

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ YÜKSEK LİSANS
TEZİ

**Ülkemizde Akut Viral Hepatit A Enfeksiyonlu Hastalardan
Elde Edilen Hepatit A Virüsünün Moleküler
Karakterizasyonu**

Duygu KOYUNCU

**Danışman Öğretim Üyesi
Prof. Dr. A.Mithat BOZDAYI**

**ANKARA
2011**

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Hepatit A Virüsü	2
1.2. HAV Virion Yapısı	3
1.3. HAV Genom Organizasyonu	3
1.4 HAV Viral Proteinleri	5
1.4.1 Yapısal proteinler	6
1.4.2 Yapısal olmayan proteinler	7
1.5 HAV Hayat Döngüsü	8
1.5.1 Virüsün hücre içine girişi	9
1.5.2 Protein translasyonu ve proteinlerin işlenmesi	9
1.5.3 RNA replikasyonu	10
1.6 HAV epidemiyolojisi	11
1.7 HAV tanı ve tedavisi	15
1.7.1 HAV spesifik antikorların saptanması	16
1.7.2 Antijen saptanması	17
1.7.3 Moleküler yöntemlerle saptanması	17
1.8 HAV Genotiplendirilmesi, Kullanılan Bölgeler ve Yöntemler	18
1.9 HAV Bulaş Yolları	20
1.10 Önlemler	20
2. KAYNAK ÖZETLERİ	22
2.1 Türkiyeyi de Kapsayan HAV Genotiplendirme Çalışmaları	22
3. MATERYAL VE METODLAR	23
3.1 Materyaller	23
3.1.1 Hasta grupları	23
3.1.2 Primerler	23
3.1.3 Kimyasallar	24
3.1.4 Enzimler	24

3.1.5 Tampon çözeltiler	25
3.1.6 Kullanılan kitler	25
3.1.7 Cihazlar	25
3.2. Metodlar	27
3.2.1 HAV RNA izolasyonu	27
3.2.2 cDNA eldesi	27
3.2.3 Nested-PCR	28
3.2.4 Agaroz jel elektroforezi	30
3.2.5 PCR ürünü temizleme	30
3.2.6 Nanodropta ölçüm	30
3.2.7 Sekans PCR	30
3.2.8 Sekans PCR temizleme	31
3.2.9 Örneklerin cihaza yüklenmesi	31
3.2.10 Filogenetik ağaç oluşturulması ve genotiplerin belirlenmesi	32
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	33
4.1 Örneklerin Jel Görüntüleri	33
4.2 Sekans PCR Ürünlerinin Dizi Analiz Sonuçları	34
4.3 HAV Genotiplerinin MEGA 4.1 Programına Bağlı Olarak Filogenetik Analizinin yapılması	35
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	41
KAYNAKLAR	44

ÖZET

Ülkemizde Akut Viral Hepatit A Enfeksiyonlu Hastalardan Elde Edilen Hepatit A Virüsünün Moleküler Karakterizasyonu

Hepatit A virüsü (HAV) özellikle gelişmekte olan ülkelerde yaygın olmak üzere küresel bir sağlık problemidir. Özellikle çocukluk döneminde meydana gelen hepatitinde en yaygın sebebidir. HAV pozitif tek zincirli bir RNA virüsü olup, 3 insan 3 maymunumsu genotipi olmak üzere toplam 6 genotipi vardır. Bu çalışmanın amacı ise, Türkiye'nin farklı coğrafi bölgelerinden HAV ile enfekte olmuş hasta serumlarının analizlerine bağlı olarak en yaygın HAV genotipini saptamaktır.

Farklı coğrafi bölgelerden serumları elde edilen 137 hastanın VP1-2A bölgelerinin sekans ve filogenetik analizleri sonucunda Türkiye'de ki en yaygın genotip IB olarak bulundu (%100). Türk izolatları ile genotip IB arasında yapılan karşılaştırmada aradaki benzerlik %94.9 oldu. Türk izolatlar kendi aralarında "Mean Percentage Nucleotide Distance" analizi ile karşılaştırıldıklarında ise arada ki benzerlik % 95.3 ile % 100 arasında değişkenlik gösterdi.

Yapılan filogenetik analizler sonucunda Türkiye'de ki en yaygın genotipin IB olduğu gözlemlendi. Yapılan sekans analizi sonucunda elde edilen veriler, lokal veya büyük bir salgının var olup olmadığının anlaşılmasında önemli bir veri kaynağı oluşturarak, yapılacak olan müdahalelerin doğru ve zamanında olmasına yardımcı olmaktadır.

Anahtar kelimeler: Hepatit A virüsü, genotipleme, filogenetik analiz

ABSTRACT

Molecular Characterization of Hepatitis A Virus Isolated From Acute Infections in Turkey

Hepatitis A virus (HAV) is a global public health problem especially in developing countries and the most common cause of hepatitis in childhood. HAV is a single stranded positive RNA virus subdivided to 6 genotypes (3 human, 3 simian). The aim of this study was to determine the prevalent genotype in Turkey using sera of acute HAV infected patients from different geographical regions of the country.

Sera of 137 patients with acute HAV were collected for phylogenetic analysis from different geographical regions. Sequencing and phylogenetic analysis of VP1-2A junction of HAV showed that the most prevalent genotype in Turkey is 1B (100%). Comparison of Turkish isolates and reference sequences of genotype 1B showed a similarity of 94.9%. When Turkish isolates were compared with each other according to Mean Percentage Nucleotide Distance analysis, similarity varied between 95.3% and 100%.

Phylogenetic analysis pointed out that all Turkish isolates belong to genotype 1B. Sequence analysis is a useful tool in revealing hepatitis A outbreaks, and allows us to detect and distinguish the presence of epidemic and small outbreaks.

Key words: Hepatitis A Virus, genotyping, phylogenetic analysis

TEŞEKKÜR

Öncelikle yüksek lisans tezimi yapma olanağını sağladığı ve motivasyonumu hiç düşürmeden, gerekli her türlü çalışma imkanımı sağlayan danışman öğretmenim Prof. Dr. A. Mithat Bozdayı'ya,

Tezim boyunca ve laboratuvar çalışmalarım boyunca engin bilgilerini benden ve tüm arkadaşlarımdan hiç esirgmeden paylaşan, laboratuvar ortamını aynı zamanda zaman geçirebilecek eğlenceli bir ortam haline getirdiği için çok saygı duyduğum, aynı zamanda çok sevgili Dr. Ersin Karataylı'ya,

Ankara serüveni boyunca arkadaşlıkları ve destekleri ile her zaman yanımda olan hem çalışma arkadaşlarım ve sonradan çok sevgili dostlarımla olan Esra Çelik ve Miray Akgüç'e,

En önemli teşekkürüm gece gündüz sürekli beraber olmamıza rağmen hiçbir zaman birbirimizden sıkılmadığımız, mükemmel dostluğu ile en iyi ve en kötü zamanlarımda her zaman yanımda olan, hem meslektaşım hem dostum hem yoldaşım İnci Çelik'e,

Ankara günlerimi mükemmelleştiren, hayatıma büyük neşe ve anlam katan ömür boyu tam zamanlı arkadaşım olacak Burak Çelik'e,

Ve son olarak beni hiç sorgulamadan her zaman destekleyen, ömrümü güzelleştiren hayatımın en önemli iki parçası annem ve babama sonsuz teşekkür ederim.

Duygu KOYUNCU

Ankara, Ekim 2011

Nesrin-Nurettin Koyuncu'ya...

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Hepatit A Virüsünün elektron mikroskopundan elde edilen görüntüsü.....	1
Şekil 1.2 HAV genom organizasyonu.....	4
Şekil 1.3 HAV yapısal proteinleri şematik gösterimi (VP1, VP2, VP3, VP4).....	6
Şekil 1.4 HAV hayat döngüsü.....	8
Şekil 1.5 HAV transkripsiyon sonrasında meydana gelen modifikasyonlar sonucu oluşan protein bölgelerinin şematik gösterimi.....	10
Şekil 1.6 HAV Enfeksiyonun coğrafik dağılımı.....	13
Şekil 1.7 HAV enfeksiyonu sonrasında değişen virüs miktarı, ALT seviyesi, IgM ve IgG değerleri.....	15
Şekil 1.8 HAV genotiplendirilmesi için sıklıkla kullanılan bölgeler.....	18
Şekil 1.9 HAV genotiplerinin coğrafik dağılımı.....	19
Şekil 4.1 2. tur PCR sonucunda elde edilen örneklerin %1'lik agaroz jelde yürütülmesinin ardından elde edilen jel görüntüsü.....	31
Şekil 4.2 VP1-2A bölgesine ait örneklerden elde edilen DNA dizimlerinin FinchTV programındaki görüntüsü.....	32
Şekil 4.3 40 hastanın ve 10 referans sekansın VP1-2A bölgelerinin MEGA 4.1 programı ile hizlanması.....	34
Şekil 4.4 76 hasta ile 10 referans sekansı kullanılarak Neighbour-Joining metodu ile VP1-2A bölgelerinin filogenetik analiz ile ağaç çizilmesi.....	35

TABLolar DİZİNİ

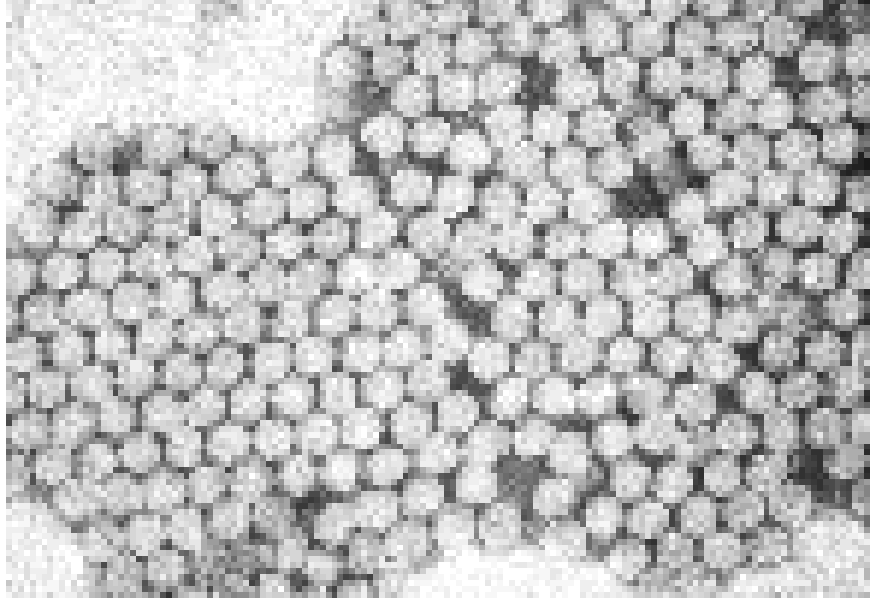
Tablo 1.1. HAV proteinleri ve genel özellikleri.....	5
Tablo 1.2 Bölgesel HAV görülme oranları.....	14
Tablo 3.1 Sekanslama için kullanılan HAV hastalarının genel özellikleri ve IgM bilgileri.....	22
Tablo 3.2 Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan primerler ve dizileri.....	22
Tablo 3.3 Deneylerde kullanılan Kimyasallar ve Üretildikleri Firmalar.....	23
Tablo 3.4 Enzimler.....	23
Tablo 3.5 Kullanılan Tamponlar.....	24
Tablo 3.6 Kullanılan Cihazlar.....	24
Tablo 3.7 cDNA için kullanılan PCR malzemeleri ve miktarları.....	27
Tablo 3.8 1. Tur ve 2. Tur PCR için kullanılan malzemeleri ve miktarları.....	28
Tablo 4.1 Filogenetik analizlerde kullanılmak üzere GenBanktan alınan referans izolatları...	33
Tablo 4.2 VP1-2A bölgesine bağlı olarak Türk izolatları (TR) ile GenBank veritabanından elde edilen referans sekanslar HM175 ve insan HAV genotiplerinin (HAV I-III) “Mean Nucleotide Distance” ile analizleri sonucunda elde edilen veriler.....	37

SİMGELER DİZİNİ

µL	mikrolitre
ALT	Alanin Transaminaz
bp-bç	baz çifti
cDNA	komplement DNA
dH ₂ O	distile su
d	dakika
DNA	Deoksiribo nükleik asit
dNTP	deoksi nükleotit tri-fosfat
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
ELISA	enzyme linked immuno sorbant assay; enzim bağımlı immün test
EtOH	etanol
HAV	Hepatit A Virüsü
HBV	Hepatit B Virüsü
HCV	Hepatit C Virüsü
IgG	Immuno globulin G
IgM	Immuno globulin M
IRES	Internal Ribosomal Entry Site; İnternal Ribozomal Giriş Bölgesi
kb	kilobaz
kDA	kilodalton
MgCl ₂	magnezyum klorür
mM	mili molar
mRNA	messengar RNA, mesajcı RNA
mV	milivolt
n	sayı
NaOAc	sodyum asetat
nm	nanometre
NTR	non-translated region; transle edilmeyen bölge
°C	santigrat derece
ORF	open reading frame; açık okuma çerçevesi
PCR	Polymerase Chain Reaction; polimeraz zincir reaksiyonu
pH	power of hydrogen; suyun gücü
pk	pozitif kontrol
pmol	pikamol
pol	polimeraz
pro	proteaz
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA	Ribo nükleik asit
rpm	revolution per minute, bir dakikada ki döngü
RT-PCR	Reverse Transcription PCR; Ters Trasnkriptaz
SD	standart deviation; standart sapma
sn	saniye
TAE	Tris-Asetik asit-EDTA
TR	Türk İzolatları
U	ünite
UTR	un-translated region; transle olmayan bölge
UV	ultra viyole
VPg	genomik Viral protein
WHO	World Health organization, dünya sağlık örgütü

1 GİRİŞ

Eski Roma, Yunan ve Çin yazıtlarında “jaundice” olarak belirtilen hastalığın günümüzde Hepatit A Virüsü (HAV) olduğu tahmin edilmektedir (Nainan vd 2006). İlk Hepatit A terimi 1967 yılında ortaya çıkmış olup, enfekte olmuş insanlardan alınan örneklerde ilk olarak 1973 yılında immün elektron mikroskobu ile görüntülenmiştir (Martin ve Lemon 2006, Cristina ve Costa-Mattioli 2007). 1979 yılındada seri olarak hücre kültüründe pasajlanmaya başlanmıştır (Purcell ve Emerson 2001).



Şekil 1.1 Hepatit A Virüsünün elektron mikroskobundan elde edilen görüntüsü

Dünya nüfusunun yaklaşık olarak %90'ı bir şekilde HAV ile enfekte olmuştur (Purcell ve Emerson 2001). Her yıl yaklaşık 1.5 milyon vaka bildirilmiş olsada sero-epidemiolojik çalışmalara göre her yıl on milyonlarca kişi virüs ile enfekte olmaktadır (Kulkarni vd 2009). Dolayısı ile HAV günümüzde hepatite yol açan önemli bir insan patojeni olarak kabul edilmekte ve HAV için etkili bir aşı bulunmasına rağmen, tüm dünyada akut hepatite yol açan en önemli etiyolojik ajan olmaya devam etmektedir (Liu vd 2003). HAV'ın yaygınlığı gelişmekte olan ve gelişmiş olan ülkelerde farklılık göstermektedir. Hastalığın fecal-oral yollarla enfekte olmuş kişilerle direkt temas veya kontamine olmuş yiyecek ve içeceklerin tüketimi ile yayılmasından kaynaklı olarak sosyo-ekonomik koşullar ve yaşam alanlarının düzeyi, HAV yaygınlığının değişkenlik göstermesinin en önemli nedenleri olmaktadır (Normann vd 2008).

Hastalığın belirtileri ise çocukluk döneminde genellikle gözlemlenmezken, yaş ortalaması yükseldikçe hastalığın ciddiyeti artmakta, ölüm oranı % 0.1 ile 0.5 arasında gözlemlenirken, 40 yaş üstü bireylerde ölüm oranının %2'ye kadar arttığı görülmektedir (Normann vd 2008)

HAV zaman zaman akut hepatit vakalarına ve fulminant hepatit olan vakalarda ölümcül olabilecek ciddi salgınlara yol açmaktadır. Buna rağmen HAV'ın hiçbir zaman tek başına kronik karaciğer yetmezliğine yol açtığı görülmemiştir (Cristina ve Costa-Mattioli 2007).

Hepatit A virüs enfeksiyonlarında hastaların yaşı, HBV veya HCV ile ko-enfeksiyonu, bayan olması, gibi öğeler karaciğer yetmezliğinde ve ölümcüllükte önem taşımaktadır (Oltmann vd 2008). Enfeksiyon sonrası virüsün inkübasyon süresi yaklaşık olarak 28 gündür (15-50 gün arasında değişkenlik göstermektedir). Hastalığın semptomları çok belirgin olamayabileceğinden kişi istemsiz olarak virüsün yayılmasına sebebiyet verebilmektedir (Keystone ve Hershey 2008)

1.1 Hepatit A Virüsü

Tüm virüsler virionlarının morfolojik, fiziksel ve fizikokimyasal özelliklerine, proteinlerine, lipidlerine, karbonhidratlarına, genom organizasyonlarına, replikasyonlarına, antijenik özelliklerine bağlı olarak sınıflandırılmaktadır. Sınıflandırmaları DNA veya RNA virüsü olmalarına, RNA virüsü ise negatif veya pozitif zincirli olmalarına, zarflı ya da zarfsız olmalarına karşılık değişiklik gösterebilmektedir. Hepatit A Virüsü (HAV) bir RNA virüsü olup, en önemli hepatit virüslerinden biri olarak kabul görmektedir. Picornaviriade ailesinin bir üyesi olan HAV, heptovirüs cinsinin tek üyesidir. HAV ilk olarak enterovirüs 72 olarak tanımlanmış daha sonra nükleotid ve aminoasit dizilimlerinin açığa çıkarılması ile birlikte yeni bir cins olan Hepatovirüse dahil edilmiştir (Melnick 1992.). Hepatovirüs cinsinin tek üyesi olmasının ve de picornaviriade ailesinin diğer üyelerinden ayrılmasının nedenleri genel olarak, düşük pH ve değişen sıcaklık koşullarında stabil kalabilmesi, hücre kültüründe yavaş ve verimsiz replikasyon göstermesi sayılabilirken en önemli farklılıklarının, uzun ve senkronizasyonsuz protein kılıfından ayrılma yöntemi ve viral proteinin mrstat kısmından yoksun olması ve küçük bir VP4 proteinine sahip olması gösterilebilir (Robertson vd 1992, Bishop 2000, Bishop ve Anderson 2000). Fiziksel ajanlara karşı çok stabil duran virüs bu nedenle yiyeceklerde ve suda uzun süre canlı kalabilmektedir (Purcell ve Emerson 2001).

1.2 HAV Virion Yapısı

HAV yaklaşık 27-32 nm olup zarfsız ikozahedral yapıya sahiptir (Konduru vd 2009). HAV RNA'sı her birinden 60 kopya olmak üzere VP1, VP2 ve VP3 kapsid proteinlerinden oluşan ikozahedral kapsid ile çevrilmiştir (Martin and Lemon.2006). HAV ile enfekte olmuş hücrelerden elde edilen bilgilere göre 3 çeşit intakt antijenik HAV partikülü tanımlanmıştır.

- i. VP1, VP2, VP3 ve muhtemelen VP4 proteinlerinden oluşan bir kapsid içerisinde viral RNA içeren virionlar
- ii. VP1, VP0 ve VP3 proteinlerini ve viral RNA içeren provirionlar ya da olgunlaşmamış virionlar
- iii. Provirionlara benzer kapsid formu içeren ancak viral RNA içermeyen boş HAV partikülü olarak tanımlanan prokapsidler (Bishop ve Anderson 2000, Sanchez vd 2004)

Provirionların, RNA- bağımlı bir yolakla VP0 proteinlerinin VP2 ve VP4 proteinlerine dönüştürülmüş olan virionların, olgunlaşmamış hali olduğu düşünülmektedir (Bishop ve Anderson 2000).

1.3 HAV Genom Organizasyonu

HAV genom organizasyonu diğer picornavirüsler ile benzerlik göstermektedir. 7.5 kb uzunluğunda, pozitif tek zincirli RNA virüsü olan HAV temel olarak;

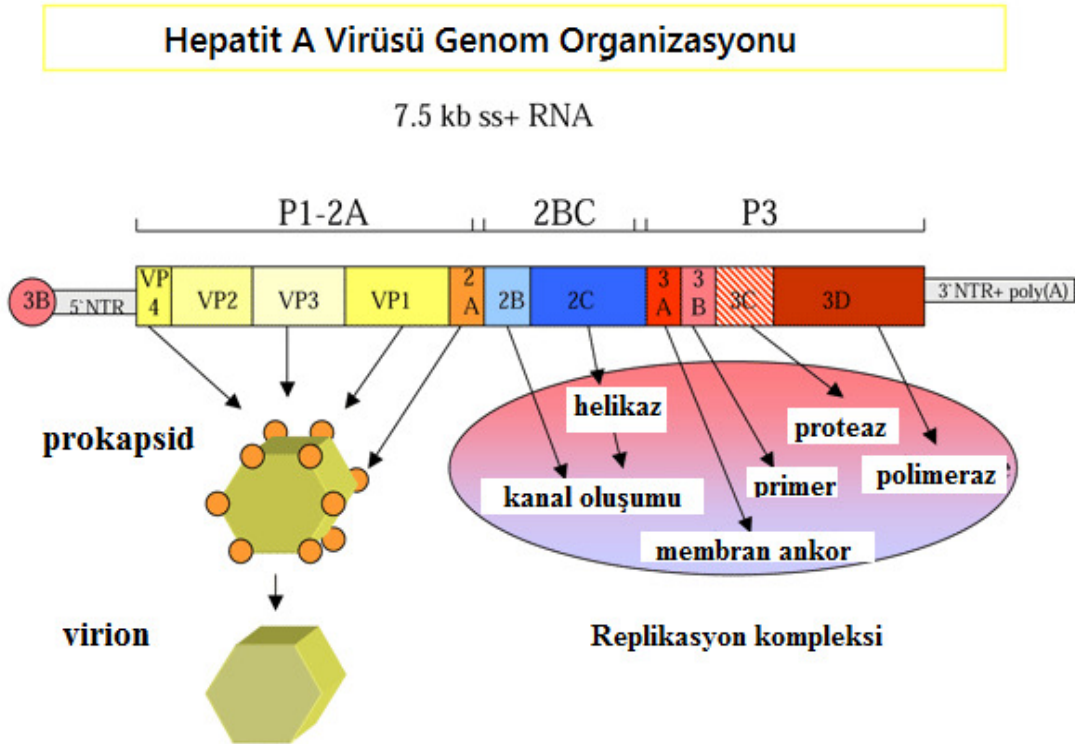
- Diğer virüslerden farklı olarak genomun yaklaşık %10'u kadar bir bölgeye sahip 750 nükleotidlik kodlamayan 5' bölgesine (5' UTR),
- Yaklaşık 6680 nükleotid uzunluğunda tek bir okuma çerçevesine (ORF) sahip olan kodlayan bir bölge,
- yaklaşık 40-80 nükleotid uzunluğunda ucunda polyA bölgesi bulunun 3'kodlamayan bölge (3' NTR)

olmak üzere 3 temel bölümden oluşmaktadır (Cuthbert 2001, Sanchez vd 2004, Hu ve Arsov 2009).

Yaklaşık 750 baz uzunluğundaki 5' UTR bölgesi karmaşık bir yapıya sahip olup viral translasyon için gerekli olan bir IRES(Internal Ribosomal Entry Site) bölgesine sahiptir (Konduru vd 2009). Aynı zamanda HAV'ın 5' kodlamayan bölgesine virüs tarafından kodlanmış VPg proteini kovalent olarak bağlı olarak bulunmaktadır. (Zhang ve Kaplan 1998).

5' UTR bölgesi için 6 ana ikincil yapı domainlerinin varlığı önerilmektedir. Bu önermelere göre ilk iki domainin 5' ucunun 1 ile 95. nükleotidleri arasında konumlanmaktadır, ilk domain hairpin yapısına ikinci domain ise iki stem-loop yapısına (a ve b) sahiptir. Bu yapının ardından uzun bir poliprimidin bölgesi devam etmektedir ardında diğer dört domain 155 ile 734. nükleotidler arasında konumlanmıştır.

Bu bölgeler ve 3' NTR bölgesinde bulunan polyA dizilimleri HAV replikasyonu ve translasyonu için önem taşımaktadır.



Şekil 1.2 HAV genom organizasyonu (Gauss-Müller vd 2007)

1.4 HAV Viral Proteinleri

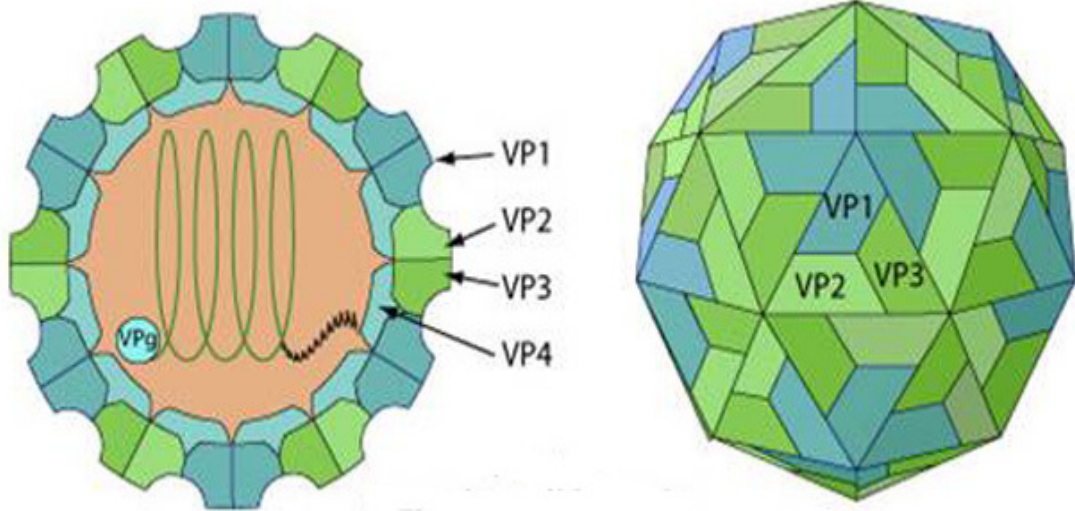
HAV yaklaşık 20 yıl kadar önce hücre kültürüne adapte edilmiş olmasına rağmen, düşük titrelerde virüs oluşumuna bağlı olarak, protein kimyası ve yapıları hakkında yeterli bilgi henüz elde edilememiştir (Cuthbert 2001). HAV tek bir açık okuma çerçevesine sahiptir ve bu tek uzun okuma bölgesi yaklaşık 250 kDa boyutunda olan bir poliprotein kodlamaktadır. Daha sonra bu poliprotein co- ve post-translasyonel değişikliklerle daha küçük olan yapısal ve yapısal olmayan proteinlere dönüştürülmektedir (Konduru vd 2009). HAV'ın kodlayan bölgesi temel olarak P1, P2 ve P3 olmak üzere üç fonksiyonel bölüme ayrılmıştır. Bu bölümlerden P1 bölgesi kapsid proteinleri olan VP1, VP2, VP3, VP4 proteinlerini kodlamakta, P2 ve P3 bölgeleri ise replikasyonda etkin olan 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C^{pro}, 3D^{pol} bölgelerini sırası ile kodlamaktadır (Costa-Mattioli vd 2003, Cristina ve Costa-Mattioli 2007, Kulkarni vd 2009)

Tablo 1.1. HAV proteinleri ve genel özellikleri (norder vd. 2011)

Genomik Bölge	Protein adı	Protein Fonksiyonu
P1	VP1, VP2, VP3, VP4	Ana kapsid proteinleri
P2	2A	Yapısal protein
	2B	Virüs replikasyon kompleksi için membran bağlayıcı protein
	2C	Kapsid oluşumu, virionun kılıftan ayrılması, RNA sentezi gibi mekanizmalarda ATPaz ve helikaz aktivitesi
P3	3A	Virüs replikasyon kompleksi oluşumu için membran sabitleyici protein
	3B	RNA sentezi başlangıcı için primer görevi (VPg)
	3C	Kimotripsin benzeri sistein proteazı
	3D	RNA bağımlı RNA polimeraz

1.4.1 Yapısal proteinler

- **VP1:** Ana kapsid proteini
- **VP2:** Ana kapsid proteini
- **VP3:** Ana kapsid proteini
- **VP4:** Çoğu picornavirüslerde genomlarının amino ucunda yer alan VP4 de dahil olmak üzere kapsidlerinde 4 polipeptide sahiptirler. Hepatit A virüsünün amino ucunda ise çok küçük bir VP4 bölgesi bulunmaktadır ve bu bölgenin virüs morfojenesis için önemi henüz aydınlatılamamıştır. Aynı zamanda yapılan protein izolasyonlarında VP4 proteini tek başına izole edilememiştir. Diğer picornavirüslerde VP4 bölgesinin amino ucunun kristalizasyonu aynı zamanda virion morfojenesis için önem taşırken HAV da bu işlem gerçekleşmemektedir. Bazı bilgilere göre pentamerlerin boş kapside bağlanabilmeleri için VP4'e ihtiyaç olduğu söylene de, bazı çalışmalarda da VP4 olmadan da boş kapsid oluşumu gözlemlenmiştir. (Martin ve Lemon 2006).

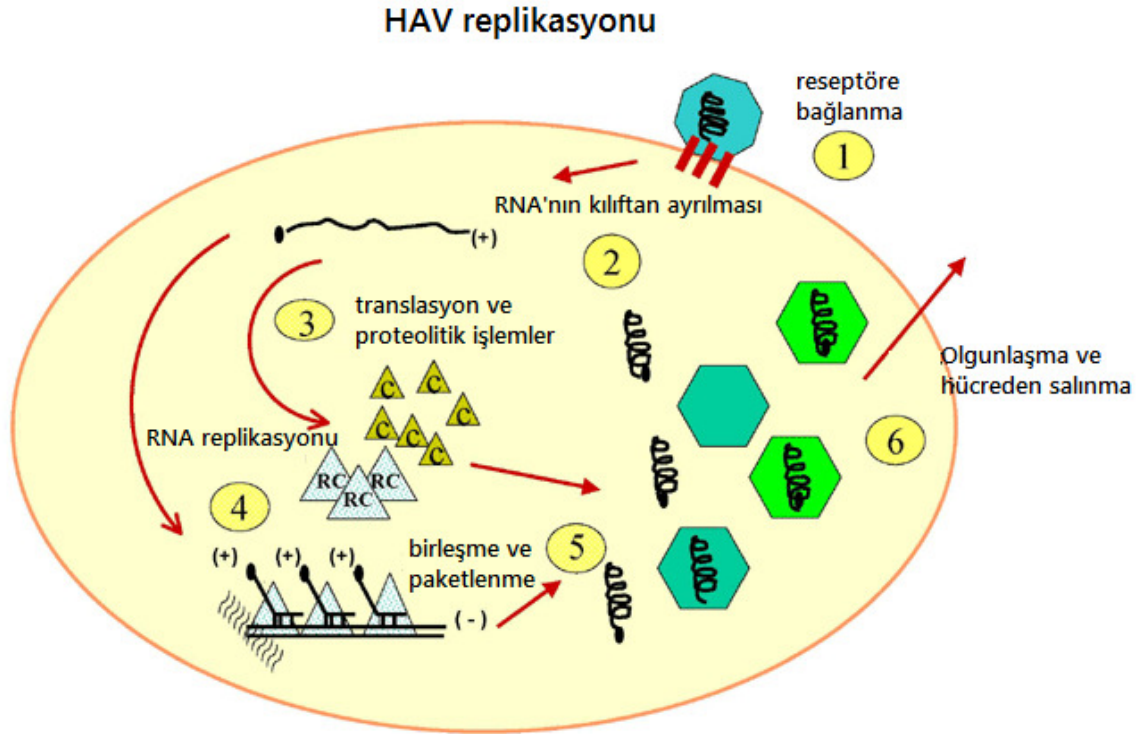


Şekil 1.3 HAV yapısal proteinleri şematik gösterimi (VP1, VP2, VP3, VP4)

1.4.2 Yapısal olmayan proteinler

- **2A:** 2A bölgesi 71 aminoasitlik bir bölgeyi kodlamaktadır. 2A proteinin tam fonksiyonu henüz aydınlatılmamıştır. Yeni yapılan çalışmalara göre 2A proteininin virüs morfojenesisinde rol oynadığı gözlemlenmiştir. 2A bölgesinin çıkarılıp ardından enfekte edilen hücrelerde infeksiyöz bir virüs partikülünün oluşmadığı gözlemlenmiştir. Buna bağlı olarak 2A bölgesinin kapsid oluşumunda önem taşıdığı düşünülmektedir (Martin ve Lemon.2006). 2A bölgesinin delesyonu virüs kapsid proteinlerinin pentamerleşmesini engelleyerek virüs formasyonunu engellediği gözlemlenmiştir.
- **2B:** 251 aminoasit büyüklüğünde olan proteini viral RNA replikasyonda rol oynamaktadır.
- **2C:** 335 aminoasit uzunluğunda olan 2C proteini de 2B gibi viral RNA replikasyonunda rol oynamaktadır. Aynı zamanda bu proteinin helikaz ve NTPaz aktiviteleri bulunmaktadır.
- **3A:** Virüs replikasyon kompleksi oluşumu için membran sabitleyici protein olarak görev almaktadır.
- **3B:** VPg olarak bilinen küçük bir protein bölgesi. Virüs RNA'sında transle olduktan sonra kovalent olarak 5' UTR bölgesine bağlanmaktadır. Aynı zamanda virüs replikasyonu içinde primer görevi üstlenmektedir (Martin ve Lemon 2006). 23 aminoasit uzunluğundadır.
- **3C^{pro}:** Virüs tarafından sentezlenen poliprotein post translasyonel modifikasyonlarla kesimini sağlayan bir sistein proteazıdır. 219 aminoasit uzunluğundadır.
- **3D^{pol}:** RNA bağımlı RNA polimeraz. 489 aminoasit uzunluğundadır.

1.5 HAV Hayat Döngüsü



Şekil 1.4 HAV hayat döngüsü. (1) Virüs hepatosite hücresel bir reseptöre bağlanarak girer. (2) Bu olayın ardından pozitif anlamlı RNA kılıftan ayrılarak hücre içine salınır. (3) 5' UTR bölgesinde bulunan IRES bölgesi cap-bağımsız RNA translasyonunu başlatarak poliprotein oluşturur. Bu poliprotein co- ve post-translasyonel modifikasyonlarla 3C^{pro} viral proteaz aktivitesi ile ana virüs proteinleri oluşturulur. (4) Oluşturulan yapısal olmayan proteinler membran bağımlı RNA replikaz ile birlikte genomun 3' ucuna bağlanarak negatif anlamlı RNA'nın oluşumu sağlanır. Negatif anlamlı RNA'dan da pozitif anlamlı genomik RNA'ların çoğaltılması sağlanır. (5) Oluşan pozitif anlamlı RNA'lar yapısal proteinlerle birleşerek yeni viral partikülü oluşturur. (6) Yeni oluşturulan HAV partikülleri hepatosit hücresinin apikal membranından safra kanallarına salgılanıp, buradan da safraya ve ince bağırsağa yayılır (Martin ve Lemon 2006, Gauss-Müller vd 2007)

1.5.1 Virüsün Hücre İçine Girişi

Afrikan yeşil maymun karaciğer hücrelerinde tanımlanan hücresel bir reseptör olan HAVcr-1'e bağlandıktan sonra HAV genomunun hücre içine girişi henüz aydınlatılmamıştır (Zhang ve Kaplan 1998).

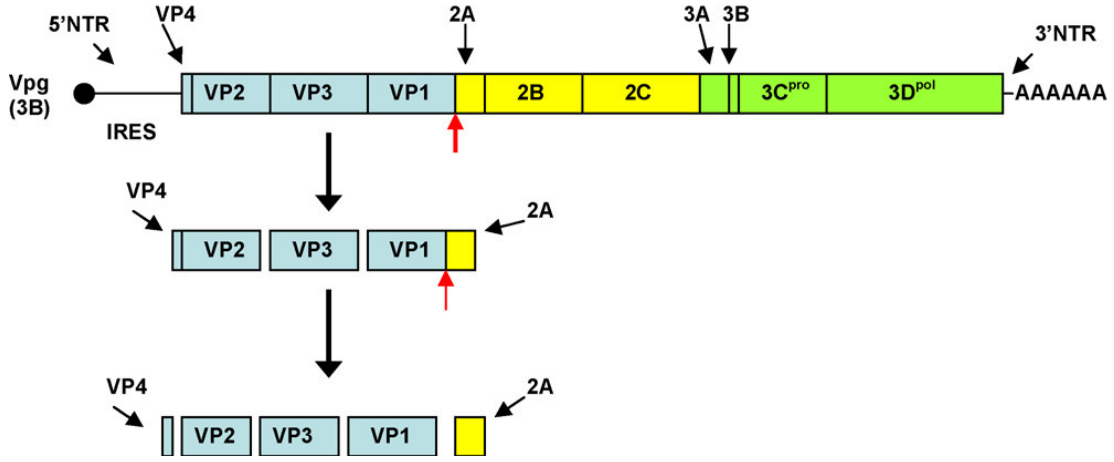
HAV RNA'sının kılıfından ayrılıp hücre içine girebilmesi için HAV partikülünün olgun HAV virionu olması gerekmektedir. Ancak bu şekilde konformasyonel değişikliklerden geçerek viral RNA'nın kılıfından ayrılması mümkün olmaktadır (Bishop 2000).

1.5.2 Protein Translasyonu ve Proteinlerin İşlenmesi

Virüs hücre kılıfından ayrılarak hücre içine girdikten sonra mesaj-anlamalı (pozitif anlamalı) genomik RNA'dan direk olarak viral proteinlerin translasyonu gerçekleşmektedir (Martin ve Lemon 2006).

5' UTR bölgesinin ikincil yapısı HAV translasyonunun indüklenmesi için önem taşımaktadır. Diğer RNA virüslerinde bulunan translasyonun başlatılabilmesi için gerekli olan mRNA'nın 5' ucunda cap bağımlı ribozomal kompleksin oluşturulması picornaviriade RNA'larında bulunmamaktadır. Bunun yerine HAV'ın da dahil olduğu picornavirüslerde 5' UTR bölgesinde ki IRES bölgesi translasyonun başlatılmasında rol oynamaktadır (Cuthbert 2001.). IRES bağımlı meydana gelen translasyonda bir çok translasyon başlatma faktörü rol oynamaktadır. Ancak bu faktörler içerisinde cap-bağlama faktörü olan ökaryotik başlatma faktörü olan 4e yer almamaktadır (Cristina ve Costa-Mattioli 2007).

Translasyonda oluşturulan polipeptid proteolitik olarak kesilmesi translasyonla eş zamanlı olarak 3C^{pro} aktivitesi ile yapılmaktadır (Martin ve Lemon 2006). Diğer iyi çalışılmış picornavirüslerden farklı olarak HAV'da oluşan polipeptid ilk protein kesimi 3C^{pro} tarafından 2A-2B birleşiminin olduğu bölgede gerçekleşmektedir. Ortaya çıkan P1-2A bölgesi daha sonra viral proteaz tarafından kapsid proteininin iki ana öncülleri olan VP0(VP4-VP2) ve VP1-2A (aynı zamanda pX olarak tanımlanmış) proteinlerine ve VP3 kapsid proteinine kesimi yapılmaktadır. VP1-2A bölgesi aynı zamanda virion morfojenesis için önem taşımaktadır. VP1-2A bölgesinin kesimi bilinmeyen hücresel proteazlar tarafından virion morfojenesis işlemi sırasında gerçekleşmektedir. Fakat olgunlaşmış 2A proteinine hiçbir zaman enfekte edilmiş proteinlerden elde edilmiş preparatlarda rastlanmamıştır (Cristina ve Costa-Mattioli 2007).



Şekil 1.5 HAV translasyon sonrasında meydana gelen modifikasyonlar sonucu meydana gelen protein bölgelerinin şematik gösterimi (Cristina ve Costa-Mattioli 2007)

1.5.3 RNA replikasyonu

Yeni verilere göre HAV replikasyonu sadece karaciğer hücreleri olan hepatositlere ve gastrointestinal epitel hücrelerine özgüdür. Ancak yapılan hücre kültür çalışmalarında replikasyonun hepatit hücre hatları olmayan hücrelerde de meydana geldiği gözlemlenmiştir. Virüs replikasyonunun hücre parçalanmasına bağımlı olmadığı gözlemlenmiştir, zira yüksek virüs titrelerinin varlığında herhangi bir hepatosit nekrozuna rastlanmamıştır (Cuthbert 2001).

RNA sentezi yapısal olmayan 2B ve 3D^{pol} bölgelerinden oluşan büyük makromoleküler replikaz kompleksinin oluşması ile hücresel endoplazmik retikulum tarafından sağlanan membran üzerinde gerçekleşmektedir. RNA transkripsiyonu çoğu poliovirüslerde olduğu gibi protein primerleri üzerinden gerçekleşmektedir. HAV transkripsiyonunda da üridiliate edilmiş VPg proteini hem negatif anlamalı hem de pozitif anlamalı RNA'lar için primer olarak rol oynamaktadır. Viral RNA sitoplazma içerisinde bulunduğu sırada bir çok viral proteinlerin oluşmasında yol açmaktadır. Viral RNA'nın kalıp olarak kullanıldığı replikasyon kompleksi oluştuğundan sonra bilinmeyen sayıda ki bu viral proteinler pozitif anlamalı RNA'nın negatif anlamalı RNA'ya dönüşmesinde rol oynarlar. Oluşan negatif anlamalı RNA daha sonra pozitif anlamalı RNA'ların oluşmasında rol oynayarak pozitif anlamalı RNA'nın mRNA olarak kullanılarak viral proteinlerin translasyonunda rol oynamasına ya da enkapside olarak enfeksiyöz virionların oluşmasına olanak sağlamaktadır (de Paula vd 2009).

1.6 HAV Epidemiyolojisi

HAV epidemiyolojisinin aydınlatılması, enfeksiyonun kaynaklarının açığa çıkarılmasına ve konak popülasyonlardaki virüs evriminin anlaşılmasına olanak sağlamaktadır. Kullanılan moleküler belirteçler enfeksiyonun hem tanımlanmasında hem genetik yakınlığının anlaşılmasında görev alarak, enfeksiyon bulaş yolları ve zinciri hakkında da bilgi sağlayarak olası salgınlara önlenmesine yol açabilmektedirler (Nainan vd 2006).

Serolojik analizlere bağlı olarak bölgeler yüksek, orta ve düşük endemik bölge olarak ayırım göstermektedir. Buna bağlı olarak yüksek endemik olarak kabul edilen bölgelerde büyüme çağındaki ve yetişkinlerde yapılan serolojik analizlerde sero-pozitif oranı %100 olurken ki bu durumda virüs ile çocukluk döneminde karşılaşmıştır, orta endemik bölgelerde sero-pozitif bireylerdeki yaş ortalaması çocukluk dönemlerinden büyüme dönemine veya yetişkin döneme kaymaktadır.

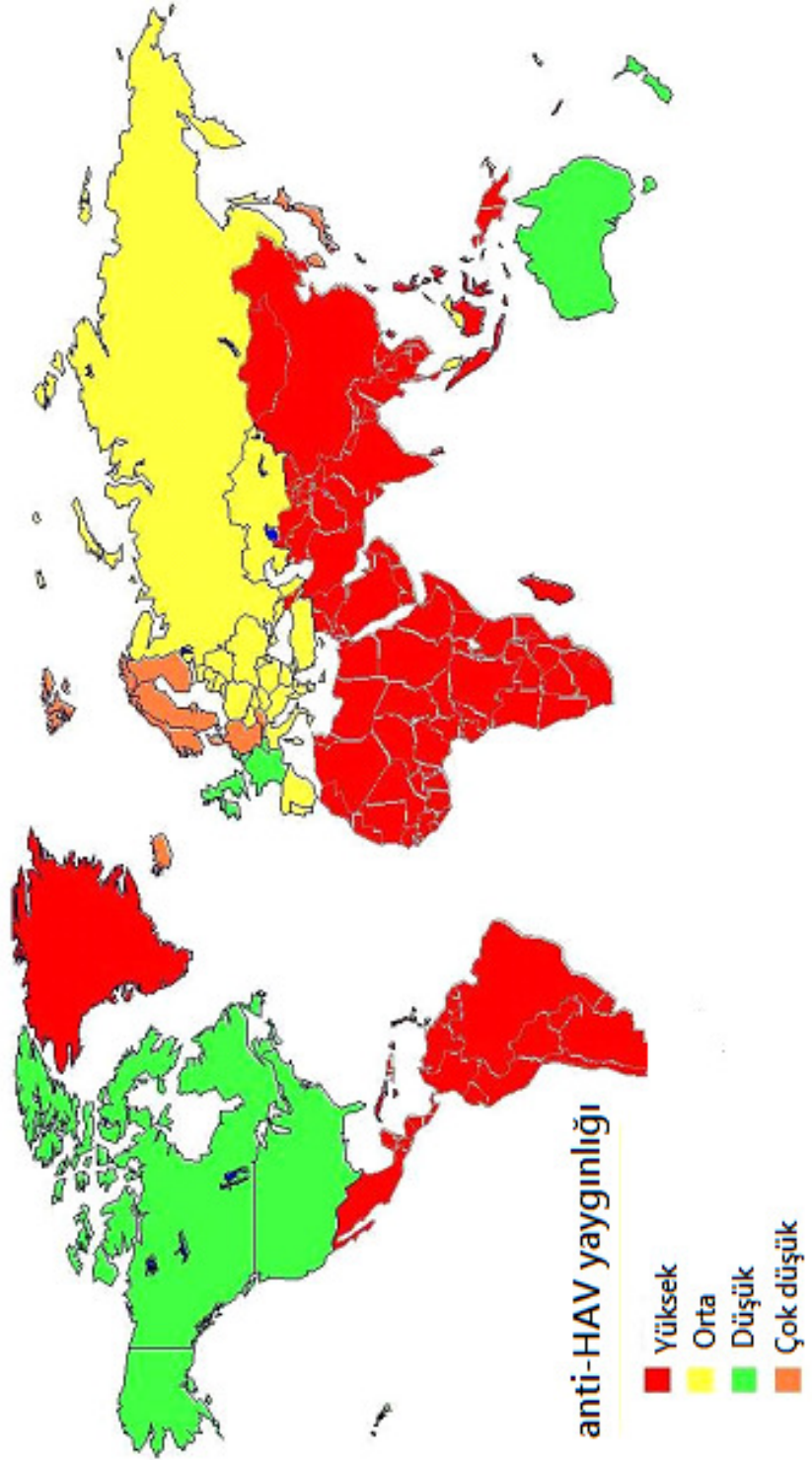
Endemisite seviyeleri ülkelerin gelişmişlik oranlarına bağlı olarak yaşam koşullarının ve hijyen oranının yüksek olmasına bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (Tablo 1.2). Dünyada ki yapılan HAV epidemiyoloji çalışmalarına bakıldığında genel olarak yüksek endemisite görülen alanlar arasında Meksika, Merkez ve Güney Amerika, Afrika, Orta Doğu, Asya ve Batı Pasifik (Japonya hariç) yer alırken, Amerika, Avrupa ve Avustralya düşük endemik bölgeler olarak yer almaktadırlar (Keystone ve Hershey 2008) (Şekil 1.6).

Düşük endemik bölgelerde meydana gelen Hepatit A vakalarının çoğunluğunu yüksek endemik bölgelere yapılan seyahatler oluşturmaktadır. Yapılan çalışmalar incelendiğinde, örneğin Almanya'da yapılan bir çalışmaya göre Hepatit A virüsüne karşı etkili olan aşının yurtdışına seyahat edecek olanlara önerilmesine karşın yüksek veya orta endemik bölgelere seyahat eden bireylerin yaklaşık % 40'ı hepatit A ile enfekte olmaktadır (Faber vd 2009). Seyahat eden kişilerin ziyaret amaçlarının turistik veya aile ziyareti olması hepatit A virüsü ile enfekte olma oranında etkilemektedir. Örneğin Türkiye'de endemisitenin çok daha düşük olduğu Ege bölgesine turistik amaçla gelen bir kişinin, endemisitenin daha yüksek olduğu Doğu Anadolu bölgesine aile ziyareti için gelen bir kişiye kıyasla HAV ile karşı karşıya kalma oranı oldukça düşüktür. Buna bağlı olarak Almanya'da yapılan epidemiyolojik çalışmada Türkiye ile bir şekilde ilişkisi olan hastaların (Türkiye'den göç etmiş olan, Türkiye'ye ziyarete giden, ebeveynlerinden biri Türk olan) genotiplerinin IB olduğu gözlemlenmiştir.

Endemik olan Güney Amerika'da yapılan sistematik immünolojik çalışmalara göre ise düşük gelirli popülasyonların yaklaşık %90'ı 18 yaşında serolojik verilere göre HAV ile enfekte olmuş ve Amerikan ulusal sağlık merkezlerinde ki verilere göre de akut hepatit vakalarının % 50'sinin nedeninin HAV olduğu belirtilmiştir (Garcia-Aguirre ve Cristina 2008). Bu rakamlar tüm dünyada yapılan çalışmalarla paralellik göstermektedir. Jacobsen ve Wiersma'nın yaptığı bir çalışmada, yaş ve bölgelere göre 1990-2005 aralarındaki vakalar sistematik olarak incelendiğinde yaş oranı arttıkça, 85+ yaşından sonra, anti-HAV görülme oranları tüm dünyada, yüksek gelirli Kuzey Amerika hariç, 2005 yılının sonunda %100 olarak görülmüştür (2010).

Yapılan bir başka epidemiyolojik çalışmada ise Amerika'da yiyeceklerden kaynaklı olarak bulaşılan hastalıkların %5'inin HAV olduğu gözlemlenmiştir. Kanada'da yapılan bir çalışmadan elde edilen bilgilere göre ise kayıt altına alınabilmiş vakaların % 10-15 kadarı seyahat eden kişilerde olduğu saptanmıştır. Seyahat eden bireylerde görülen hastalıklara bakıldığında hastalığın görülme oranı ve ölümcüllük oranı koleraya göre 500 kat, poliomyelitise göre 150 kat, hepatit B virüsüne göre 3 kat daha fazla olduğu gözlemlenmiştir (Costa-Mattioli vd 2003, Hu ve Arsov 2009.).

HAV ENFEKSİYONUNUN COĞRAFİK DAĞILIMI



Şekil 1.6 HAV Enfeksiyonunun coğrafik dağılımı

Tablo 1.2 Bölgesel HAV görülme oranları (Jacobsen ve Wiersma 2010)

BÖLGE	WHO uyumlu bölge	2005 nüfusu itibari ile en büyük ülkeleri	endemisite seviyeleri
Yüksek gelirli Pasifik Asya	Batı Pasifik	Japonya, Kore, Singapur	Çok düşük
Merkez Asya	Avrupa	Özbekistan, Kazakistan, Azerbaycan	Orta
Doğu Asya	Batı Pasifik	Çin	Düşük
Güney Asya	Güneydoğu Asya/Doğu Akdeniz	Hindistan, Pakistan, Bangladeş	Yüksek
Güneydoğu Asya	Güneydoğu Asya/Batı Akdeniz	Endonezya, Filipinler, Vietnam	Düşük
Avustralya	Batı Pasifik	Avustralya, Yeni Zelanda	Çok düşük
Karayıplar	Amerika	Küba, Dominik Cumhuriyeti, Haiti	Düşük
Merkez Avrupa	Avrupa	Polonya, Romanya	Düşük
Doğu Avrupa	Avrupa	Rusya, Ukrayna, Belarus	Düşük
Batı Avrupa	Avrupa	Almanya, Fransa, İngiltere	Çok düşük
Andean Latin Amerika	Amerika	Peru, Ekvator, Bolivya	Orta
Merkez Latin Amerika	Amerika	Meksika, Kolombiya, Venezüella	Orta
Güney Latin Amerika	Amerika	Arjantin, Şili, Uruguay	Orta
Tropikal Latin Amerika	Amerika	Brezilya, Paraguay	Orta
Kuzey Afrika/Orta Doğu	Doğu Akdeniz	Mısır, İran, Türkiye	Orta
Yüksek gelirli Kuzey Amerika	Amerika	Amerika, Kanada	Çok düşük
Okyanusya	Batı Pasifik	Papua Yeni Gine, Solomon Adaları, Fiji	Orta
Merkez alt-Sahara Afrika	Afrika	Kongo, Angola	Yüksek
Doğu alt-Sahara Afrika	Afrika	Etiyopya, Tanzanya, Sudan	Yüksek
Güney alt-Sahara Afrika	Afrika	Güney Afrika, Zimbabve, Namibya	Yüksek
Batı alt-Sahara Afrika	Afrika	Nijerya, Gana, Cote d'Ivoire	Yüksek

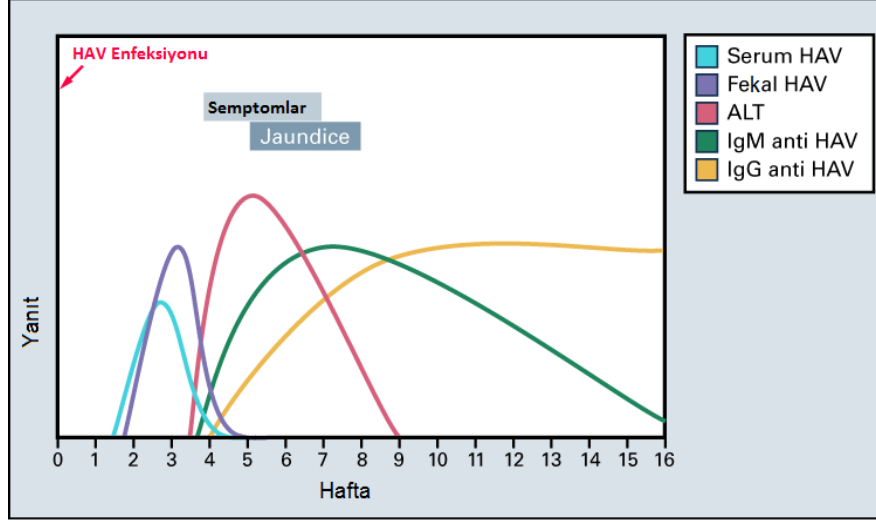
1.7 HAV Tamı ve Tedavi

Hepatit A virüsü ile enfekte olan hastaların yaşları hastalığın seyri için önem taşımaktadır. Çocuklarda enfeksiyon çoğunlukla asemptomatik olurken, yetişkinlerde hastalığın kliniği hafif sarılık olmayan enfeksiyondan, ciddi fulminant hepatit yetmezliğine kadar ilerleyebilmektedir (Garcia-Aguirre ve Cristina 2008.). Bu nedenle hastalığın erken safhada tespit edilmesi ölüm oranının ve hastalığın seyrinin ciddiyeti açısından önem kazanmaktadır.

HAV ile enfekte olan kişilerde meydana gelen belirtiler arasında nezle, kırıklık, iştah kaybı, ishal, kusma, mide rahatsızlığı, koyu renkli idrar, gözde ve ten renginde sararma yer alırken bu semptomların hepsi birden kişide kendini göstermez (WHO).

HAV enfeksiyonu belirlenen hastaların tedavisi için belirli bir ilaç ve yöntem bulunmazken hastalara bağışıklıklarını güçlendirecek diyetler ve istirahat önerilmektedir. Kaybettikleri vücut sıvılarını artırıcı besinler almaları önerilmektedir. Enfeksiyon genellikle kendiliğinden geçmekle beraber yetişkin hastaların klinik takibi önem arz etmektedir(WHO). Pasif bir immunoglobulin tedavisi akut HAV enfeksiyonunu önleyebilirken, bu tedavinin hastalığın ilk iki haftasında damar içine uygulandığında verimi >%85 daha fazla olmaktadır (Keystone ve Hershey 2008)

HAV karaciğerde çoğalarak viremia oluşturduktan sonra safraya salgılanır ve kişinin dışkına salınır. Hastalığın seyri sırasında IgM, IgG, virüs miktarı incelendiğinde IgM değerinin 3 ile 6 ay içerisinde düşmeye başladığı bir müddet sonra testler tarafından saptanamadığı gözlemlenmiştir. IgG antikorları ise IgM oluştuktan hemen sonra oluşmaya başlar ve hayat boyu bağışıklık sağlar.



Şekil 1.7 HAV enfeksiyonu sonrasında değişen virüs miktarı, ALT seviyesi, IgM ve IgG değerleri

HAV enfeksiyonunun tespiti için moleküler ve immünolojik tespitlere dayanan birçok yöntem yer almaktadır. Birbirleri ile kıyaslandığında hem hassaslık hem hızlı tespit açısından moleküler yöntemlerin kullanımı daha uygun olmakla birlikte klinikte genellikle immünolojik saptama yöntemleri daha yaygındır.

1.7.1 HAV spesifik antikorların saptanması

Akut enfeksiyon tanısı için yaygın olarak IgM anti-HAV birincil belirteç olarak saptanmaktadır. IgM anti-HAV temel olarak kapsid proteinlerine karşı oluşturulur. IgM anti-HAV belirlemek amacı ile radyoimmünoassay, immünokimyasal boyama, ELİSA, immün blotlama, dot-blot immünogold filtrasyon gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. IgM anti-HAV ELİSA testleri ilk olarak tasarlandıklarında enfeksiyonun ardından 4-6 hafta kadar bir süre zarfının ardından ancak saptama sağlarken, yeni testler yeni HAV aşısı olmuş bir bireyde bile IgM anti-HAV tespit edebilmektedir (Nainan vd 2006).

Daha önce HAV enfeksiyonu ile karşılaşmış karşılaşılmadığının anlaşılması IgG anti-HAV tayini ile belirlenmektedir ancak piyasadaki testler total anti-HAV (hem IgG hem IgM antikorları) saptamaktadır. Bu durumda total anti-HAV varlığı ancak IgM anti-HAV yokluğu enfeksiyonun yeni ya da eski olup olmadığının belirlenmesinde belirleyici olmaktadır (Nainan vd 2006).

1.7.2 Antijen saptanması

Hepatit A virüsü hücre kültürüne çok zor adapte olmaktadır. İnsan ve insan orijinli olmayan birçok hücre hattında HAV çalışmaları yapılmakta ancak yapılan çalışmalarda oluşan virüs ve viral antijenler diğer virüslerle karşılaştırıldığında çok düşük oranlarda kalmaktadır. HAV hücre hattında herhangi bir sitopatik etki yaratmadığından ve hücresel zarara yol açmadığından HAV antijeni saptamak için immünolojik testler yapılmaktadır. Bunun için enfektiviteyi ölçmek amacı ile kullanılan yöntemler arasında radyoimmünofokus testi, florasan fokus testi, in situ radyoimmüno testi bulunmaktadır.

Klinik ve çevresel elementlerden elde edilen örneklerde HAV antijeni saptanması içinde yine radyoimmüno testler ve enzim immüno testler kullanılmaktadır. Ancak kan örneklerinde antijen saptamak fibronektinin HAV'a bağlanarak immünolojik saptama için gerekli olan antijen içerenlerini maskeleyiği için oldukça zordur (Nainan vd 2006).

1.7.3 Moleküler yöntemlerle saptanması

Nükleik asit saptama teknikleri, farklı örneklemelerden HAV varlığının tespiti için antijen varlığını saptayan immünolojik testlerinden daha hassas yöntemlerdir. HAV RFLP (Restriction fragment length polymorphism), "single-strand" konformasyonel polimorfizm, Southern blotlama, nükleik asit sekansı, nükleik asit hibridizasyonu, ters transkripsiyon PCR (RT-PCR) ve antijen yakalayan RT-PCR gibi birçok yöntemle HAV saptanması yapılabilmektedir.

Klinik ve çevresel örneklerden HAV RNA izolasyonu RT-PCR için ilk basamaktır ve farklı örnekler için izolasyonlarda farklı tekniklere ihtiyaç vardır. Önceki protokollerde serumdan veya dışkıdan yapılan izolasyonlarda proteinaz K kullanımını fenol-kloroform izolasyonu takip eder ve etanol uçurma sonucunda nükleik RNA elde edilir. Daha sonra guanidyum tiosiyanat fenol-kloroform izolasyonu piyasadaki kitlerde RNA ve total nükleik asit izolasyonu için uygun hale getirildi böylece izolasyonlarda ki verim ve hassasiyet artırılmış oldu.

RNA'dan komplement DNA(cDNA) oluşturulması esnasında ana materyaldeki bazı inhibitörlerin varlığı verimi düşürürken kullanılan Rnaz içermeyen çözeltiler ve materyaller amplifikasyonun verimini oldukça arttırdığı düşünülmektedir. HAV saptanması için kullanılan RT-PCR yöntemi genellikle iki tur PCR yapılarak saptanmaktadır. Zaman kazandıran hem cDNA hem PCR işleminin aynı anda yapıldığı

yöntemlerde tasarlanmıştır ancak bu yöntemlerde hem hassasiyet azalmış hemde verim geleneksel yöntemle nazaran yaklaşık 1 log kadar daha düşük kalmıştır.

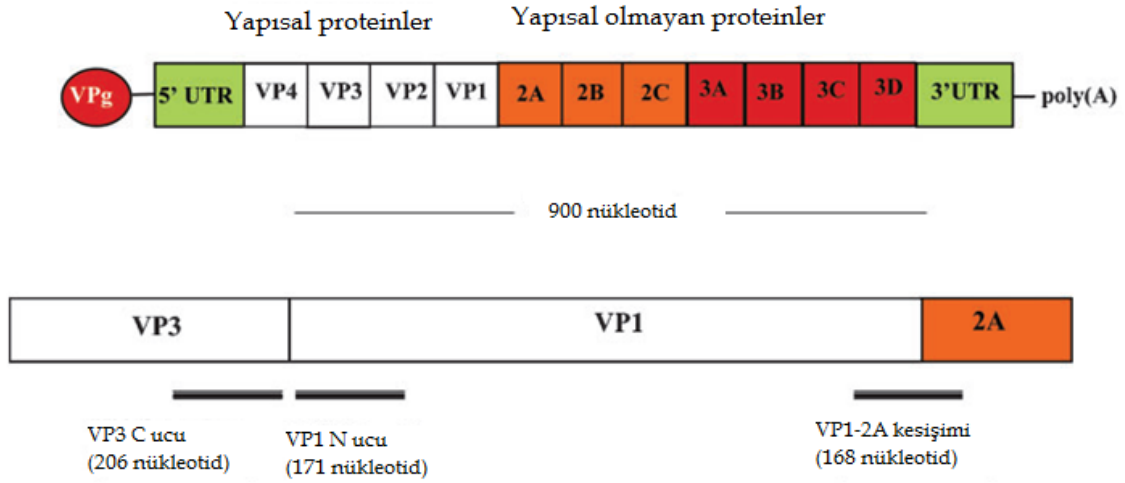
Eş-zamanlı PCR HAV saptanması için yüksek hızı, hassasiyeti, tekrarlanabilirliği ve kontaminasyonun minimize edilmesi açısından HAV saptanması için bir devrim niteliğindedir. Eş-zamanlı PCR'da gerekli olan döngü sayısının azaltılması, ihtiyaç olan replikon uzunluğunun az olması, kullanılan elektronik saptama materyallerinin hassaslığı en çabuk saptamayı sağlamaktadır. Eş-zamanlı PCR da DNA-bağlayan florofor, ya da SYBR green basitlikleri açısından yaygınca kullanılmaktadır.

Elde edilen PCR ürünlerinin dizilenmesi sonucunda örneklerin hassasiyetleri, hangi organizasyona ait oldukları ve çeşitli karakterizasyonu en kesin sonuçlarla mümkün olmaktadır. Orijinal nükleik asit dizi yöntemi Sanger ve arkadaşları tarafından bağımsız işaretleme yöntemi ve ardından konvansiyonel jel elektroforezi ile yapılırken bu yöntem yerini modernize ederek yüksek verimli ve örnekli yöntemlerle florasan işaretli bazlarla ve kapilerler kullanılarak geliştirilerek yaygın olarak kullanılmaktadır.

1.8 HAV Genotiplendirilmesi, Kullanılan Bölgeler ve Yöntemler

Hepatit A virüsü diğer virüslerden farklı olarak daha korunmuş bir genoma sahiptir. Genomu üzerinde meydana gelen mutasyon oranı çok düşük olmasından kaynaklı olarak farklı izolatları arasındaki genetik çeşitlilik çok düşüktür. HAV'ın bu korunmuş yapısı genotiplendirmede sorun teşkil etse de HAV genomu üzerinde ki en fazla genetik farklılık bölge olan VP1-2A bölgesi genotiplendirme çalışmaları için oldukça fazla kullanılmaktadır. Bu bölge dışında genotiplendirme için kullanılan bölgeler arasında,

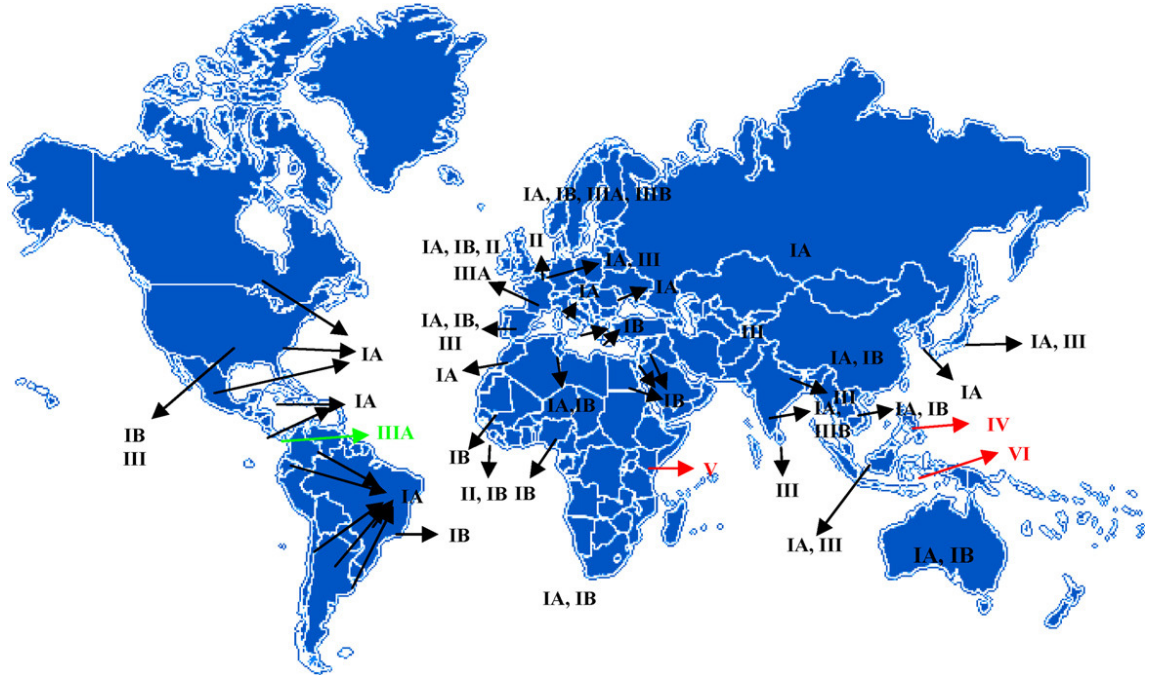
- VP3 bölgesinin karboksil ucu
- VP1 bölgesinin amino ucu
- VP1-2A kesişim bölgesi
- VP1 bölgesinin tamamı yer almaktadır (Lee vd 2009).



Şekil 1.8 HAV genotiplendirmesi için sıklıkla kullanılan bölgeler (Costa-Mattioli vd 2003)

HAV 1992 yılında Robertson ve arkadaşları tarafından ilk defa genotiplendirildiğinde toplam 7 ayrı gruba ayrıldı. Bu sınıflandırmada çoğunlukla kullanılan VP1-2A bölgesine bağlı olarak yapıldı. Daha sonra yapılan çalışmalarda genotiplendirme için kullanılan diğer bölgelerinde çoğaltılıp değerlendirilmesine bağlı olarak bu 7 genotipten genotip II ve genotip VII'nin aynı genotipin alt tipleri olduğu görüldü. Buna bağlı olarak genotip II ve VII genotip II'nin alt tipleri olarak yeniden sınıflandırılıp genotip IIA ve genotip IIB olarak tanımlandı (Lu vd 2004).

Dünyada ki genotip paternleri incelendiğinde genotip I, özellikle genotip IA tüm dünyada en yaygın olarak gözlemlenen genotip olurken, Kuzey Amerika, Çin, Japonya, eski çarlık Rusya ve Tayland bölgeleri bu genotipin görüldüğü bölgeler olarak sayılabilmektedir. Genotip IB ise Ürdün, Kuzey Afrika, Avustralya, Avrupa ve Japonya'da yaygın olarak görülebilen bir genotip olmaktadır (Costa-Mattioli vd 2003) (Şekil 1.9). Genotip III Güneydoğu ve Merkez Asya'da daha yaygın gözlemlenirken, genotip IIIA damar yolu ile uyuşturucu kullananlar arasında daha yaygın olup İsveç de Norveç'te görülmektedir. Yeni elde edilen verilere göre ise Rusya da genotipin IIIA'ya doğru kaydığı gözlemlenmeye başlanmıştır (Kulkarni vd 2009).



Şekil 1.9 HAV genotiplerinin coğrafik dağılımı (Cristina ve Costa-Mattioli 2007)

1.9 HAV Bulaş Yolları

Hepatit A virüsünün birincil bulaşı fekal-oral yollarla meydana gelmektedir. Enfekte olan kişilerin büyük çoğunluğunu enfekte olmuş biriyle kontakt halinde olanlar oluştururken, bu çoğunluğu ana okullarında ve kreşlerde çalışanlar, yurt dışına seyahat edenler, homoseksüel ilişkide bulunanlar, damardan uyuşturucu madde kullananlar ve de yiyecek-içecek kontaminasyonu sonucu oluşan salgınlardan enfeksiyon olanlar sırası ile oluşturmaktadırlar.

1.10 Önlemler

HAV sadece bir tane korunmuş immünojenik nötralizasyon bölgesine sahip olup, dünyanın değişik yerlerinden elde edilen izolatlar incelendiğinde sadece bir tane serotipe sahip olduğu görülmüştür (Garcia-Aguirre ve Cristina 2008). HAV diğer RNA virüslerinden farklı olarak genomunda çok düşük mutasyonlar oluşturmaktadır, bir bölgede ki tek bazlık bir mutasyon oranı 1×10^{-3} ile 1×10^{-4} kadar düşüktür (Sanchez vd 2003). Bu nedenle ve aynı zamanda tek bir serotipe ve düşük antijeniteye sahip olan hepatit A virüsünde genotip IB'ye göre tasarlanmış olan aşılar tüm HAV genotipleri için etkin olmaktadır (Nguu vd 2008). Aşı iki doz halinde alındığında yaşam boyu bağışıklık sağlamaktadır (FitzSimons

vd 2010). Bu bağlamda oldukça etkin olan aşular hem tek başlarına hem de Hepatit B aşısı ile birlikte kombin olarak alınabilmektedir.

HAV aşısı Amerika'da rutin olarak önerilmektedir. Endemik bölgelere seyahatler sırasında yapılması çoğu gelişmiş ülkelerde önerilmektedir. Seyahat edenler, askerde olanlar, anaokullarında ve kreşlerde çalışanlar, sağlık alanında çalışanlar, sebze-meyve sağlayıcılar, kanalizasyon işlerinde çalışanlar, kan nakli yapılanlar, homoseksüeller, uyuşturucu bağımlıları risk altında olan ana grupları oluşturmaktadırlar (Franco vd 2003). Bu grupların önlem olarak aşılması olabilecek salgınların engellenmesinde önemli rol oynayacaktır.

Bu tez konusunda, Türkiye'de ki yaygın HAV genotipinin bulunarak epidemiyoloji çalışmalarına katkı sağlamak, olası salgınlarda gerekli sağlık müdahalelerinin yapılabilmesi için gerekli veriyi sağlamak amaçlanmıştır.

2 Kaynak özetleri

2.1 Türkiye'yi de Kapsayan HAV Genotiplendirme Çalışmaları

Almanya'da Faber ve arkadaşlarının 2007 ve 2008 yıllarındaki Hepatit A virüsü ile enfekte olmuş hastaların üzerinden yapılan çalışmada elde edilen sonuçlar incelendiğinde; hastalardan seyahat amaçlı ya da aile ziyareti amaçlı bir şekilde Türkiye'ye gelmiş olanların genotiplerinin IB olduğu gözlemlenmiştir. (Faber vd 2009).

Normann ve arkadaşlarının yaptığı çalışma esas olarak genotiplendirme çalışması olmamakla birlikte genotiplendirme için seçilen iki farklı bölgenin verimliliğini irdeleyen çalışmada her iki farklı bölgenin dizi analizinden elde edilen bilgilere bakıldığında Türkiye'de ki yaygın genotip IB olarak bulunmuştur (2008).

3 Materyal ve Metodlar

3.1 Materyaller

3.1.1 Hasta grupları

Araştırmada kullanılan hasta serumlarından elde edilen RNA'lar Türkiye'nin çeşitli coğrafi bölgelerinden farklı hastanelerden toplanmıştır. Çalışmaya İzmir, Kayseri, Van ve Şanlıurfa'dan hastalar dahil edilmiştir. Toplamda 137 hasta serumu kullanılmıştır. Akut HAV hastaları anti-HAV IgM değerlerine bağlı olarak belirlenen akut HAV hastalarından dizi analizi için kullanılan hastaların genel bilgileri Tablo 3.1'de özetlenmiştir. Dört farklı bölgelerden gelen hastaların IgM değerleri Architect i2000 SR (Abbott, Almanya), Centaur XP Immunoassay System (Siemens, USA) cihazlarından elde edilmiştir.

Tablo 3.1 Sekanslama için kullanılan HAV hastalarının genel özellikleri ve IgM bilgileri

Yaş	n	n _{erkek}	n _{bayan}	IgM (Mean±SD)
0-5	40	23	17	7.8±2.5
6-10	18	8	10	8.7±2.7
11-20	11	5	6	10.4±4.4
>20	7	3	4	8.2±3.7

3.1.2 Primerler

Stene ve grubunun yaptığı çalışmadan alınan primer dizileri tablo 3.1'de verilmiştir (1998).

Tablo 3.2 Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan primerler ve dizileri

Primerler	Dizileri
HAV-1F	5' TGT CTG GAG CAC TGG ATG G 3'
HAV-1R	5' CAT TTC AAG AGT CCA CAC ACT TCT 3'
HAV-2F	5' TGG TTT CTA TTC AGA TTG CAA ATT A 3'
HAV-2R	5' TTC ATA TTT CAT GCT CCT CAG T 3'

3.1.3 Kimyasallar

Tablo 3.3 Deneylerde kullanılan Kimyasallar ve Üretildikleri Firmalar

Kimyasal Adı	Üretici Firma
Agaroz	Vivantis, Malezya
Formamid	Sigma, Amerika
Sodyum Asetat	Sigma, Amerika
Etanol	Kimetsan, Türkiye
Silika	Sigma, Amerika
dNTP	Fermentas, Avrupa
Etidyum Bromür	Sigma, Amerika
MgCl ₂	Fermentas, Avrupa
Jelatin	Sigma, Amerika
Tris baz	Sigma, Amerika
Asetik asit	Riedel-de Haen, Almanya
EDTA	Quantum Biotechnologies, Avrupa

3.1.4 Enzimler

Tablo 3.4 Enzimler

Enzim	Üretici Firma
Taq DNA polimeraz	Fermentas, Avrupa
AMV	Roche, Almanya

3.1.5 Tampon çözeltiler

Tablo 3.5 Kullanılan Tamponlar

Tampon Adı	Üretici Firma
Taq poly buffer (10x)	Fermentas, Avrupa
Reverse Transkriptaz AMV buffer (5x)	Roche, Almanya

3.1.6 Kullanılan Kitler

- High Pure Viral RNA İzolasyon Kiti (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany)
- BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Amerika)

3.1.7 Cihazlar

Tablo 3.6 Kullanılan Cihazlar

Cihaz	Üretici Firma
Thermal Cycler PCR cihazı	Applied Biosystems, Amerika
Agaroz jel elektroforezi	Obitek, Türkiye
UV Görüntüleme Cihazı	Obitek, Türkiye
Soğutmalı Santrifüj	Hettich, Almanya
Nanodrop	ACTGene, Amerika
Çeker ocak	clanLAF
Hassas Terazı	Sartorius, Almanya
Vortex	Nüve, Türkiye

Tablo 3.6 (devam)

Kuru Blok	Techne, İngiltere
pH metre	Mettler Toledo, İsviçre
ABI PRISM 310 Genetic Analyzer	Perkin Elmer, Amerika
Mikrodalga Fırın	Arçelik, Türkiye

3.2 Metodlar

3.2.1 HAV RNA izolasyonu

Hasta serumlarından alınan örneklerden HAV RNA'ları High Pure Viral RNA izolasyon kiti ile üreticinin verdiği protokole dayalı olarak izole edildi.

- 200 µL hasta serumu 400 µL “binding buffer” ve 4 µL poly A 1500 µL'lik ependorf tüpü içerisine konup vorteks yardımı ile iyice karıştırıldı.
- Karışım filtreli tüplere aktarılıp 10500 rpm'de 1 d santrifüj edildi.
- Toplama tüpü içindeki sıvı ile birlikte atıldı. Filtreli tüp yeni toplama tüpüne alındı.
- Filtreli tüp üzerine 500 µL “inhibitor removal buffer” eklenerek 10500 rpm'de 1 d boyunca santrifüj edildi.
- Toplama tüpü atıldı, filtreli tüp yeni bir toplama tüpüne alınır ve üzerine 450 µL “wash buffer” eklenip 1 d boyunca 10500 rpm'de santrifüj edildi. Toplama tüpü atıldı. Bu işlem bir kere daha tekrar edildi.
- Ardından filtreli tüpler boş bir ependorf tüpüne alınarak bir dakika boyunca maksimum hızda (15000 rpm) santrifüj edilip, yeni bir 1500 µL'lik ependorf tüpüne aktarılır.
- Filtreli tüp üzerine 50 µL “elution buffer” eklenerek 10500 rpm'de 1 d boyunca santrifüj edildi.
- Ependorfta kalan saf RNA elde edildi. Elde edilen RNA'lar kısa süreli olarak +4 °C'de, uzun süreli olarak -20 °C'de saklandı.

3.2.2 cDNA eldesi

İzole edilen HAV RNA'lardan cDNA elde etmek için toplam 20 µL hacimde gerçekleştirilen PCR içeriği 3.6'da verilmiştir.

Tablo 3.7 cDNA için kullanılan PCR malzemeleri ve miktarları

PCR malzemesi	Kullanım miktarı
HAV-1R (10 pmol)	2.5 µL
AMV enzim (22 U/µL)	0.2 µL
AMV buffer (5X)	4 µL
Su	4.3 µL
dNTP (2 mM)	4 µL
RNA	5 µL

Reaksiyon Koşulları

94 °C.....3 d
42 °C.....30 sn
42 °C.....30 sn } 45x
42 °C.....30 sn
42 °C.....7 d
4 °C.....∞

3.2.3 Nested-PCR

Elde edilen cDNA kalıp olarak kullanılarak 1. tur PCR 50 µL'lik toplan hacimde gerçekleştirildi. 2. tur PCR'da 1. tur PCR ürünü kalıp olarak kullanılarak gerçekleştirildi. Her iki tur PCR içinde aynı reaksiyon koşulu kullanıldı.

Tablo 3.8 1. Tur ve 2. Tur PCR için kullanılan malzemeleri ve miktarları

PCR malzemesi	Kullanım miktarı	
	1 Tur	2. Tur
“Reverse” primer (10 pmol)	2 µL (1R)	2 µL (2R)
“Forward primer” (10 pmol)	2 µL (1F)	2 µL (2F)
dNTP (2 mM))	5 µL	5 µL
MgCl ₂ (2.5 mM)	5 µL	4 µL
Taq poly buffer (10x)	5 µL	5 µL
Jelatin	5 µL	5 µL
Su	20.6 µL	23.6 µL
Taq poly (5U/µL)	0.4 µL	0.4 µL
Kalıp	5 µL (cDNA)	3 µL (1. tur PCR ürünü)

Reaksiyon Koşulları

94 °C.....5 d

94 °C.....30 sn
55 °C.....30 sn
72 °C.....30 sn

} 30x

72 °C.....7 d

4 °C.....∞

3.2.4 Agaroz jel elektroforezi

1X'lik TAE buffer kullanılarak hazırlanan %1'lik agaroz jel elektroforezi hazırlandı. Örnekler kuyuya yaklaşık 5.5 -6 µL olacak şekilde yükleme tamponu ile karıştırılarak yüklendi. Bant boylarını belirlenebilmesi için 50 bç'lik DNA belirteçide kuyuya yüklenerek yaklaşık 100 mV'da belirteç bantları iyice ayrışana kadar yürütüldü ardından UV ışığı altında bakılarak jel görüntüsü elde edildi.

3.2.5 PCR ürünü temizleme

Nested-PCR sonunda agaroz jelde görüntülenen ve beklenen bant boyutlarını veren örneklerin sekanslarının yapılabilmesi için, öncelikle içerisinde bulunan primerlerden dNTP'den ve benzeri PCR sonunda içeride kalabilecek olan kirliliklerden kurtulmak için PCR temizleme işlemi gerçekleştirildi.

- PCR ürünü üzerine 50 µL silika eklenip 4500 rpm'de 1 d santrifüj edildi.
- Oluşan supernatant atıldı. Pellet üzerine 50 µL %70'lik EtOH eklenerek 4500 rpm'de 1 d boyunca santrifüj edildi.
- Supernatant atıldı, pellet üzerine 50 µL dH₂O eklenerek iyice vorteks yapıldı.
- Ardından 30 d boyunca 37 °C'de bekletilen örneklerin iyice alkolden arınması sağlandı. İşlemin ardından 4500 rpm'de 1 d boyunca santrifüj edildi.
- Örnekler daha sonra kullanılmak üzere +4 °C'de saklandı.

3.2.6 Nanodropta ölçüm

Sekans PCR'nın konabilmesi için örneklerin uygun yoğunlukta olup olmadığının anlaşılması için nanodropta DNA yoğunluğu tayin edildi. DNA yoğunluklarına bağlı olarak uygun miktarda primer kullanılarak sekans PCR'ı yapıldı.

3.2.7 Sekans PCR

Öncelikle temizlenen örneğin supernatant kısmından 0.5 µL DNA ve 1 µL primer (3.2 pmol) PCR tüpünde hazırlanıp 10 sn kadar santrifüj edilip 85 °C'de 15 d bekletilerek sıvı kısmın uçurulması sağlandı. DNA ve primerin tüpe yapışması sağlandı.

Yapışmış DNA üzerine 7.75 µL dH₂O, 1.75 µL sekans buffer ve 0.5 µL BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit eklenerek santrifüj edildi. Ardından PCR gerçekleştirildi.

Sekans PCR koşulları:

94 °C.....10 sn	}	25x
50 °C.....5 sn		
60 °C.....4 sn		

3.2.8 Sekans PCR temizleme

Öncelikle pH'ı 4.6 olacak şekilde sodyum asetat (NaOAc) hazırlandı.

- Sekans PCR ürünlerinin bulunduğu tüpler kapakları açık bırakılarak 10 d boyunca 85 °C'de bekletildi. Sıvının tamamen uçup DNA'nın tüpe yapışması sağlandı.
- Tüp üzerine 27 µL %95'lik EtOH, 13 µL dH₂O ve 10 µL NaOAc eklenerek hızlı santrifüj edildi.
- Örnekler 10 dk boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından 10 d boyunca 4500 rpm'de santrifüj edildi.
- Tüpteki sıvı pipet yardımı ile atılıp üzerine 50 µL %70'lik EtOH eklenerek 10 d 4500 rpm'de santrifüj edildi. Tüpteki sıvı pipet yardımı ile çekilip atıldı.
- Her tüp üzerine 10 µL formamid eklenerek DNA'nın çift zincirli yapısının açık kalması sağlanarak dizi analizinin yapılması sağlandı.
- Formamid eklendikten sonra iyice vortekslenmesi sağlanarak örnekler -20 °C'de saklanır.

3.2.9 Örneklerin Cihaza yüklenmesi

Temizlenen sekans PCR ürünleri "ABI Prism 310 Genetic Analyser" dizi analiz cihazına yüklendi.

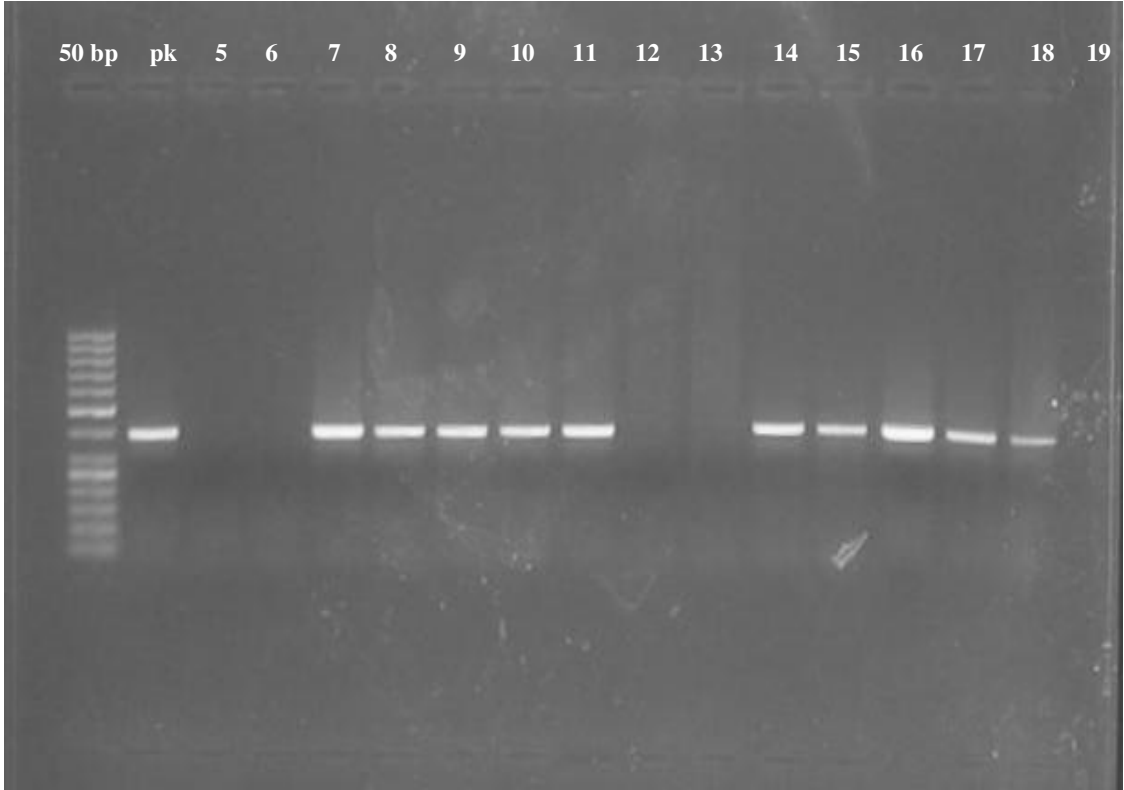
3.2.10 Filogenetik ağaç oluşturulması ve genotiplerin belirlenmesi

Sekans sonucunda elde edilen DNA dizi analizleri ve GenBank'dan elde edilen referans dizileri, MEGA 4.1 programı kullanılarak hizalandı. Filogenetik ağaç oluşturularak genotip analizleri yapıldı.

4 Araştırma Bulguları

4.1 Örneklerin Jel Görüntüleri

Hepatit A enfeksiyonu taşıdığı daha önce imminolojik testlerle belirlenmiş olan 137 hastadan izole edilen HAV RNA'ları ters transkriptaz yöntemi ile önce cDNA'ya dönüştürüldü. cDNA'nın kalıp olarak kullanıldığı 1. ve 2. tur PCR'larla çoğaltılmak istenen VP1-2A bölgesinin varlığı agaroz jel elektroforezi ile tespit edildi. %1'lik agaroz jel elektroforezinde 50 bç'lik marker kullanılarak elde edilen jel görüntüsünden VP1-2A pozitif olan hasta RNA'ları tespit edilmiştir. Buna göre 137 hastadan 76 tanesinin VP1-2A bölgesi çoğaltıldı.

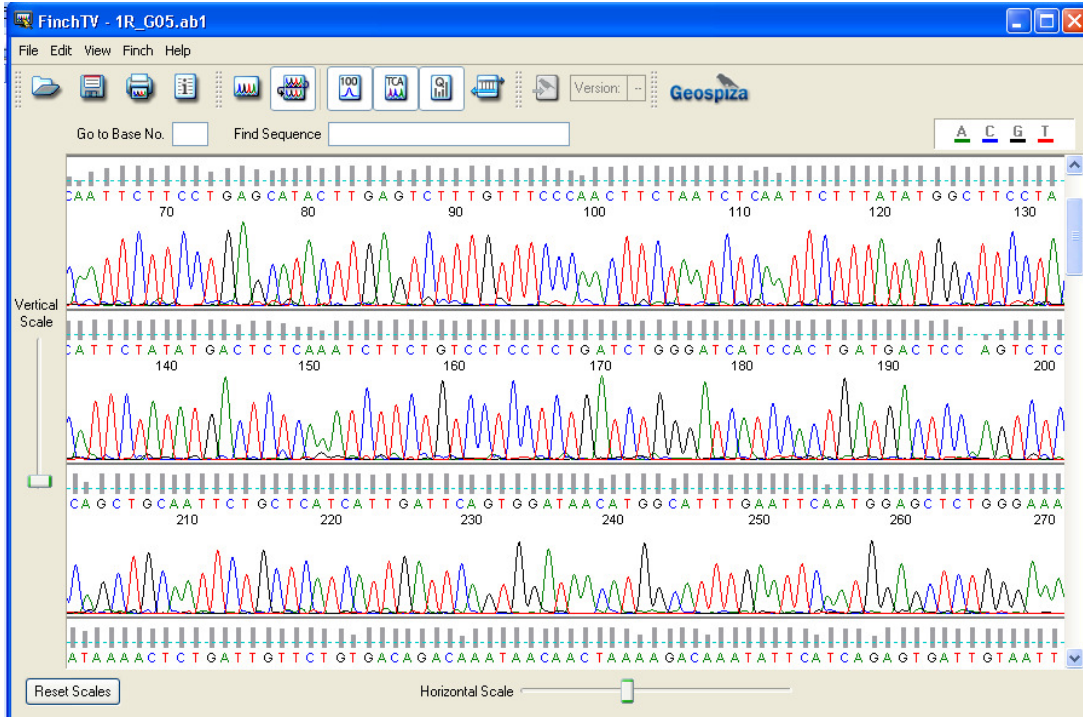


Şekil 4.1 2. tur PCR sonucunda elde edilen örneklerin %1'lik agaroz jelde yürütülmesinin ardından elde edilen jel görüntüsü

4.2 Sekans PCR Ürünlerinin Dizi Analiz Sonuçları

Jelde görüntüledikten sonra pozitif olan örnekler PCR temizleme işleminden geçtikten sonra nanodropla içeriğindeki DNA miktarı belirlenerek sekans PCR'ı yapılan örnekler sekans temizlemesinin ardından cihaza yüklenerek DNA dizi analizi belirlenmiştir.

Elde edilen dizi analizleri FinchTV programında görüntülenerek kontrol edilmiştir.



Şekil 4.2 VP1-2A bölgesine ait örneklerden elde edilen DNA dizilimlerinin FinchTV programındaki görüntüsü

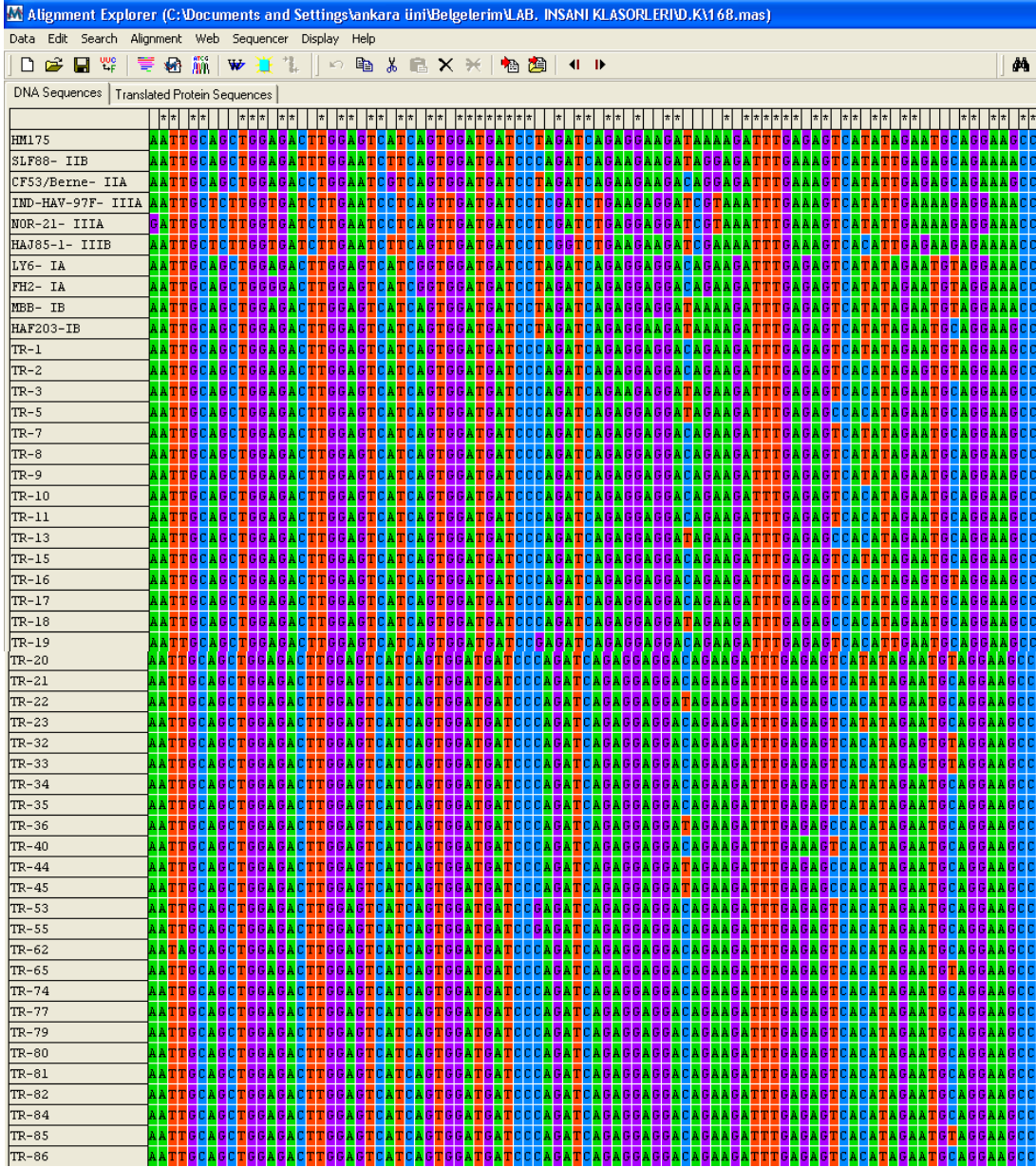
4.3 HAV Genotiplerinin MEGA 4.1 Programına Bağlı Olarak Filogenetik Analizinin Yapılması

ABI-310 Genetic Analyzer cihazından elde edilen ve FinchTV programı tarafından görüntülenip DNA dizileri alınan HAV VP2-2A pozitif örneklerin DNA dizilimleri referans sekanslar (Tablo 4.1) kullanılarak genotip belirlenmesi yapıldı.

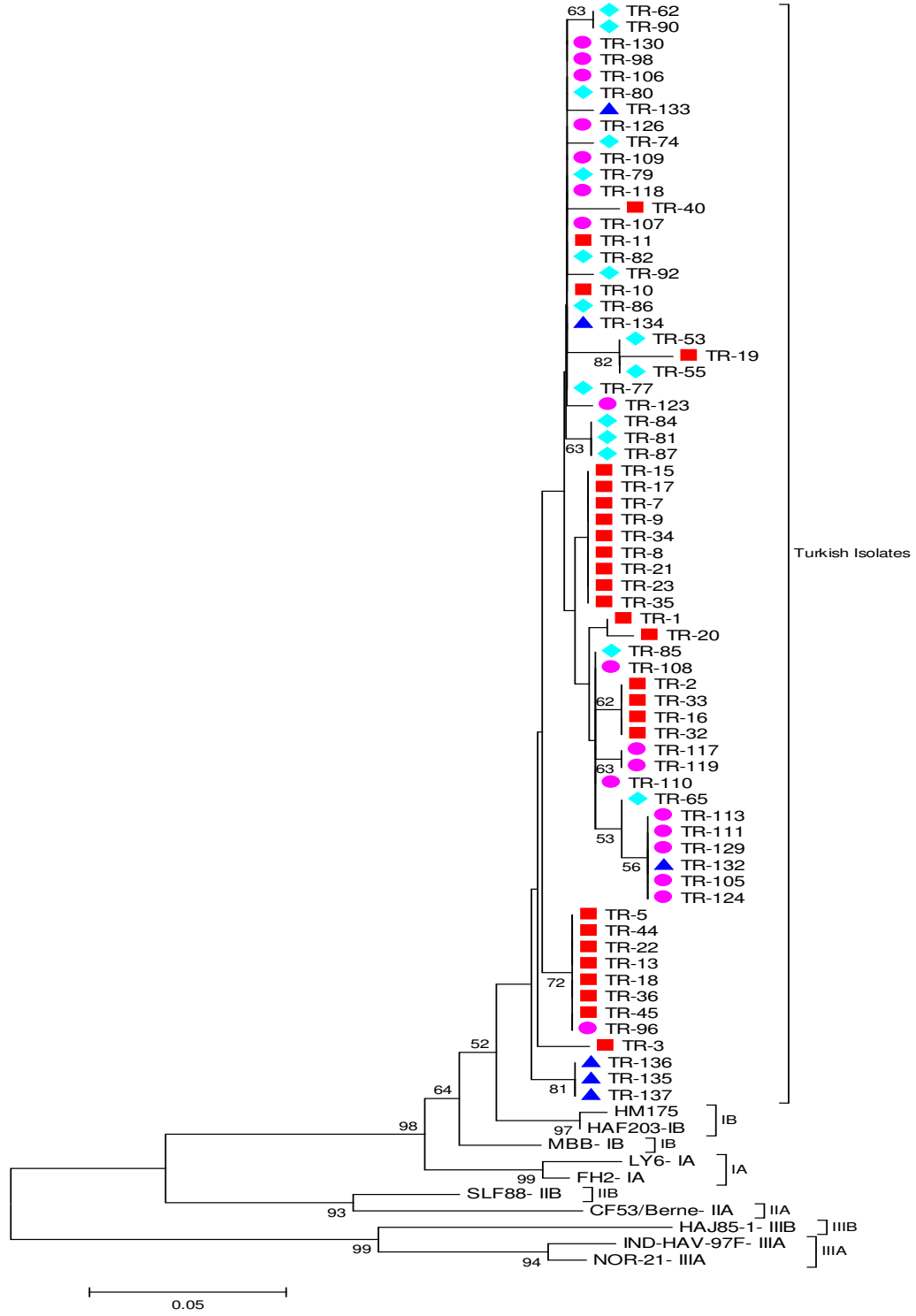
Tablo 4.1 Filogenetik analizlerde kullanılmak üzere GenBanktan alınan referans izolatları

Referans İzolatının Adı	GenBank Referans kodu	Genotipi
HM175	M59810	IB
LY6	AF485328	IA
FH2	AB020568	IA
MBB	M20273	IB
HAF-203	AF268396	IB
CF53-Berne	AY644676	IIA
SLF88	AY644670	IIB
IND-HAV-97F	FJ360735	IIIA
NOR21	AJ299464	IIIA
HAI85-1	AB279735	IIIB

Referans sekansları ile birlikte VP1-2A pozitif örneklerin DNA dizilimleri MEGA4.1 programı kullanılarak hizalandı.



Şekil 4.3 40 hastanın ve 10 referans sekansın VP1-2A bölgelerinin MEGA 4.1 programı ile hizalanması



Şekil 4.4 76 hasta ile 10 referans sekansı kullanılarak Neighbour-Joining metodu ile VP1-2A bölgelerinin filogenetik analiz ile ağaç çizilmesi (■ Şanlıurfa'dan gelen hastalar ◆ Van'dan gelen hastalar ● Kayseri'den gelen hastalar ▲ İzmir'den gelen hastalar)

Oluşturulan filogenetik ağaca göre Türk izolatları genotip IB olarak gruplandı. Hastalar geldikleri il ve dolayısı ile bölgeye bağlı olarak farklı farklı işaretlendi. Buna bağlı olarak aynı bölgeden gelen hastalar kendi aralarında incelendiğinde, Şanlıurfa grubu kendi arasında 3 ana gruba ayrıldı, her 3 grup içerisindeki Türk izolatları birkaç örnek hariç birbirleri ile %100 sekans benzerliği gösterdi. Kayseri ve Van'dan gelen izolatlar kendi grupları içerisinde incelendiğinde ikişer gruba ayrıldı. İzmir'den gelen hastalar ise farklı farklı gruplara dahil olarak en uzak ilişkileri gösterdi. Bu bilgiler mevcut ağaçtan da gözlenebilirken, ayrı ayrı ağaç çizildiğinde daha belirgin olarak görüldü.

Türk izolatları ile HAV referans sekansları karşılaştırıldıklarında en yakın benzerlik 1 nolu Türk izolat ile genotip IB'ye ait referans sekans HAF203 arasında % 95.9 oranında oldu. Referans sekans olan HM175 ile Türk izolatları arasındaki benzerlikler ise % 92.9 ile % 95.9 arasında görüldü. İzolatlar ve referanslar arasındaki en uzak benzerlik genotip IIIB'ye ait olan HAJ85-1 referansı ile 7, 8, 9, 15, 17, 21, 23, 24, 34, 35, 74, 133 nolu Türk izolatları arasında %67.0 olarak görüldü.

Türk izolatları kendi aralarında karşılaştırıldıklarında en yakın benzerlik 19, 105, 111, 113, 124, 129, 132, 136, 137 izolatları arasında %100 olarak görüldü.

Referans HAV sekansları ile Türk HAV izolatları MEGA programı, "Mean Percentage Intergenotypic Nucleotid Distance", "Kimura two parameter" ile gruplandırılıp karşılaştırıldı. Genotip I ile III arasında yapılan tüm karşılaştırmalar Tablo 4.2'de özetlenmiştir. En yakın benzerlik, Türk HAV izolatları ile genotip IB'ye ait olan referans sekanslar arasında % 5.1 oranında farklılık, dolayısı ile % 94.9 benzerlik olarak tespit edilmiştir.

Tablo 4.2 VP1-2A bölgesine bağı olarak Türk izolatları (TR) ile GenBank veritabanından elde edilen referans sekanslar HM175 ve insan HAV genotiplerinin (HAV I-III) “Mean Nucleotide Distance” ile analizleri sonucunda elde edilen veriler

	IIIA	IIIB	IIA	IIB	IA	IB
IIIB	13.1					
IIA	33.1	28.9				
IIB	26.7	26.8	8.5			
IA	28.6	31.2	21.8	19.9		
IB	29.2	30.8	22.1	18.7	9.2	
TR	29.8	31.7	21.4	18.3	8.6	5.1

MEGA 4.1 programı kullanılarak aynı zamanda Türk izolatları ile referans sekans HM175 aminoasit dizilimleri de karşılaştırılarak nükleotid farklılıklarından meydana gelen aminoasit farklılıkları da karşılaştırıldı. Buna bağı olarak elde edilen verilere bakıldığında 4 ana aminoasit değişikliği dışında anlamlı bir aminoasit farklılığı gözlemlenmedi. 16 izolattın 7’sinde 768. aminoasitte serinden asparajine bir değişim gözlemlendi. Bir diğer 7 izolatta sisteinden lösine bir değişiklik 819 numaralı kodonda gözlemlendi. Sadece tek bir izolatta 812 numaralı aminoasitte lösine izolösine değişmiş, 133 numaralı izolatta 786. kodonda glutamik asitten glisine bir dönüşüm gözlemlendi. Aminoasit değişimleri Tablo 4.3’de özetlendi.

Tablo 4.3 Türk izolatları ile HM175 referans sekansının (genotip IB) karşılaştırılması sonucu elde edilen aminoasit değişimleri

İzolat No	Amino Asit Pozisyonu			
	S768	E786	L812	L819
TR-65, 105, 111, 113, 124, 129, 132	N			
TR-17, 32, 33, 34, 35, 36, 37				C
TR-40			I	
TR-133		G		

5 Tartışma ve Sonuç

Hepatit A virüsünün moleküler yapısı, diğer RNA virüsleri ile karşılaştırıldığında çok daha stabil bir yapıya sahiptir. Hastalığın en yaygın bulaş nedeninin fekal ve oral yollarla olması, virüsün dış ortamda stabil bir yapıya sahip olmasından kaynaklı olarak, hastalık dünyanın birçok yerinde çok yaygın gözlemlenmektedir (Dounias ve Rachiotis 2006).

Hepatit A virüs epidemiyolojisi, bulaş yolları biliniyor ve etkili bir aşı geliştirilmiş olmasına rağmen endemik bölgelerde değişkenlik göstermektedir. Yaşam standartlarının gelişmiş olmasına, yüksek endemik bölgelerin sayısının giderek azalmasına rağmen düşük ve orta derecede endemik olan bölgelerde bireylerin çoğu virüs ile karşılaşmadığı ve bağışıklığa sahip olmadığı için olası virüs salgını ihtimalini arttırmaktadır. Böyle bir durumda salgınla başa çıkabilmek, bağışıklık kazanmamış olan yetişkin bireylerde hastalığın seyri daha ciddi olacağından güç olmaktadır.

Hepatit A virüsü ile enfeksiyon yaşam boyu bağışık sağlamaktadır. Yüksek endemik bölgelerde yetişkinlerin virüs ile karşılaşması ciddi sonuçlara sebebiyet vermez çünkü birey yüksek olasılıkla çocukluğunda bu virüsle karşılaştığı için hastalığa karşı zaten bağışıklık kazanmış olacaktır. Düşük endemik bölgelerde ise bireyler seyahatleri esnasında bu virüsle karşılaşır, önceden bir bağışıklığa sahip olmadığı için hastalığın seyri daha ciddi bir sonuca doğru gidebilir. Bu durumda epidemiyolojik çalışmalar virüse maruz kalınan yaşın ve hastalığın seyrinin ciddiyetinin öngörülebilmesi için önem taşımaktadır (Pinto vd 2007).

Epidemiyolojik çalışmalar için kullanılan genotiplendirme bölgelerinden en yaygın kullanılan bölge VP1-2A bölgesidir. Bu bölge çok fazla genetik değişikliğe sahip olmayan HAV'ın en varyasyon gösteren bölgesidir. Türkiye'de ki yaygın genotipin bulunmasının amaçlandığı bu çalışmada da bu bölge kullanılarak genotiplendirme çalışması yapıldı. Yapılan filogenetik analizlere bağlı olarak Türkiye'de ki en yaygın genotip 76 hastanın verilerine bakıldığında %100 olarak genotip IB oldu (Şekil 4.4).

Dünyadaki HAV epidemiyolojisine bakıldığında genotipler bölgelere göre değişiklik göstermektedir. Genel olarak ise genotip I ve alt-genotip IA en yaygın genotipler olarak görülmektedirler (Cristina ve Costa-Mattioli 2007). Birkaç genotipin aynı anda, örneğin genotip IA ile genotip IB'nin aynı anda gözlemlendiği durumlarda mevcuttur (Villar vd 2006). Akdeniz bölgelerinde genotip I yaygın olarak görülürken, İtalya, Fransa, Tunus ve Yunanistan'da genotip IA daha yaygın, İspanya, Ürdün ve Mısır'da ise genotip IB daha

yaygın görülmektedir (Gharbi-Khelifi vd 2006, Cristina ve Costa-Mattioli 2007). Mevcut çalışmada elde edilen sonuçlar, Almanya'da yapılan Türkiye'de ki yaygın genotipin IB olarak bulunduğu bir çalışmayı destekler nitelikte sonuç vermiştir (Normann vd 2008)

Hepatit virüslerinin diğerleri ile karşılaştırıldığında Hepatit A virüs genotipleri dünyanın çeşitli bölgelerinde çok az çeşitlilik göstermektedir. Bu durum HAV RNA'sının çok düşük mutasyon oranına sahip olarak genetik çeşitliliğinin az olmasına bağlanabilir. Türkiye göz önüne alındığında kıtalar arasında yer almasına, önemli bir geçiş bölgesi olmasına rağmen sadece tek bir HAV(%100) genotipine sahip olması aynı zamanda hepatit B virüsünün (genotip D, %100), hepatit C virüsünün (genotip IB, %91), hepatit D virüsünde (genotip I, %100) baskın tek bir genotip sergilemesi, daha çok hepatit virüslerinin genotip çeşitliliğine sahip olan ada ülkelerinin varlığına bakıldığında çok ilginç bir nokta olmaktadır (Bozdayı vd 2004).

Hepatit A virüs patojenitesine bakıldığında ise virüs genotipi ile patojenitesi arasında hepatit C virüsünde olduğu gibi bir ilişki (genotip IB çok yüksek patojeniteye sahip ve antiviral tedavilere karşı dirençli) henüz ortaya çıkarılmamıştır. Buna rağmen enfeksiyöz bir hastalığın epidemiyolojinin kısa bir sürede değişebilmesi bu tür epidemiyolojik çalışmaların güncelleştirilmesi büyük salgınların ortaya çıkması durumunda önem kazanacak ve yapılan tedavilerin boyutu ve içeriği için önemli bir bilgi kaynağı olacaktır.

Salgın durumlarında ortaya çıkan izolatların genellikle salgını meydana getiren kaynak izolatla aynı genoma sahip olmasının nedeni HAV RNA'sında biriken genetik çeşitliliğin çok düşük olması ile açıklanabilir (Nainan vd 2006). Mevcut çalışmada birçok izolata sekans dizilimi %100 benzerlik gösterdi. Buda bu izolatların aynı kaynaktan enfekte olduklarına bir işaret olarak kabul edilebilir. Farklı bölgelerden gelen gruplar kendi içlerinde incelendiklerinde, nükleotid dizilimleri tamamen aynı olan birçok izolat ile karşılaştı. Örneğin Şanlıurfa'dan gelen izolatlar kendi içlerinde 3 ana gruba ayrılırken, gruplarda ki birçok izolat %100 benzerlik gösterdi. Böyle bir durumda Şanlıurfa'da ki bu gruplar içerisinde %100 benzerlik gösteren hastaların aynı kaynaktan enfekte olduğu öngörülebilir. Bu benzerlikler İzmir, Kayseri, Van izolatlarının kendi aralarında da gözlemlendi. Bazı istisna izolatların eşsiz nükleotid dizilimlerine sahip olması göz ardı edildiğinde, bu benzerlikler ayrı ayrı küçük lokal salgınlar olarak nitelendirilebilir. Bunun yanı sıra farklı şehirlerden birçok izolatta birbirleri ile %100 sekans benzerliği gösterdi. Bu durumda kısa HAV bölgelerinin nükleotid dizilimi enfeksiyonun kaynağını belirlemede

çok net bilgi veremeyebilir. Daha kesin bir bilgi için daha büyük nükleotid dizilimleri veya tüm-genom nükleotid dizilimlerinin karşılaştırılması daha doğru olacaktır. Yapılan sekans analizleri hepatit A salgınlarının saptanması, epidemikle küçük salgınlar arasında ki farkın anlaşılabilmesi açısından çok önemli ve kullanılan veri yöntemi olmaktadır. Erken aşamada böyle bir salgının tespit edilebilmesi büyük salgınların önlenmesi için önleyici bir belirteç olabilir.

Türk izolatlarının aminoasit dizilimleri ile referans sekans HM175 aminoasit dizilimlerinin karşılaştırılması sonucunda, Türk izolatları 4 belirgin aminoasit değişikliği dışında (16 izolatta; 7'sinde S768N, 1'inde E756G, birinde L812I, 7'sinde L819C olmak üzere) tamamen benzer dizilimleri gösterdi.

Türkiye gelişmekte olan bir ülke olarak HAV yaygınlığı açısından orta endemik bir bölge olarak kabul edilmektedir. Mevcut çalışma verilerine bakıldığında HAV enfeksiyonu yetişkin olmayan bireylerde (<20 yaş, % 90.8) çok daha yaygın olarak gözlemlendi. Tüm HAV genotipleri için etkin olan tek bir aşının varlığı ve iki doz alındığında ömür boyu bağışıklık sağlayan HAV aşısının yeni doğan bebeklerde rutin olarak yaptırılmasının mali açıdan da verimli bir önlem olup olmayacağı göz önünde bulundurularak bir düzenlemeye gidilmelidir.

Sonuç olarak genotip IB Türkiye'deki en yaygın HAV genotipi olarak bulundu. HAV sekansındaki düşük çeşitliliğe rağmen, sekans analizi metodolojisinin uygulanması HAV genotip çeşitliliğinin çok düşük olduğu Türkiye gibi ülkelerde dahi kullanılması HAV salgınlarının tanımlanması, gerektiğinde önleyici sağlık uygulamalarının sağlanması açısından önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

- Bishop NE, Anderson DA. 2000. Uncoating kinetics of hepatitis A virus virions and provirions. *Journal of Virology* Vol.74 No.7: 3423-3426
- Bishop NE. 2000. Hepatitis A Virus Replication: An Intermediate in the Uncoating Process. *Intervirology* 43:36-47
- Bozdayi AM, Aslan N, Bozdayi G, Türkyılmaz AR, Sengezer T, Wend U, Erkan O, Bozkaya H, Gerlich W, . Yurdaydin C, Uzunalimoglu O. Molecular epidemiology of Hepatitis B, C and D virus in Turkey. *Arch Virol* 2004: 149:2115-2129.
- Costa-Mattioli M, Di Napoli A, Ferre V, Billaudel S, Perez-Bercoff R, Cristina J. 2003. Genetic Variability of hepatitis A virus. *Journal of General Virology* 84:3191-3201
- Cristina J, Costa-Mattioli M. 2007. Genetic variability and molecular evolution of hepatitis A virus. *Virus Research* 127:151-157
- de Paula VS, Perse AS, Amado LA, de Morais LM, de Lima SMB, Tourinho RS, Gaspar AMC, Pinto MA. 2009. Kinetics of hepatitis A virus replication in vivo and in vitro using negatif strand quantitative PCR
- Dounias G, Rachiotis G. 2006. Prevalence of hepatitis A virus infection among municipal solid-waste workers. *Int J Clin Pract* 60:1432-1436.
- Faber MS, Stark K, Behnke SC, Schreier E, Frank C. 2009. Epidemiology of hepatitis A virus infections, Germany 2007-2008. *Emerging Infectious Diseases* vol.15 no.11: 1760-1768
- FitzSimons D, Hendrickx G, Vorsters A, Van Damme P. 2010. Hepatitis A and E: Update on prevention and epidemiology. *Vaccine* 28:583-588
- Franco E, Giambi C, Ialacci R, Coppola RC, Zanetti AR. 2003. Risk groups for hepatitis A virus infection. *Vaccine* 21:2224-2233
- Garcia-Aguirre L, Cristina J. 2008. Analysis of the full-length genome of hepatitis A virus isolated in South America: heterogeneity and evolutionary constrains. *Archives of Virology* 153:1473-1478
- Gauss-Müller V, Kusov Y, Thiele-Bössel K. 2007. Hepatitis A Virus (HAV): Molecules and Mechanisms in the Viral Life Cycle. Erişim: <http://www.vuz.uni-luebeck.de/gaussmueller.htm> Erişim tarihi: 02.09.2011
- Hu Y, Arsov I. 2009. Nested Real-Time PCR for hepatitis a detection. *The society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology* 49:615-619
- Jacobsen KH, Wiersma ST. 2010. Hepatitis A virus seroprevalence by age and world region, 1990 and 2005. *Vaccine* 28: 6653-6657
- Keystone JS, Hershey JH. 2008. The underestimated risk of hepatitis A and hepatitis B: benefits of an accelerated vaccination schedule. *International journal of Infectious Diseases* 12: 3-11

- Konduru K, Nakamura SM, Kaplan GG. 2009. Hepatitis A Virus (HAV) Packaging size limit. *Virology Journal* 6:204
- Kulkarni MA, Walimbe AM, Cherian S, Arankalle VA. 2009. Full Length genomes of genotype IIIA Hepatitis A Virus strains (1995-2008) from India and estimates of the evolutionary rates and ages. *Infection, Genetics and Avolution* 9:1287-1294
- Lee KO, Jeong SJ, Seong HS, Kim KT, Hwang YS, Kim GY, Lee SH. 2009. Genetic analysis of Hepatitis A virus isolated from Korea. *Journal of Bacteriology and Virology* vol.39 no:3 165-171
- Liu GD, Hu NZ, Hu YZ. 2003. Full-length genome of wild type hepatitis A virus (DL3) isolated in China. *World Journal Of gastroenterology* 9(3):499-504
- Lu L, Ching KZ, de Paula VS, Nakano T, Siegl G, Weitz M, Robertson BH. 2004. Characterization of the complete genomic sequence of genotype II hepatitis A virus (CF53/berne isolate). *Journal of general virology* 85:2943-2952
- Martin A, Lemon SM. 2006. Hepatitis A Virus: From Discovery to Vaccines. *Hepatology* 43:164-172
- Nainan OV, Xia G, Vaughan G, Margolis HS. 2006. Diagnosis of Hepatitis A Virus Infection: a Molecular Approach. *Clinical Microbiology Reviews* Vol.19, No.1: 63-79
- Ngui SL, Granerod J, Jewes LA, Crowcroft NS, Teo CG. 2008. Outbreaks of Hepatitis A in England and Wales Associated With Two Co-Circulating Hepatitis A Virus Strains. *J Med Virol* 80:1181-1188
- Norder H, De Palma AM, Selisko B, Costenaro L, Papageorgiou N, Arnan C, Coutard B, lantez V, De Lamballerie X, Baronti C, Sola M, Tan J, Neyts J, Canard B, Coll M, Gorbalenya AE, Hilgenfeld R. 2011. Picornavirus non-structural proteins as targets for new anti-virals with broad activity. *Antiviral Research* 89: 204-218
- Normann A, Badur S, Önel D, Kılıç A, Sidal M, Larouze B, Massari V, Müller J, Flehmig B. 2008. Acute Hepatitis A Virus Infection in Turkey. *Journal of Medical Virology* 80: 785-790
- Oltmann A, Kamper S, Staeck O, Schmidt-Chanasit J, Günther S, Berg T, Frank C, Krüger DH, Hofmann J. 2008. Fatal outcome of Hepatitis A virus (HAV) infection in a traveler with incomplete HAV vaccination and evidence of rift valley fever virus infection. *Journal of clinical Microbiology*. Vol. 46 No.11: 3850-3852
- Pinto RM, Alegre D, Dominguez A, El-Senousy WM, Sanchez G, Villena C, Costafreda MI, Aragonés L, Bosch A. 2007. Hepatitis A virus in urban sewage from two Mediterranean countries. *Epidemiol Infect.* 135:270-273
- Purcell RH, Emerson SU. 2001. Animal Models of Hepatitis A and Hepatitis E. *ILAR Journal* 42/2:161-177
- Robertson BH, Jansen RW, Khanna B, Totsuka A, Nainan OV, Siegl G, Widell A, Margolis HS, Isomura S, Ito K, Ishizu T, Moritsugu Y, Lemon SM.1992. Genetic

relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions

- Sanchez G, Aragonés L, Costafreda MI, Ribes E, Bosch A, Pinto RM. 2004. Capsid region involved in hepatitis A virus binding to Glycophorin A of the Erythrocyte membrane. *Journal of Virology* vol.78 no.18:9807-9813
- Sanchez G, Bishop A, Gomez-Mariano G, Domingo E, Pinto RM. 2003. Evidence for quasispecies distributions in the human hepatitis A virus genome. *Virology* 315:34-42
- Stene-Johansen K, Skaug K, Blystad H, Grinde B and The Hepatitis A Study Group. 1998. A Unique Hepatitis A Virus Strain Caused an Epidemic in Norway Associated with Intravenous Drug Abuse. *Scand J of Infect Dis* 30:35-38
- Villar LM, Morais LM, Aloise R, Melo MM, Calado IA, Lampe E, Gaspar AM. 2006. Co-circulation of genotypes IA and IB of hepatitis A virus in Northeast Brazil. *Braz J Med Biol Res.* 39:873-881.
- Zhang Y., Kaplan, GG. 1998. Characterization of replication-competent hepatitis A virus constructs containing insertions at the N terminus of the polyprotein. *Journal of virology* vol.72 No.1: 349-357

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Duygu KOYUNCU

Doğum Tarihi : 01 / 08 / 1985

Doğum Yeri : Çayeli

Uyruğu : T.C

Medeni Hali : Bekar

Eğitim Durumu :

Lise : Özel Eyüboğlu Fen Lisesi

Lisans : İstanbul Teknik Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

Lisansüstü : Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Temel Biyoteknoloji Programı

Yabancı Dil :

İngilizce : Okuma: Çok iyi Yazma: Çok iyi Konuşma: İyi

Yayınları :

- “Molecular Characterization of Hepatitis A Virus Isolated From Acute Infections in Turkey” makale yayın aşamasında
- Hepatit Delta Virüsü için Hücre Kültür Sisteminin Kurulması (Poster sunumu) Ulusal Hepatoloji Kongresi 2011. İnci Çelik, Ersin Karataylı, Senem Ceren Karataylı, Duygu Koyuncu, Miray Akgüç, S. Gökçe K. Alagöz, Esra Çelik, Tuğba Öztürk, Cihan Yurdaydın, A. Mithat Bozdayı