. 2008, 14, 858-866.

114. Haghshenas M.R, Arabi M, Mousavi T. Hepatitis B genotypes in Iran. *Mater Sociomed.* 2014, 26, 129-133.
115. Khodabandehloo M, Roshani D. Prevalence of hepatitis C virus genotypes in Iranian patients: A systematic review and meta-analysis. *Hepat Mon.* 2014, 14, e22915.
116. Jahanbakhsh Sefidi F, Keyvani H, Monavari S.H, Alavian S.M, Fakhim S, Bokharaei-Salim F. Distribution of hepatitis C virus genotypes in Iranian chronic infected patients. *Hepat Mon.* 2013, 13, e7991.
117. Taherkhani R, Farshadpour F. Epidemiology of hepatitis C virus in Iran. *World J Gastroenterol.* 2015, 21, 10790-10810.
118. Mahmood M, Anwar M.A, Khanum A, Zaman N and Raza A. Distribution and clinical significance of hepatitis B virus genotypes in Pakistan. *BMC Gastroenterology.* 2016, 16, 104.
119. Attaullah S, Khan S and Ali I. Hepatitis C virus genotypes in Pakistan: a systemic review. *Virol J.* 2011, 8, 433.
120. Croagh C.M, Desmond P.V, Bell S.J. Genotypes and viral variants in chronic hepatitis B: A review of epidemiology and clinical relevance. *World J Hepatol.* 2015, 7, 289-303.
121. Petruzzello A, Marigliano S, Loquercio G, Cozzolino A, Cacciapuoti C. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: an up-date of the distribution and circulation of hepatitis C virus genotypes. *World J Gastroenterol.* 2016, 22, 7824-7840.
122. Gower E, Estes C, Blach S, Razavi-Shearer K, Razavi H. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. *Journal of Hepatology.* 2014, 61, S45–S57.
123. Opaleye O.O, Japhet O.M, Adewumi O.M, Omoruyi E.C, Akanbi O.A, Oluremi A.S, Wang B, Tong H.V, Velavan T.P and Bock C.T. Molecular epidemiology of hepatitis D virus circulating in Southwestern Nigeria. *Virol J.* 2016, 13, 61.

124. Caligiuri P, Cerruti R, Icardi G, Bruzzone B. Overview of hepatitis B virus mutations and their implications in the management of infection. *World J Gastroenterol.* 2016, 22, 145-154
125. Amini-Bavil-Olyae S, Herbers U, Mohebbi S.R, Sabahi F, Zali M.R, Luedde T, Trautwein C, Tacke F. Prevalence, viral replication efficiency and drug sensitivity towards Adefovir of Q215 polymerase mutations in the hepatitis B virus genome. *J Hepatol.* 2009, 51, 647-654.
126. Yamani L.N, Yano Y, Utsumi T, Wasityastuti W, Rinonce H.T, Widasari D.I, Juniasuti, Lusida M.I, Soetjpto and Hayashi Y. Profile of mutations in the reverse transcriptase and overlapping surface genes of hepatitis B virus (HBV) in treatment-naïve Indonesian HBV carriers. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2017, 70, 647–655.
127. Wu Y, Gan Y, Gao F, Zhao Z, Jin Y, Zhu Y, Sun Z, Wu H, Chen T, Wang J, Sun Y, Fan C, Xiang Y, Qian G, Groopman J.D, Gu J, Tu H. Novel natural mutations in the hepatitis B virus reverse transcriptase domain associated with hepatocellular carcinoma. *PloS one.* 2014, 9, e94864.
128. Lee C.M, Hung C.H, Lu S.N, Changchien C.S, Hepatitis C virus genotypes: Clinical relevance and therapeutic implications. *Chang Gung Med J.* 2008, 31, 16-25.
129. Costantino A, Spada E, Equestre M, Bruni R, Tritarelli E, Coppola N, Sagnelli C, Sagnelli E and Ciccaglione A.R, Naturally occurring mutations associated with resistance to HCV NS5B polymerase and NS3 protease inhibitors in treatment naïve patients with chronic hepatitis C. *Viol J.* 2015, 12, 186
130. Amini-Bavil-Olyae S, Vucur M, Luedde T, Trautwein C and Tacke F, Differential impact of immune escape mutations G145R and P120T on the replication of lamivudine-resistant hepatitis B virus e antigen-positive and -negative strains. *J Virol.* 2010, 84, 1026–1033.
131. Coppola N, Onorato L, Minichini C, Di Caprio G, Starace M, Sagnelli C, Sagnelli E, Clinical significance of hepatitis B surface antigen mutants. *World J Hepatol.* 2015, 7, 2729-2739.

132. Jammeh S, Thomas H.C, and Karayiannis P, Replicative Competence of the T131I, K141E, and G145R Surface Variants of Hepatitis B Virus . *J Infect Dis.* 2007, 196, 1010-1013.
133. Gogos CA, Fouka K, Nikiforidis GC, Avgeridis K, Sakellaropoulos G, Bassaris H, Maniatis A and Skoutelis A, Prevalence of hepatitis B and C virus infection in the general population and selected groups in South-Western Greece. *European Journal of Epidemiology* 2003; 18: 551–557.
134. Ahmadi Pour M.H, Keivani H, Sabahi F, Alavian S.M. Determination of HCV Genotypes, in Iran by PCR-RFLP. *Iranian J Publ Health*, Vol. 35, No. 4, 2006, pp.54-61
135. Kenneth J. Ryan, C. George Ray. *Sherris Medical Microbiology*, 6e Chapter 13: Hepatitis Viruses, Copyright © 2018 by McGraw-Hill Education
136. Jake Liang T. Hepatitis B: The Virus and Disease *HEPATOLOGY*, 2009. Vol. 49, No. 5,S13-S21
137. Suresh D. Sharma. Hepatitis C virus: Molecular biology & current therapeutic options. *Indian J Med Res* 131, January 2010, pp 17-34
138. Bartenschlager R, Lohmann V and Penin F. The molecular and structural basis of advanced antiviral therapy for hepatitis C virus infection. *Nature Reviews Microbiology* volume 11, pages 482–496 (2013)
139. Alfaiate D, Dény P and Durante D. Hepatitis delta virus: From biological and medical aspects to current and investigational therapeutic options. *Antiviral Research* 2015, 122; 112-129



8. EKLER

Çalışma ile ilgili kullanılan PCR koşulları ve protokolleri ekte verilmiştir. Ayrıca çalışma ile ilgili yayın bilgileri de bu bölümde yer almıştır.



EK-1 : VİRAL NA İZOLASYONU

- 1- 750 µl Lizis tamponu + 3.75 µl polyA + 20 µl Proteinaz K (+ 2.5 µl iç kontrol) + 250 µl serum
- 2- İyiçe Vorteks yapıldıktan sonra 15 dakika 57 C⁰ da bekletilir.
- 3- Üzerine 750 µl etanol ekle ve 3dk oda sıcaklığında bekletilir
- 4- Silikalı tüplere aktar ve 1dk 5000 rpmda santrifüje et (2 kare) - alttaki tüpü değiştirilir(çözeltiyi atılır)
- 5- 700 µl Wash1 buffer eklenir (kullanmadan önce 1/1 etanol eklenmesi gerekiyor)
- 6- 1dk 5000 rpmda santrifüj edilir - alttaki tüp değiştirilir (çözeltiyi atılır)
- 7- 700 µl Wash 2 buffer eklenir (kullanmadan önce 1/4 etanol eklenmesi gerekiyor)
- 8- 1dk 13000 rpmda santrifüj edilir - alttaki tüp değiştirilir (çözeltiyi atılır)
- 9- 700 µl etanol eklenir
- 10- 1dk 13000 rpmda santrifüj edilir - alttaki tüp değiştirilir (çözeltiyi atılır)
- 11- 60 C⁰ da 10dk beklenir
- 12- 1dk 14000 rpmda santrifüj edilir
- 13- 50 µl Elution buffer eklenir ve 3dk bekletilir (filtrenin altına genomu almak istediğin eppendorf tüpü yerleştirilir.)
- 14- 1dk 5000 + 1 dk 13000 santrifüj edilir
- 15- Filtre atılır.

EK-2: ÇALIŞMADA KULLANILAN PRİMER- PROBE SETLERİ

Çizelge 8.2.0.1. HBV, HCV ve HDV Viral yük tayininde kullanılan primer prob listesi

Dizi adı	Dizi	Modifikasyon (lar)
HBV forward	GATGTGTCTGCGGCGTTTTATC	
HBV reverse	GAGGACAAACGGGCAACATAC	
HBV reverse-2	GAGGACACACGGGCAACATAC	
HBV probe	5'-FAM- CCTCTGCATCCTGCTGCTATGCCTCATCTTC –IOB-3'	5'-/56-FAM/ - /3IABkFQ/-3'
HBV probe-2	5'-FAM- CCTCTTCATCCTGCTGCTATGCCTCATCTTC –IOB-3'	5'-/56-FAM/ - /3IABkFQ/-3'
HBV IC probe	5'-HEX- CTTCTACTCCGTATCGTCGTCCTACTTCTCC –IOB-3'	5'-/5HEX/ - /3IABkFQ/-3'
HCV forward:	TGCACGGTCTACGAGACCTC	
HCV reverse	TTGGGTCGCGAAAGGCCTTG	
HCV reverse-2	TTGGGTTGCGAAAGGCCTTG	
HCV probe	5'-FAM- CACTCGCAAGCACCTATCAGGCAGTACC –IOB-3'	5'-/56-FAM/ - /3IABkFQ/-3'
HCV IC probe	5'-HEX- CTCAGCAGAGTCACTCACGCACAGTCCAC –IOB-3'	5'-/5HEX/ - /3IABkFQ/-3'
HDV forward	TCGGGTCGGCATGGCATCT	
HDV reverse	CWCTCCCTTAGCCATCCGAG	(W=T veya A)
HDV Taqman probe	5'-FAM-TCCTCCTWCGGATGCCAGGTCGGA-TAMRA-3'	(W=T veyaA)

Çizelge 8.0.2.2. HBV, HCV ve HDV Genotip tespitinde kullanılan primer listesi

Dizi adı	Dizi	Modifikasyon (lar)
HBV PRE-S1	GGG TCA CCA TAT TCT TGG GAA CAA GA	
HBV PRE-S2	GCA GGG GTC CTA GGA ATC CTG ATG	
HBV P1	CCG GAA AGC TTG AGC TCT TCT TTT TCA CCT CTG CCT AAT CA	
HBV	CCG GAA AGC TTG AGC TCT TCA AAA AGT TGC ATG GTG CTG G	
Forward 3	GCT ATG CCT CAT CTT CTT GTT GGT	
Forward 5	GGC AGG TCC CCT AGA AGA AGA ACT	
HCV forward:	TAT GAY ACC CGY TGC TTT GAC	(Y= C veya T)
HCV reverse	GAG GAG CAA GAT GTT ATC AGC TC	
HCV reverse-2	GAA TAC CTG GTC ATA GCC TCC G	
HDV-B1	ACC TCC AGA GGA CCC CTT CAG CGA A	
HDV-B2	GAG GGA GCT CCC CCG GCG AAG AG	

EK- 3: HBV REAL TIME PCR PROTOKOLU

HBV viral yükün belirlenmesi için 'RTA HBV real time PCR kiti' kullanışı

1.Adım: Reaksiyon karışımının hazırlanması (Toplam hacim 10 µl olacak şekilde)

RTA HBV Mix A 6 µl

RTA HBV Mix B 4 µl

2.Adım: Reaksiyon karışımına kalıp DNA eklenmesi (Toplam hacim 20 µl olacak şekilde)

RTA HBV reaksiyon karışımı 10 µl

HBV viral DNA 10 µl

3.Adım: Termal Döngü Programı

Program Adı	Döngü	BIO-RAD CFX96-IVD Programı	
Sıcak Başlangıç	1	95 °C	10 dakika
Amplifikasyon*	45	95 °C	30 saniye
		57 °C	60 saniye
		72 °C	30 saniye

* Floresan 72 °C'de ölçülür; FAM ve HEX / VIC / JOE kanalları seçilmelidir

WHO standartları ile standardize edilmiş hedef bölgeyi içeren ve yükü 10^7 IU/ml, 10^6 IU/ml, 10^5 IU/ml ve 10^4 IU/ml olan plasmidlar, standard olarak kullanılmıştır.

EK-4: HCV REAL TIME PCR PROTOKOLU

HCV viral yükün belirlenmesinde 'RTA HCV real time PCR kiti' kullanışı

1.Adım: Reaksiyon karışımının hazırlanması (Toplam hacim 10 µl olacak şekilde)

RTA HCV Reaction Mix 9.4 µl

RTA HCV Enzyme Mix 0.6 µl

2.Adım: Reaksiyon karışımına kalıp DNA eklenmesi (Toplam hacim 20 µl olacak şekilde)

RTA HCV reaksiyon karışımı 10 µl

HCV viral RNA 10 µl

3.Adım: Termal Döngü Programı

Program Adı	Döngü	BIO-RAD CFX96-IVD Programı	
cDNA Sentezi	1	45 °C	30 dakika
Sıcak Başlangıç	1	95 °C	10 dakika
Amplifikasyon*	45	95 °C	30 saniye
		58 °C	60 saniye
		72 °C	30 saniye

* Floresan 72 °C'de ölçülür; FAM ve HEX / VIC / JOE kanalları seçilmelidir

WHO standartları ile standardize edilmiş hedef bölgeyi içeren ve yükü 10^7 IU/ml, 10^6 IU/ml, 10^5 IU/ml ve 10^4 IU/ml olan plasmidlar, standard olarak kullanılmıştır.

EK-5: HDV REAL TIME PCR PROTOKOLU

1. Aşama: cDNA sentezi

'Transcriptor First Strand cDNA' kiti kullanılarak aşağıdaki adımları takip ederek yapılmıştır.

A) 1X Kalıp RNA-Primer Karışımının hazırlanması (TPM):

1. Ekstrakte edilmiş 10 µl HDV RNA (kalıp RNA) 0.2 ml'lik tüpe pipetlenir.
2. 2 µl random hexamer solüsyonu eklenir (6 numaralı tüp).
3. 1 µl H₂O eklenir (7 numaralı tüp).
4. Yavaşça karıştırılır ve kısaca döndürülerek çöktürülür.
5. 10 dakika 65 °C inkübe edilir.
6. İnkübasyon sonrası buzda bekletilir.

B) 1X Transkripsiyon Reaksiyon Karışımının hazırlanması (TRM):

1. Steril bir ependorf tüpe aşağıdaki karışım hazırlanır:
 - a. 4 µl Transcriptor RT reaction buffer (2 numaralı tüp)
 - b. 0.5 µl Protector RNase Inhibitor (3 numaralı tüp)
 - c. 2 µl dNTP Mix (4 numaralı tüp)
 - d. 0.5 µl Transcriptor Reverse Transcriptase (1 numaralı kırmızı kapaklı tüp).
 - e. Yavaşça karıştır ve kısaca döndürerek çöktür
2. TRM solüsyonundan 7 µl'yi, 13 µl TPM içeren 0.2 ml'lik PCR tüplerine toplam hacim 20 µl olacak şekilde aktılır.
3. Vortekslenir ve kısaca döndürerek çöktürülür.

C) cDNA sentezi reaksiyonunun kurulması

10 dakika 25 °C'de

30 dakika 55 °C'de

5 dakika 85 °C'de

2. Aşama: Real Time PCR Reaksiyonunun Hazırlanması

Light Cyclers 480 Probes Master kiti kullanılarak aşağıdaki karışım hazırlanır

Probe	0.6 µl
primer F	0.6 µl
primer R	0.6 µl
Probe master	10 µl
ddH ₂ O	3.2 µl
Sentezlenmiş cDNA veya standart	5 µl

3. Aşama: Termal Döngü Programı

Program Adı	Döngü	Light Cyclers 480 Programı	
Sıcak Başlangıç	1	95 °C	5 dakika
Amplifikasyon*	45	94 °C	20 saniye
		60 °C	60 saniye
		40 °C	30 saniye

*HDV RNA ve standartların tespiti için FAM filtresi (465-510) ve internal kontrolün tespiti için Vic/Hex/Yellow555 (533-580) filtresi kullanılmaktadır.

Viral yükü bilinen yüksek pozitif örneği 1/10 seyretmesi ile elde edilen numuneler, standard olarak kullanılmıştır.

EK- 6: HBV GENOTİPLEMESİ İÇİN AMPLİFİKASYON KOŞULLARI

1. Aşama: geneleksen PCR karışımın hazırlanması

Reaksiyon maddesi	Stok Konsantrasyonu	Kullanılan hacim
Tampon	10x	5 µl
dNTPmix	2 mM	4 µl
MgCl ₂	25 mM	1.5 µl
Düz Primer	10pmol/µl	1.5 µl
Ters Primer	10pmol/µl	1.5 µl
Taq DNA Polimeraz	5 U/ µl	0.35 µl
Su	-	6.15 µl
Kalıp DNA	-	5 µl

2.Aşama: Termal döngü programı

Program Adı	Döngü	BIO-RAD CFX96-IVD Programı	
Sıcak Başlangıç	1	95 °C	5 dakika
Amplifikasyon*	45	95 °C	30 saniye
		53 °C	45 saniye
		72 °C	1 dakika
Son Uzatma	1	72 °C	7 dakika
Soğutma	1	4 °C	∞

EK- 7: HBV S VE HBV POL GENLERİ İÇEREN SEGMENTARIN AMPLİFİKASYON KOŞULLARI

1.Aşama: Reaksiyon karışımının hazırlanması

Reaksiyon maddesi	Stok Konsantrasyon	Kullanılan hacim
Tampon	10x	5 µl
dNTPmix	2 mM	5 µl
MgCl ₂	25 mM	2 µl
Düz Primer	10pmol/µl	1.5 µl
Ters Primer	10pmol/µl	1.5 µl
Taq DNA Polimeraz	5 U/ µl	1 µl
Jelatin*	% 0.01	5 µl
Su	-	24 µl
Kalıp DNA	-	5 µl

*Jelatin Taq polimerazı stabilize eder. Daha iyi bir verim alabilmesi için % 0.01 şekilde PCR karışımına ilave edilmiştir.

2.Aşama: Termal döngü programı

Program Adı	Döngü	BIO-RAD CFX96-IVD Programı	
Sıcak Başlangıç	1	94 °C	2 dakika
Amplifikasyon	10	94 °C	40 saniye
		60 °C	1.5 dakika
		68 °C	3 dakika
Amplifikasyon	10	94 °C	40 saniye
		60 °C	1.5 dakika
		68 °C	5 dakika
Amplifikasyon	10	94 °C	40 saniye
		60 °C	1.5 dakika
		68 °C	7 dakika
Amplifikasyon	10	94 °C	40 saniye
		60 °C	1.5 dakika
		68 °C	9 dakika
Son Uzatma	1	72 °C	20 dakika
Soğutma	1	4 °C	∞

EK- 8: HCV VE HDV RNA'DAN CDNA SENTEZİ PROTOKOLU

1.Aşama: reaksiyon karışımının hazırlanması

Reaksiyon maddesi	Stok Konsantrasyon	Kullanılan hacim
AMV Tampon	5x	4 µl
dNTPmix	2 mM	4 µl
Ters Primer	10pmol/µl	2 µl
AMV RT Enzimi	4 U/ µl	0.3 µl
Su	-	4.7 µl
Kalıp RNA	-	5 µl

2.Aşama: Termal döngü programı

Program Adı	Döngü	BIO-RAD CFX96-IVD Programı	
Denatürasyon	1	95 °C	3 dakika
Ters Transkripsiyon	1	42 °C	1.5 saat

EK-9: NS5B AMPLİFİKASYON KOŞULLARI

1.Aşama: 1. Ve 2. tur PCR reaksiyon karışımının hazırlanması

Reaksiyon maddesi	Stok Konsantrasyon	Kullanılan hacim
Tampon	10x	5 µl
dNTPmix	2 mM	5 µl
MgCl ₂	25 mM	3 µl
Düz Primer	10pmol/µl	2.5 µl
Ters Primer	10pmol/µl	2.5 µl
Taq DNA Polimeraz	5 U/ µl	0.5 µl
Su	-	26 µl
cDNA/DNA	-	5 µl

2.Aşama: 1. Ve 2.tur PCR termal döngü programı

Program Adı	Döngü	BIO-RAD CFX96-IVD Programı	
Sıcak Başlangıç	1	95 °C	5 dakika
Amplifikasyon	35	95 °C	30 saniye
		56 °C	30 saniye
		72 °C	1 dakika
Son Uzatma	1	72 °C	7 dakika
Soğutma	1	4 °C	∞

EK-10: HDAG AMPLİFİKASYON KOŞULLARI

1.Aşama: Reaksiyon karışımın hazırlanması

Reaksiyon maddesi	Stok Konsantrasyon	Kullanılan hacim
Tampon	10x	5 µl
dNTPmix	2 mM	5 µl
MgCl ₂	25 mM	2 µl
Düz Primer	10pmol/µl	2.5 µl
Ters Primer	10pmol/µl	2.5 µl
Taq DNA Polimeraz	5 U/ µl	0.5 µl
Su	-	27.5 µl
cDNA	-	5 µl

2.Aşama: Termal döngü programı

Program Adı	Döngü	BIO-RAD CFX96-IVD Programı	
Sıcak Başlangıç	1	94 °C	5 dakika
Amplifikasyon	35	94 °C	40 saniye
		65 °C	1.5 dakika
		68 °C	3 dakika
Son Uzatma	1	72 °C	7 dakika
Soğutma	1	4 °C	∞

EK-11: SEKANSLAMA YÖNTEMİ PROTOKOLU

1. AŞAMA: PCR ÜRÜNLERİNİN AGAROZ JELDE GÖRÜNTÜLENMESİ
400 ml 1x TAE solüsyonu + 0,4 ml toz agaroz ile %1'lik agaroz hazırlanır.
Mikroalgada çözelti çözdürülür. EtBr eklenerek UV altında görüntüleme yapılır.
2. AŞAMA: PCR ÜRÜNLERİNİN SİLİKA İLE TEMİZLENMESİ
 - pozitif çıkan örneklerin PCR ürünlerine 50 µl silika eklenir
 - 4600 rpm de 1 dakika santrifüj yapılır
 - üst kısmı alttaki silikalı peleti bozmadan pipetle çekip atılır
 - altta kalan peletin üzerine %70 lik 50 µl etilalkohol eklenir
 - 4600 rpm de 1 dakika santrifüj yapılır
 - üst kısmı alttaki silikalı peleti bozmadan pipetle çekip atılır
 - peletin üzerine 50 µl su eklenir
 - vorteks yapılır
 - 72 °C de 15 dakika tüplerin kapağı açık şekilde bekletilir
 - 4600 rpm de 1 dakika santrifüj yapılır
3. AŞAMA: NANODROPLA DNA MİKTARININ ÖLÇÜLMESİ

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.

4. AŞAMA: SEKANS PCR

Reaksiyon maddesi	Konsantrasyon	Kullanılan hacim
Sekans Tamponu	5x	1.75 µl
Primer	3.2 pmol/µl	1 µl
Big Dye	-	0.5 µl
ddH ₂ O	-	5.75 µl
DNA	10ng/µl	1 µl

5. Aşama: Termal döngü programı

Program Adı	Döngü	BIO-RAD CFX96-IVD Programı	
Sıcak Başlangıç	1	94 °C	1 dakika
Amplifikasyon	25	94 °C	10 saniye
		50 °C	5 saniye
		60 °C	4 dakika

6. AŞAMA: SEKANS PCR IN TEMİZLENMESİ

- Tüp başına 1 µl NAOAC ve 25 µl %100 lük alkolden hazırladığımız karışımdan tüplere 26 µl olarak dağıtılır
- Kapakları kapatıp elimizle çalkalayıp 10 dakika oda sıcaklığında bekletilir
- 10 dakika 4500 rpm de santrifüj yapılır
- İçindeki sıvı pipetle boşaltılır
- Üzerine 35 µl %70 lik etanol eklenir ve 4500 rpm de 5 dakika santrifüj yapılır
- Tüpün içindeki sıvı pipetle boşaltılır
- Her bir tüpe 20 µl formamid eklenir ve vorteks yapılır
- Kısa bir santrifüj yapıp cihaza yüklenir

EK-12: ETİK MEKTUBU

**Islamic Republic of Afghanistan**
Ministry of Public Health
Afghanistan National Public Health Institute
Institutional Review Board
Date: Feb. / 10 / 2016

**جمهوری اسلامی افغانستان**
وزارت صحت عامه
انستیتوت ملی صحت عامه افغانستان

**د افغانستان اسلامي جمهوریت**
د عامې روغتیا وزارت
د انستیتوت ملي روغتیا ملي انستیتوت
No. **361537**

To: Prof. Dr. A. Mithat BOZDAYI
Ankara University
Hepatology Institute

Subject: Approval for proposal entitled, "Molecular Epidemiology of HBV, HCV and HDV in general population of Afghanistan. Which genotypes circulate among afghan people?"

Dear Bozdayi,

Institutional Review Board, Ministry of Public Health has examined and reviewed your proposal entitled, "Molecular Epidemiology of HBV, HCV and HDV in general population of Afghanistan. Which genotypes circulate among afghan people?"

We are pleased to note satisfactory response therefore, your study is approved. However, we reserve the rights to monitor and audit your study and any violation of ethical norms during the course of study shall lead to withdrawal of given approval.

The duration of approval for a study to begin the research project is valid for six months and the exact date of research project implementation (start and end) should be informed to IRB secretary.

You are bound to share the result of your study with MoPH prior any dissemination plan.

Note: Please sign an agreement letter between sender and receiver of the samples and focus on it about the points which you have mentioned in the study protocol.

Sincerely,


Bashir Noormal *MD, MPH*
Director General
Afghanistan National Public Health Institute (ANPHI) &
Chairman, Institutional Review Board (IRB)
Ministry of Public Health

Telephone No: +93 (0) 20 29 21 426
Email Address: anphic@aphnrc.af
Website: www.anphic.af
Postal Address: 3rd Floor of Main Building of Ministry of Public Health,
Kabul, Afghanistan

+93 (0) 20 29 21 425
anphic@aphnrc.af
www.anphic.af
مجلس سید کعبه محمدی وزارت صحت عامه
کابل، افغانستان

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Abbas Ali HUSSEINI

Doğum Yeri: Afganistan

Doğum Tarihi: 05.11.1984

Medeni Hali: Evli

Ana Dili: Farsça

Yabancı Dili: İngilizce, Türkçe

Eğitim Durumu

Ön Lisans: İran tıp bilimi ve sağlık hizmetleri üniversitesi

Lisans: Kashan tıp bilimi ve sağlık hizmetleri üniversitesi(1999-2005)

Yüksek Lisans: Ankara üniversitesi-Biyoteknoloji Enstitüsü (2005-2008)

Yayınlar

Karataylı SC, Bozdayı M, Karataylı E, Öztürk T, Hussein AA, Albayrak R, Özkan M, Kalaylıoğlu Z, Yalçın K, Çınar K, İdilman R, Yurdaydın C. Interleukin-28 gene polymorphisms may contribute to HBsAg persistence and the development of HBeAg-negative chronic hepatitis B. Liver Int. 2015 Mar;35(3):846-53. doi: 10.1111/liv.12595. Epub 2014 Jun 10.

Hussein AA, Islam Saeed KM, Yurdcu E and Bozdayi AM. Molecular epidemiology of HBV, HCV and HDV in general population of Afghanistan. J Immunol Tech Infect Dis 2017 DOI : 10.4172/2329-9541-C1-005 (ScientificTracks Abstracts)

HUSSEINI AA, Islam Saeed KM, SERTÖZ R, BOZDAYI AM, Seroepidemiology of HIV-1 and HTLV I\II in Afghanistan. International Conference on Infection Control and Clinical Microbiology 2017 DOI : 10.4172/2329-9541-C1-006 (Poster)

Kongre-Toplantı Bildirileri

Husseini AA, Islam Saeed KM, Yurdcu E and Bozdayi AM. Molecular epidemiology of HBV, HCV and HDV in general population of Afghanistan. **International Conference on Infection Control and Clinical Microbiology September 25-26, 2017 Chicago, USA**

HUSSEINI AA, Islam Saeed KM, SERTÖZ R, BOZDAYI AM, Seroepidemiology of HIV-1 and HTLV I/II in Afghanistan. **International Conference on Infection Control and Clinical Microbiology September 25-26, 2017 Chicago, USA**

Husseini AA, Islam Saeed KM, Yurdcu E and Bozdayi AM. Afganistan'ın genel popülasyonunda HBV, HCV ve HDV'nin moleküler epidemiyolojisi, **4.Ulusal Mikrobioloji Kongresi, 08-12 Kasım 2017, Antalya**

HUSSEINI AA, Islam Saeed KM, SERTÖZ R, BOZDAYI AM, Afganistan'da HIV-1 ve HTLV I/II'nin seroepidemiolojisi, **4.Ulusal Mikrobioloji Kongresi, 08-12 Kasım 2017, Antalya**

Husseini AA, Islam Saeed KM, Yurdcu E and Bozdayi AM. Afganistan'ın şehirlerinde viral hepatit serolojik belirteçlerinin seropositifliği, **4.Ulusal Mikrobioloji Kongresi, 08-12 Kasım 2017, Antalya**

İş Tecrübesi

Kurumu: Rah-e-Farda radio & TV-Afganistan

Media aracılığı ile halk sağlığı eğitim programı

Görevi: Yönetmen

Yılları: 2009-2012

Kurumu: Vatan Hastanesi-Afganistan

Görevi: Pazarlama Müdürü

Yılları: 2012-2014

Kurumu: RTA Laboratuvarları Biyolojik Ürünler İlaç San-Türkiye

Görevi: Moleküler üretim Müdürü

Yılları: 2012-2014

Kurumu: Nukleon Nükleer Teknoloji Araştırma San. ve Tic

Görevi: Üretim uzmanı

Yılları: 2012-2014

Kurslar

IATA dangerous goods regulations

Havacılık Eğitim Merkezi (HEM) - 13.10.2017-17.10.2017 (56 saat)

ISO 9001:2015 Kalite Yönetim Sistemi

RTA Laboratuvarları - 01.03.2016-03.03.2016 (16 saat)

GMP (Good Manufacturing Practice)

BTS Bilişim Eğitim ve Danışmanlık Ltd. Şti - 07.07.2018 (8 saat)

10. TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR

Husseini AA, Islam Saeed KM, Yurdcu E and Bozdayi AM. Molecular epidemiology of HBV, HCV and HDV in general population of Afghanistan. J Immunol Tech Infect Dis 2017 DOI : 10.4172/2329-9541-C1-005 (ScientificTracks Abstracts)

