

T.C. DİCLE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji
Anabilim Dalı

HBsAg Pozitif Kan Donörlerinde HDV'nin
Serolojik ve Moleküler Yöntemler Kullanılarak
Araştırılması

(UZMANLIK TEZİ)

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Kadri GÜL

Dr. Sevim MEŞE

2008
DİYARBAKIR

İÇİNDEKİLER

TABLO LİSTESİ	4
ŞEKİL LİSTESİ	5
KISALTMALAR.....	6
1. GİRİŞ	7
2. GENEL BİLGİLER.....	8
2.1 VİRAL YAPI	8
2.1.1 Zarf Yapı	9
2.1.2 Genomik Yapı	9
2.1.3 Delta Antijeni (HDAg).....	10
2.2 REPLİKASYONU.....	11
2.3 GENOTİPLER	13
2.4 PATOGENEZ VE İMMÜNİTE	14
2.5 EPİDEMİYOLOJİ	15
2.5.1 Bulaş Yolları.....	17
2.6 KLİNİK	18
2.6.1 Akut HDV hepatiti	18
2.6.2 Kronik hepatit.....	19
2.6.3 Latent infeksiyon.....	19
2.7 LABORATUVAR TANI.....	20
2.7.1 Ayırıcı Tanı	21
2.8 TEDAVİ ve KORUNMA	22
2.9 KAN BANKACILIĞI VE HDV	23
3. MATERYAL VE METOD.....	25
3.1 TOTAL ANTİ-DELTA ANTİKORLARININ ARAŞTIRILMASI	25
3.2 HDV RNA ARAŞTIRILMASI	26

3.2.1	HDV RNA Ekstraksiyonu (RTP ^R DNA/RNA Virus Mini Kit)	27
3.2.2	Kantitatif HDV RNA REAL-TİME PCR Amplifikasyonu (RoboGene ^R HDV RNA Virus Kiti ile).....	28
4.	BULGULAR	30
5.	TARTIŞMA.....	33
	ÖZET	38
	SUMMARY	40
	KAYNAKLAR.....	42

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: HDV epidemiyolojisinde endemisite dağılımı.	15
Tablo 2: Değişik hasta gruplarında anti-Delta pozitifliğinin yıllara göre dağılımı	16
Tablo 3: Anti-Delta prevalansının bazı merkezlerde, değişik klinik tablolarındaki oranları.	17
Tablo 4: HDV infeksiyonunda serolojik tanı	21
Tablo 5: Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Kan Bankasındaki tarama sonuçları.....	31
Tablo 6: HBsAg pozitif donörlerde HDV infeksiyon göstergelerinin yüzde dağılımları.....	32
Tablo 7: Bazı merkezlerdeki HBsAg, anti-HCV, anti-HIV, VDRL seropozitiflik oranları	34

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: HDV'nin şematik yapısı.	8
Şekil 2: Genomik ve antigenomik yapı.	10
Şekil 3: HDAg'nin işlevsel bölgeleri	11
Şekil 4: HDV'nin genom transkripsiyonu.	12
Şekil 5: HDV replikasyonu.....	13
Şekil 6: Akut Delta koinfeksiyonun klinik ve serolojik seyri.	18
Şekil 7: Akut Delta süper infeksiyonun klinik ve serolojik seyri.	19

KISALTMALAR

HDV: Hepatit Delta Virusu

HCC: Hepatosellüler karsinoma

HBV: Hepatit B Virusu

RNA: Ribonükleik asit

RT-PCR: Revers transcriptase polimerase chain reaction

HBsAg: Hepatit B yüzey antijeni

HDAg: Hepatit Delta antijeni

ORF: Açık Okuma Alanı (Open Reading Frame)

S-HDAg: Küçük HDAg

L-HDAg: Büyük HDAg

RIA: Radyoimmünassay

EIA: Enzim Immünassay

CMV: Citomegalovirus

EBV: Epstein-Barr virus

HSV: Herpes simplex virusu

HAV: Hepatit A Virusu

HCV: Hepatit C Virusu

HTLV: Human-T Cell Lymphotropic Virus

MPEIA: Mikropartikül Enzim Immünoassay

VDRL: Venereal Disease Research Laboratory

RPR: Rapid Plasma Reagin

WB: Western Blot

RSHM: Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi

NAT: Nükleik asit amplifikasyon testleri

1. GİRİŞ

Dünyada 15 milyon kişi Hepatit Delta Virusu (HDV) ile infektidir. HDV diğer hepatotrop viruslarla karşılaştırıldığında daha seyrek görülmesine rağmen fulminan hepatit, kronik hepatit ve hepatosellüler karsinoma (HCC) gibi ciddi hastalık tablolarına daha yüksek oranlarda neden olmaktadır. Ayrıca şimdiye kadar kronik Delta hepatit için mevcut etkin bir tedavi protokolünün olmaması da bu virusun önemini arttırmaktadır (1).

HDV defektif bir ribonükleik asit (RNA) virusu olup replikasyon için Hepatit B Virusuna (HBV) gereksinim duymaktadır. Bu nedenle HDV ancak HBV ile infekte bireyler arasında bulaş gösterebilir (2). HDV, HBV gibi çoğunlukla kontamine kan ve kan ürünlerinin parenteral verilmesiyle daha az oranda vücut sıvıları ile yakın temas veya cinsel yolla bulaşmaktadır (3).

HBV enfeksiyonlarından korunmaya yönelik aşılama ve kan donörlerinin taraması gibi önlemler, HBV ile birlikte HDV enfeksiyonu sıklığında belirgin azalma sağlamıştır. Ancak ülkemizde özellikle Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde olmak üzere ciddi oranlarda HDV seropozitifliği devam etmektedir. Ülke genelinde kronik hepatitlerde %20, karaciğer sirozlu hastalarda %32.50 oranında anti-Delta antikor pozitifliği vardır. Bu oranlar Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde %30-50'lere kadar çıkmaktadır (4).

Serum anti-Delta antikorlarının saptanması gibi geleneksel yöntemler HDV enfeksiyonu tanısı için yeterlidir. Bununla beraber serolojik testler HDV enfeksiyonunu daha doğru olarak tanımlamak ve tedavinin etkinliğini belirlemek için gerekli sensitivite ve spesifiteden yoksundur. Son zamanlarda HDV RNA "hybridization" ve "revers transcriptase polymerase chain reaction" (RT-PCR) gibi geliştirilen moleküler teknikler, doğru tanı konulmasında artış sağlamıştır. Moleküler yöntemlerle HDV RNA varlığının araştırılması uygulanan tedavinin etkinliğini belirleme açısından da en güvenilir kontrol tekniği olarak değerlendirilmiştir (5).

Bu çalışmada gönüllü kan donörlerinin taraması sonucu Hepatit B yüzey antijeni (HBsAg) pozitifliği saptanan bireylerde HDV varlığının serolojik ve moleküler yöntemlerle araştırılması amaçlanmıştır.

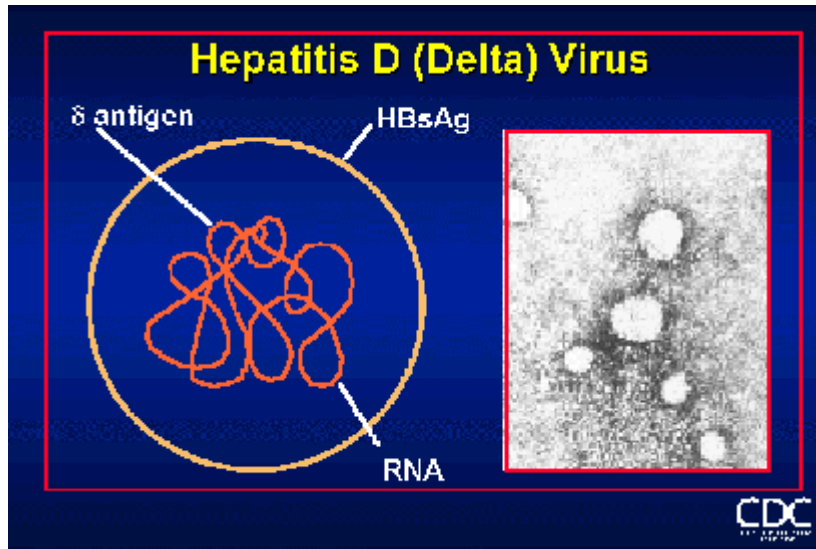
2. GENEL BİLGİLER

Rizetto ve arkadaşları tarafından ilk defa 1971 yılında bazı İtalyan HBV taşıyıcılarında Hepatit Delta antijeni (HDAg) olarak adlandırılan yeni bir nükleer antijen keşfedilmiştir. 1980 yılında şempanzelerde yapılan deneylerle bu antijenin HDV olarak adlandırılan yeni bir virusa ait olduğu gösterilmiştir. HDV'nin HBsAg ile çevrili, tek sarmal negatif RNA ve HDAg içeren bir nükleokapsitten oluştuğu ortaya çıkarılmıştır. HDV'nin HBV'ye bağımlı subviral ajan olduğu düşünülmüştür (6). Günümüzde yeni ve bağımsız cins olarak kabul edilen *Deltavirus* cinsinin tek üyesi olarak sınıflandırılmaktadır. HDV belirli karakterler yönünden viroidler, virusoidler, satellit virüsler olarak isimlendirilen bitki patojenlerin değişik sınıflarındaki üyelerine benzemektedir. Bu subviral bitki patojenlerinin bazılarında olduğu gibi HDV genomu, kovalent olarak kapalı tek sarmal RNA yapısında olup kendi kendini kesme ve bağlama aktivitesine sahiptir. Ancak bu ajanlar, hiçbir proteini şifrelememektedirler. Bu ilginç sınıf ajanların memelilerdeki bilinen tek örneği HDV'dir (7).

2.1 VİRAL YAPI

HDV çapı 36-43 nm arasında değişen düzensiz sferik bir yapıya sahiptir. RNA genomu ve nonglikolize fosfoprotein yapısındaki HDAg'den oluşan nükleokapsit 19 nm çapındadır. Nükleokapsiti çevreleyen zarf yapısı HBsAg'den oluşmaktadır (8).

Şekil 1: HDV'nin şematik yapısı.



2.1.1 Zarf Yapı

HDV virion kılıfı HBsAg'nin büyük (L), orta (M) ve küçük (S) olmak üzere tüm formlarını içerir. İnfeksiyöz HBV partikülü (Dane partikülü) bu proteinleri sırasıyla 1:1:4 oranında içermektedir. Farklı olarak HDV kılıfındaki bu proteinlerin oranları 1:5:95 olarak rapor edilmiştir. Bu oranlar HBV'nin serumda daha fazla bulunan 22 nm çapında infeksiyöz olmayan, boş subviral partikülü ile yakın benzerlik göstermektedir. S proteini HDV RNA ve HDAg'nin paketlenmesi için yeterli kılıf oluşturmakta, ancak infektivite için bu kılıfta L proteininin de bulunması gerekmektedir. M proteinin infektivite için gerekli olmadığı gösterilmiştir. HDV zarf proteinlerinin benzerliğinden dolayı HBV ile ortak organ tropizmi gösterir. Ancak HDV, HBV'den farklı olarak pankreas veya periferik kan hücreleri gibi ekstrahepatik dokularda saptanmamıştır. Bu durumun iki virus arasındaki reseptör ve koreseptör kullanım farklılığından ve zarftaki HBsAg'nin üç komponentinin farklı oranlarından kaynaklandığı düşünülmektedir (9).

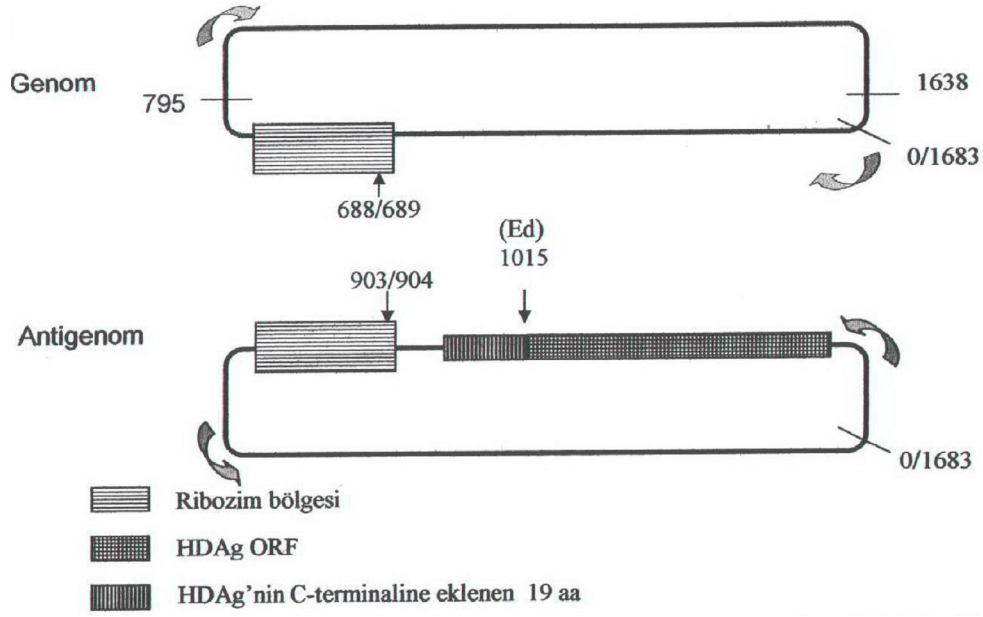
3.2.2 Genomik Yapı

HDV yaklaşık 1700 nükleotid içeren tek iplikçikli negatif RNA genomuyla bilinen en küçük hayvan virusudur. HDV genomu G+C oranının yüksek olması (%60) ve yüksek derecede intramoleküler baz çiftleşmesi (%70) nedeniyle kendi üzerine katlanabilir ve stabil dallanmamış çomak (rod-like) yapıda bulunur. Denatüre olduğunda ise çembersel moleküle dönüşür.

Genom replikasyonu sadece hepatosit nükleusunda gerçekleşmektedir. İnfekte hepatositlerin nükleusunda genom, yanı sıra bunun tam bir komplementeri olan ikinci bir molekül daha bulunmaktadır ve antigenom olarak adlandırılmaktadır. Genomik RNA ve antigenom, spontan kırılma ve spontan bağlanma reaksiyonlarının gerçekleşmesi için ribozim aktivitesi göstermektedir. Ribozim aktivitesi Magnezyum varlığında oluşur. Spontan kırılma bölgesi genomik RNA'da 688-689 nükleotidlerinde U ve G arasındadır. Bu bölge antigenomik RNA'da ise genomik RNA'ya komplementer olacak şekilde 903-904 nükleotidleri arasına yerleşmiştir.

HDV RNA molekülü biyokimyasal özellik ve fonksiyon olarak 2 yapısal bölgeye ayrılabilir: Bölgelerden birisi 615-950 nükleotidleri arasında olup ribozim aktivitesi içermektedir. Diğer bölge ise Açık Okuma Alanı (Open Reading Frame: ORF) olarak adlandırılmakta ve HDAg'nin kodlanmasını sağlamaktadır (5, 10-12).

Şekil 2: Genomik ve antijenomik yapı (Kaynak 5’den alınmıştır).



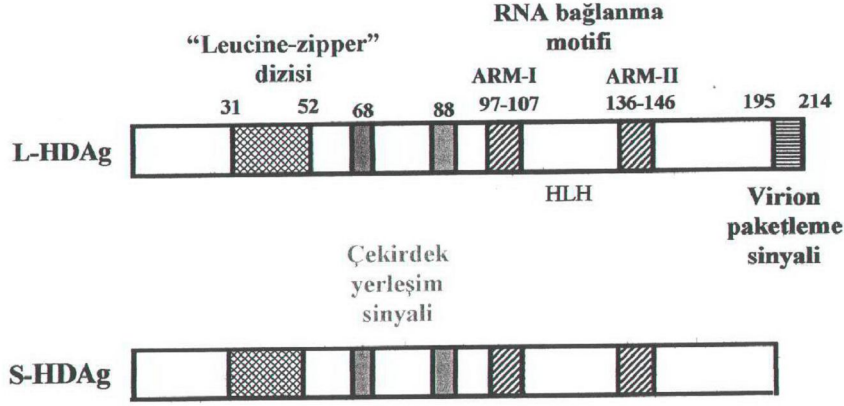
3.2.3 Delta Antijeni (HDAg)

HDAg, HDV RNA'ya yüksek bağlanma affinitesi gösteren bir proteindir. HDAg üç işlevsel bölge içermektedir. Bunlardan birincisi lösin ve izolösinden zengin “leucin zipper” benzeri diziler içeren bölgedir. Bu bölge proteinin amino ucunda 31 ve 52 aminoasitler arasında bulunur ve HDAg'nin bazı görevleri için gerekli protein oligomerizasyonu ile proteinler arası etkileşimlerden sorumludur (5). İkinci bölge 68-88 aminoasitler arasında bulunan bazik aminoasitlerden zengin, çekirdek yerleşim sinyal bölgesidir (nuclear localization). Bu bölge HDV RNA'nın hücre çekirdeğine yönelmesini sağlar. Üçüncü bölge, proteinin 1/3 orta bölümünde yer alır ve arjininden zengindir. Bu bölge RNA bağlanma bölgesi olarak işlev görmektedir (13).

HDV'nin kodladığı tek protein olan Delta antijeni tüm infekte hücrelerde bulunur. HDV Delta antijeninin iki farklı formunu kodlamaktadır. Antigenomik RNA'da bulunan tek ORF tarafından HDAg'nin küçük (S-HDAg, 24 kDa) ve büyük (L-HDAg, 27 kDa) formları kodlanmaktadır (10). Virusun aynı mRNA'dan 2 farklı protein yapması “özüml post transkripsiyonel RNA düzeltme” mekanizması olarak tanımlanır. S-HDAg'ni şifreleyen ORF'nin karboksil terminalinde özel bir mutasyon sonucu konakçı RNA polimeraz durmadan okumaya devam eder. 195 aminoasit içeren S-HDAg'ye 19 aminoasit eklenerek 214 amino asit içerikli L-HDAg oluşur (7, 16). S-HDAg, genomik RNA'nın çekirdeğe taşınması, yıkılmasının önlenmesi ve genom replikasyonun

ilerlemesi için gereklidir. L-HDAg ise genom replikasyonunu baskımlarken, virus partiküllerinin bir araya toplanması, paketlenmesi ve taşınması için gereklidir (10, 14).

Şekil 3: HDAg'nin işlevsel bölgeleri (Kaynak 5'den alınmıştır).

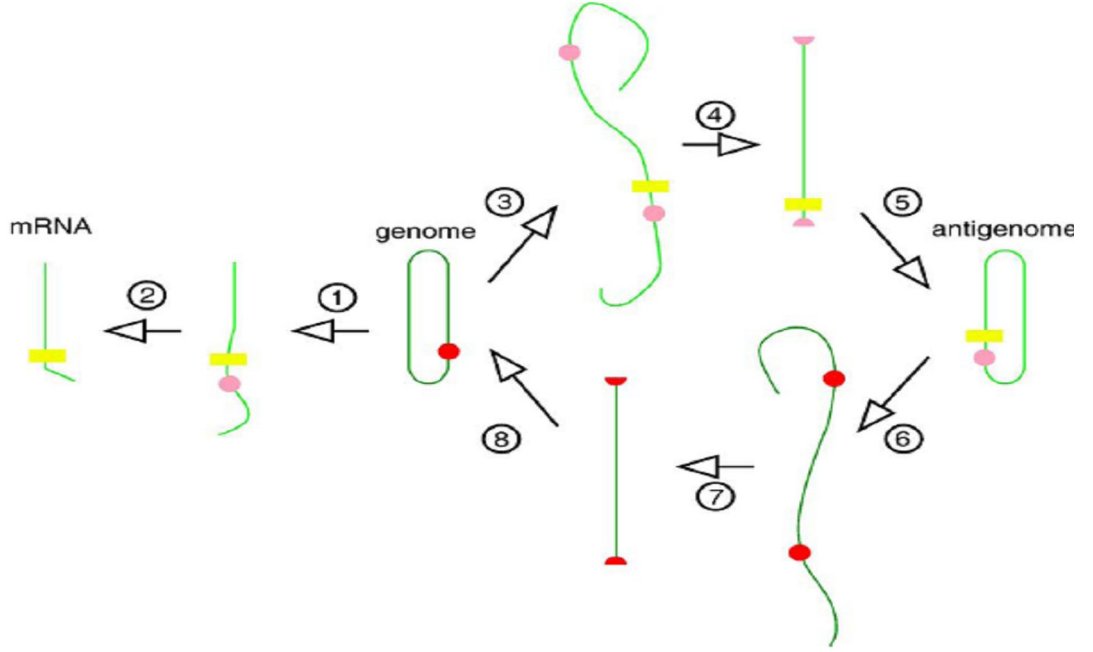


2.2 REPLİKASYONU

HDV'nin hepatosit yüzeyindeki özgül reseptörlere tutunabilmesi için HBV'ye ait preS1 proteini gereklidir. Tutunmayı hücreye giriş ve zarfın soyulması izler. Delta antijeni, içerdiği çekirdek yerleşim sinyali ile hücre çekirdeğine yönelme sağlamaktadır (13). HDV konak hücrenin RNA polimeraz II enzimini kullanarak iki tip RNA transkripsiyonu gerçekleştirmektedir. Birinci RNA, çembersel pozitif iplikçikli RNA olup antigenom olarak adlandırılır. İkincisi kısa poliadenilize olmuş doğrusal RNA'dır. Çembersel RNA yeni genomik RNA'lar için kalıp olarak kullanılır. Doğrusal RNA'lar sitozole taşınır ve ribozomlarda çevrilerek yeni HDAg'nin oluşumunu sağlar. HDV hem antigenom hem de RNA'ların beraber transkripte olduğu negatif iplikçikli tek insan virusudur. HDV birçok bitki virusunun kullandığı "double rolling circle" modeli olarak bilinen yuvarlanan çift çember replikasyon mekanizmasını kullanmaktadır (15- 18).

HDV RNA'dan önce farklı genomik uzunluklardaki antigenomik RNA'lar sentezlenmektedir. Bu antigenomik RNA'lar spontan kırılma ve ardından spontan bağlanma reaksiyonları geçirerek 1700 baz çifti uzunluğundaki monomerik antigenomik RNA'ları oluşturmaktadır. Oluşan monomerik antigenomik RNA'lar, monomerik genomik sense RNA'ları oluşturmak üzere "double rolling circle" mekanizması geçirirler (7, 9).

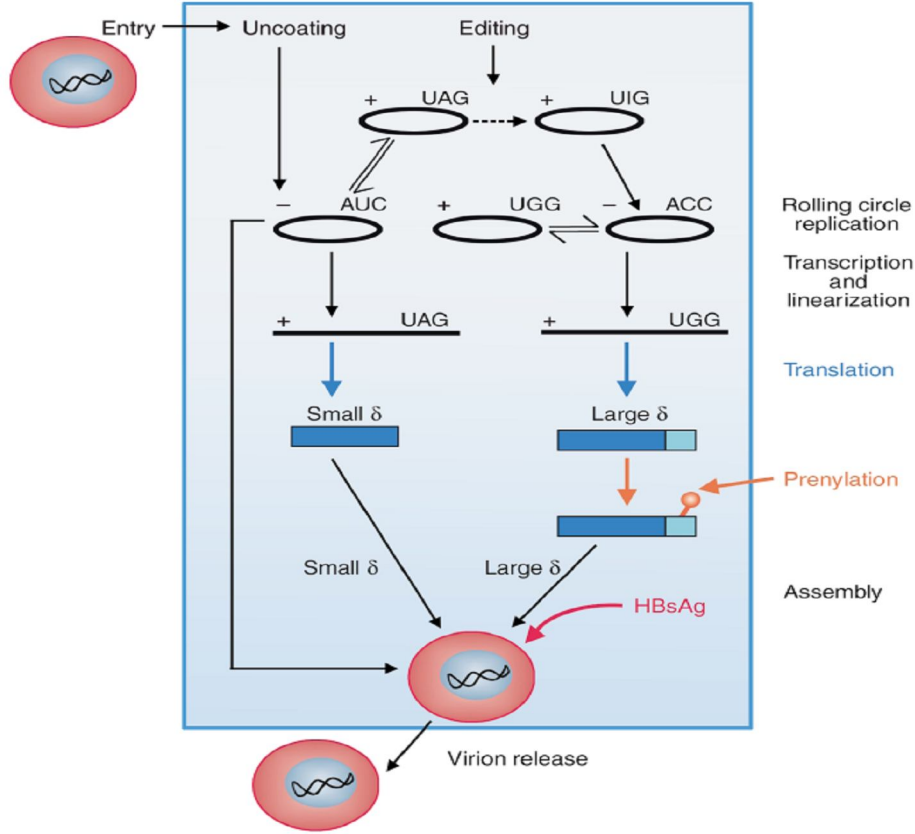
Şekil 4: HDV'nin genom transkripsiyonu (Kaynak 9'dan alınmıştır).



- (1) Genomik RNA, RNA transkripsiyonu için bir kalıp gibi davranır.
- (2) Poliadenilasyon ile mRNA oluşumu gerçekleşir.
- (3) Genomik RNA, antijenomik RNA transkripsiyonu için de kalıp görevi görür (sirküler RNA kalıbından transkripte edildiği için daha büyük birim uzunluğa ulaşabilir).
- (4) Birim uzunluktaki doğrusal antijenom serbestleşmek üzere ribozom klivajına uğrar (spontan kırılma).
- (5) Daha sonra çubuk-benzeri yapıya bükülerek yeni antijenomik RNA çemberi üretmek amacıyla bağlanır (spontan bağlanma).
- (6–8) 4. ve 5. basamaklardaki gibi, yeni antijenomik RNA, yeni genomik RNA transkripsiyonu ve işlenmesi için kalıp görevi görebilir (double rolling circle).

Replikasyon sırasında, RNA düzeltme mekanizmasının ilgi çekici bir örneği sergilenmektedir. S-HDAg'nin terminasyon kodonunda bulunan UAG'nin UGG'ye değişmesi ile L-HDAg oluşur. Replikasyon için gerekli olan S-HDAg'nin L-HDAg'ye dönüşümü replikasyonu sonlandırır ve paketlenmeyi başlatır. Viral genom çekirdekte sentezlendikten sonra S-HDAg ve L-HDAg ile birlikte paketlenir. Ancak paketlenmeden primer olarak L-HDAg sorumludur. L-HDAg "prenylation" bölgesine sahiptir ve bu bölge hem HDV RNA hem de HBsAg'ye bağlanan hidrofobik bir molekül meydana getirir. Bu durum viral bir toparlanma ve serbestleşmeye neden olur (7, 18).

Şekil 5: HDV replikasyonu (Kaynak 18'den alınmıştır).



3.3 GENOTİPLER

İnsan serumu, şempanze ve dağ sıçanlarından elde edilen çeşitli HDV izolatlarının DNA dizileri incelenmiş ve HDV RNA'nın varyantları arasında uzunluk farklılıklarının olduğu gözlenmiştir. HDV RNA'ların uzunlukları 1678 nükleotid ile 1683 nükleotid arasında değişir. Yapılan homoloji çalışmalarında varyantlar arasında %82-95 oranında homoloji saptanmıştır. Aynı coğrafik bölgeden olan hastalarda bile yüksek oranda değişiklikler saptanabilmektedir. Hatta aynı hastadan elde edilen HDV RNA'lar arasında bile heterojenite saptanabilir (19).

Dünya'nın çeşitli bölgelerinden toplanan HDV izolatlarının analizi, farklı coğrafik dağılımlar ve farklı klinik tablolar ile üç ana genotipin varlığını göstermektedir. Bunlar sırasıyla I, II ve III olarak belirtilmektedir. Genotip I tüm dünyada en yaygın olanıdır; Kuzey Amerika, Avrupa, Afrika, doğu ve batı Asya'da bulunmaktadır. Türkiye'de de Genotip I'in yaygın olduğu bilinmektedir. Genotip I orta dereceden şiddetliye doğru değişik hastalık tablolarıyla ilişkilidir. Genotip II sadece doğu Asya'da (Tayvan ve Japonya) bulunmaktadır ve bu bölgedeki HDV hastalıklarının hafif biçimlerinden sorumludur. Genotip III ise Güney Amerika'nın kuzeyinde ciddi fulminan hepatit salgınlarıyla ilişkili bulunmuştur (20).

Genotipler arasında nükleotid dizilimleri belirgin farklılık göstermektedir. Bu farklılığın nükleotid düzeyinde %40, aminoasit düzeyinde ise %35 olduğu belirtilmektedir. HDV genotipleri arasındaki dizi farklılıkları viral replikatif aktivitedeki varyasyonlarla ilişkilendirilmektedir. HDV dizi farklılıklarının enfeksiyon ve patogenezi ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir (21).

3.4 PATOGENEZ VE İMMÜNİTE

HDV'nin patolojik etkileri, replike olabildiği tek organ olan karaciğer ile sınırlıdır. Karaciğerde hepatosellüler nekroz ve inflamasyonla karakterli, akut veya kronik hepatite neden olur. Histolojik olarak diğer hepatitlerden ayrılmayan bu tablo daha ağır olabilir (15).

HDV enfeksiyonunun patogenezi hala tam olarak açıklanamamıştır. HDV'nin direkt sitopatik etkili olduğunu bildiren çalışmalar vardır. S-HDAg ve L-HDAg'nin deneysel modellerde enfekte hücrelerdeki ekspresyonu; büyüme potansiyelini azaltmış ve toksisiteye neden olmuştur. S-HDAg'nin ise avian hücrelerinde eksprese olduğunda apoptozisi anlamlı olarak indüklediği gösterilmiştir. Bununla birlikte HDV ile insan hepatositlerinde, transgenik fare modellerinde ve sadece Delta antijeni eksprese eden dokularda HDV varlığına rağmen karaciğer hasarı saptanmadığını dolayısıyla sitopatik olmadığını gösteren çalışmalar da mevcuttur (22)

Konakçı immün mekanizmalarının karaciğer hasarındaki rolleri bilinmemektedir. Virusa karşı oluşan anti-Delta antikorlarının kronik enfeksiyonla birlikte görülmesi, koruyucu olmadıklarını göstermektedir. Bununla birlikte akut geçirilen ve iyileşme ile sonuçlanan HDV enfeksiyonundan sonra ikinci kez geçirilen HDV enfeksiyonu henüz bildirilmemiştir. Bu nedenle koruyucu bazı mekanizmaların olduğu düşünülmektedir (15).

Akut viral hepatit D'de ana patoloji HDAg'nin aşırı üretiminin direkt viral sitotoksisite ile sonuçlanırken, kronik hepatit D'de konağın immün yanıtları önem kazanmaktadır. Kronik HDV enfeksiyonunda özgül yardımcı T hücrelerin immün yanıta etkin bir rol oynadığı düşünülmektedir. Ayrıca HDV patogenezi, HBV enfeksiyonuna bağlı immunopatolojinin de rol oynadığı bildirilmektedir (23).

HDV antijenlerini kodlayan dizilerdeki özellikle B ve T hücre epitoplarındaki genetik rekombinasyon virusun evolüsyonunda ve farklılaşmasında önemli rol oynamaktadır. Nitekim akut alevlenme sonrası S-HDAg'nin B hücre epitoplarında aminoasit değişiklikleri sonucu meydana gelmiş yeni dominant epitoplar saptanmıştır.

Bu değişiklikler sonucu konağın immun yanıtından kaçmasını sağlayan kaçak (escape) mutasyonlar meydana gelebileceği bildirilmiştir. Ayrıca birçok persistan viral enfeksiyonda saptanmış defektif viruslar, kronik HDV enfeksiyonlu hastalarda da saptanmıştır. Bu parametrelerin HDV'nin patogenezinde ve kronikleşmesinde etkili olduğu düşünölmektedir (22).

3.5 EPİDEMİYOLOJİ

Tüm dünyada yaklaşık olarak 460 milyon kişi HBV ile enfekte durumundadır. Bunların da 20 milyon kadarı aynı zamanda HDV ile enfektedir (10). HDV enfeksiyonunun dünyadaki epidemiyolojik özellikleri genel çizgileri ile HBV'ye benzemektedir. HDV'nin prevalansı ilk açıklandığı yer olan Akdeniz bölgesinde, HBV ile paralellik gösterir (3). Ancak Güneydoğu Asya, Çin, Japonya, Afrika ve Alaska'da HBV sıklığı yüksek olmasına karşılık HDV sıklığı düşüktür. HBV prevalansının ileri derecede yüksek olduğu kimi bölgelerde, HDV prevalansının düşük bulunmasının nedeni açıklanamamıştır (4).

Yapılan çok merkezli epidemiyolojik çalışmalarla HDV enfeksiyonu, dünyadaki sıklığı bakımından 4 geniş sınıfta tanımlanmaktadır ve endemisitenin ölkelere göre dağılımı da farklılık göstermektedir (Tablo1).

Tablo 1: HDV epidemiyolojisinde endemsite dağılımı (Kaynak 4'den alınmıştır).

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

Genel olarak gelişmiş ülkelerde HDV infeksiyonu koinfeksiyon, gelişmemiş ülkeler ve Akdeniz çevresinde süperinfeksiyon şeklinde görülmektedir. Endemik bir hastalık olmasına rağmen çocuklar ve genç erişkinlerde ani başlayan fulminan hepatit şeklinde epidemilere rastlanmaktadır. İntravenöz ilaç kullananlar ve hemodiyaliz hastalarında koinfeksiyon epidemileri bildirilmiştir (19).

Orta endemisite kuşağında yer alan ülkemizde yapılan pek çok çalışma ile değişik hasta ve risk gruplarında HDV prevalansı araştırılmıştır. Akut viral hepatitlerde anti-Delta pozitifliğini, Göktaş ve arkadaşları %0.70, Kurultay ve arkadaşları %0.40, Kılıç ve arkadaşları %2.50, Güler ve arkadaşları %2.70 olarak bildirmişlerdir (24-27). İnaktif HBsAg taşıyıcılarında anti-Delta pozitifliğini, Topalak ve arkadaşları %1, Karakuş ve arkadaşları %2.60, Yıldırım ve arkadaşları %3.20, Kandemir ve arkadaşları %6 olarak bildirmişlerdir (28-31). Kronik karaciğer hastalarında anti-Delta pozitifliğini Ökten ve arkadaşları %2.90, Akarca ve arkadaşları %6.10, Görenek ve arkadaşları %8.60, Koca ve arkadaşları %16.10 olarak bulmuşlardır (32-35).

HBV aşısı ile HDV infeksiyonu sıklığında belirgin azalma olmuştur. Günümüzde batı ülkelerinde HDV artık seyrek rastlanan bir hastalıktır. Ülkemizde de giderek azalan HDV infeksiyonu prevalansının yıllara göre dağılımı Tablo 2’de verilmiştir (36).

Tablo 2: Değişik hasta gruplarında anti-Delta pozitifliğinin yıllara göre dağılımı (Kaynak 36’dan alınmıştır).

Yıllar	İnaktif HBsAg taşıyıcıları	Kronik Hepatit B	Karaciğer Sirozu
1980-1990	%4.1	%31.0	%43.3
1991-2000	%5.4	%19.4	%26.1
2001-2005	%2.9	%11.0	%24

Ancak son yıllarda Batı Avrupa’da, Doğu Avrupa’dan gelen göçmenler ve benzer şekilde yurdumuzda Doğu ve Güneydoğu Anadolu’dan Batı Anadolu’ya göçler nedeni ile HDV sıklığında artma izlenmektedir (36). Yalçın ve arkadaşları çalışmalarında anti-Delta pozitifliğinin Türkiye’deki bölgesel farklılığını göstermişlerdir (Tablo 3).

Tablo 3: Anti-Delta prevalansının bazı merkezlerde, değişik klinik tablolaradaki oranları (Kaynak 36'dan derlenmiştir).

Merkez	Akut hepatit B	Kronik hepatit B	Karaciğer sirozu
İstanbul	%6.9	%16.5	%26.9
İzmir	*	%14.0	%24.0
Ankara	%11.2	%28.0	%44.4
Diyarbakır	%22.5	%38.0	%59.4
Van	*	%33.3	%30.0

*Veri yok.

2.5.1 Bulaş Yolları

Biyolojik ilişkilerinden dolayı HDV'nin bulaş yolları kendisi için yardımcı fonksiyonu olan HBV ile benzerlik göstermektedir. En etkili bulaş yolu parenteraldir. Kontamine kişisel aletlerin kullanımı bulaş için en büyük risk faktörüdür ve daha çok yüksek endemisite bölgelerinde görülen bulaş yoludur (37). Hemodiyaliz hastalarında görülen nozokomial salgınlar da çevresel kontaminasyonla bulaşmayı göstermektedir (23).

Kan ve kan ürünleri ile bulaş düşük endemisite bölgelerinde görülen en önemli geçiş yoludur. Kan donörlerinde HBsAg taranması HBV ile birlikte HDV için de güvenli transfüzyonu sağlamaktadır. Ancak sık kan ve kan ürünü alan hemofili hastaları yüksek riskli grubu oluşturmaktadır. İntravenöz uyuşturucu kullanımı özellikle Kuzey Avrupa'da olmak üzere düşük endemisite bölgelerinde görülen bir diğer bulaş şeklidir (23, 37).

Perkutan ve mukozal bulaş parenteral göre düşüktür. Cinsel yolla bulaş nadirdir. Ancak seçilmiş vakalarda ve intravenöz uyuşturucu kullananların cinsel partnerlerinde cinsel yolla bulaş gösterilmiştir. HDV infeksiyonu genelev kadınları gibi izole gruplarda yaygındır. Homoseksüel erkeklerde HBV infeksiyonu %60'larda olmasına rağmen HDV ile bulaş %15'in altındadır. Bu oranlar HDV'de cinsel yolla bulaşın HBV'ye göre düşük olduğunu göstermektedir. Perinatal bulaş nadirdir. Vertikal geçişin annenin HBe Ag pozitifliğine bağlı olduğu gösterilmiştir (19).

2.6 KLİNİK

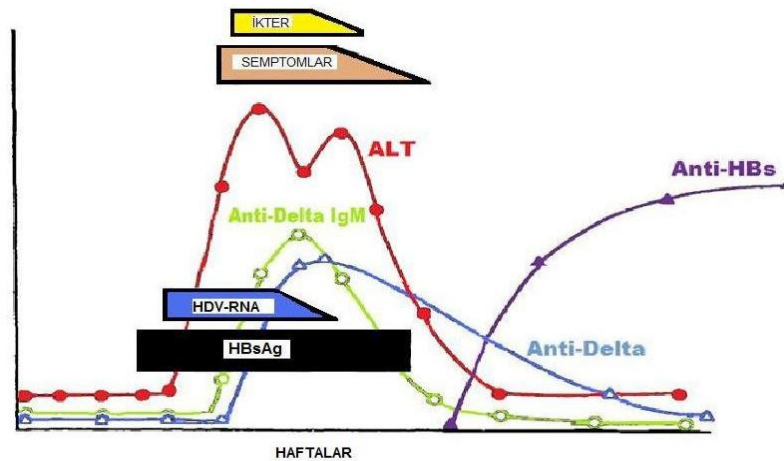
HDV primer olarak hepatotrop bir patojen olduğu için değişik hepatit tablolarına yol açar. Ancak diğer viral hepatitlere göre genellikle daha şiddetli seyreder.

3.6.1 Akut HDV hepatiti

HDV'nin replikasyon için HBV'ye gereksinimi nedeniyle kişinin daha önceden HBV ile karşılaşmış olma durumuna göre iki klinik tablo görülür. Her iki durumda da HDV enfeksiyonu, henüz aydınlatılamamış bir mekanizma ile HBsAg ekspresyonunda azalma olmaksızın HBV replikasyonunu baskılar.

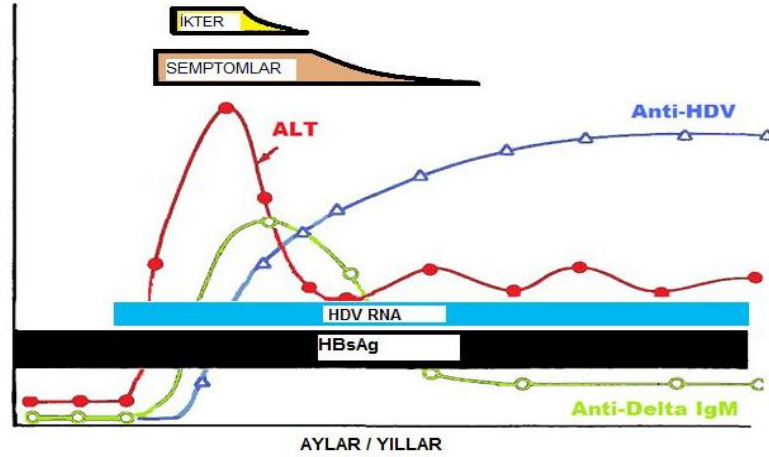
Koinfeksiyon: HBV ve HDV ile eşzamanlı olarak enfekte olan kişilerde gelişen tablodur. Hastalığın inkübasyon dönemi inokülasyonun HBV titresine bağlı olarak 3-7 hafta kadardır. Yine virus titrelerine bağlı olarak bir ya da iki hepatit atağı görülür. ALT ve AST düzeylerinde bifazik yapı dikkati çeker. İlk atak HBV'ye, ikinci atak HDV'ye bağlıdır. Genellikle kendini sınırlayan, iyileşen enfeksiyonlardır. İktter ortaya çıkmadan önce olgularda yorgunluk, halsizlik, iştahsızlık, bulantı gibi belirtiler görülür. 3-7 gün süren bu dönemde ALT ve AST yüksektir, viral replikasyon azalmaya başlamıştır. Sarılığın belirmesi ile iktirik dönem başlar. Billirubin düzeyi artar, idrar renginde koyulaşma, dışkı renginde açılma görülür. Klinik tablonun en ağır olduğu bu dönemde viral replikasyon durmuştur. Bundan sonra klinik belirtilerin azalması ile konvelesan döneme geçilir. İştahsızlık ve bulantı kaybolurken, halsizlik ve yorgunluk bir süre daha devam eder. Bu klinik belirtilerle diğer viral hepatitlerden ayrılamayan akut HDV enfeksiyonunun daha ağır seyirli olduğu dikkati çeker. Koinfeksiyon şeklinde geçirilen enfeksiyonda kronikleşme nadirdir (38).

Şekil 6: Akut Delta koinfeksiyonun klinik ve serolojik seyri (Kaynak 8'den).



Süperinfeksiyon: HBsAg taşıyıcısı veya HBV'ye bağlı kronik karaciğer hastalığı olan kişilerde, ilave olarak HDV'nin alınmasıyla ortaya çıkar. Prognoz koinfeksiyona göre daha kötüdür. Kronikleşme oranı %70'e kadar çıkabilir. Mevcut karaciğer hastalığı kötü yönde etkilenir; kronik hepatit hızlanır, kronik aktif hepatit ve siroz gelişimi olasılığı artar (8).

Şekil 7: Akut Delta süperinfeksiyonun klinik ve serolojik seyri (Kaynak 8'den).



Fulminan hepatit: Akut hastalığın en ağır formudur. Bu formda konsantrasyon güçlüğü, konfüzyon, uykuya eğilim, kişilik değişikliği gibi hepatoensefalopati bulguları, ağır olgularda davranış bozuklukları, somnolans ve koma izlenir. Sarılık çok ileri düzeyde olabilir. Serum AST ve ALT değerleri masif hepatik nekroz sonucu canlı hepatositlerin azalmasına bağlı olarak düşebilir. Mortalite %80 kadardır. Fulminan hepatit, karaciğer transplantasyonu için bir endikasyondur (3).

3.6.2 Kronik hepatit

HDV infeksiyonunun sık gelişen bir biçimidir. Genellikle klinik olarak belirtili infeksiyonu takiben gelişir. Semptomlar akut hepatitten daha hafif olmasına rağmen ALT ve AST yüksektir. %60-70 olguda siroz gelişir ve hepatik yetmezlik ile ölüme götürür. HCC olgularında da HDV infeksiyonu bildirilmiştir. Fakat virusun direkt karsinojenik etkisinden çok siroza yol açmasının HCC'ya neden olduğu düşünülmektedir (15).

3.6.3 Latent infeksiyon

Karaciğer transplantasyonu uygulanan olgularda aktif HBV replikasyonu olmadan görülen HDV replikasyonu, latent infeksiyon olarak tanımlanmıştır. Ancak yapılan çalışmalarda bu düşüncenin aksine çok düşük düzeylerde olsa bile posttransplant

hastalarda HBV replikasyonu saptanabilmiştir. Olgularda hepatit tablosu yoktur veya çok hafiftir. Bununla birlikte HBV rekürrensini olasıyla hastalık alevlenir, hızla kronik ve ciddi hepatit tablosu gelişir (19).

3.7 LABORATUVAR TANI

HDV infeksiyonunun tanısı ya virusa ilişkin göstergelerin (HDAg ve HDV RNA) ya da virusun antijenik yapılarına karşı oluşan antikorların saptanmasıyla konur. Koinfeksiyon ve süperinfeksiyon ayırımı bu test sonuçlarının HBV infeksiyon göstergeleri ile korelasyonuna bakılarak yapılmaktadır.

HDAg hem serumda hem karaciğerde gösterilebilir. Karaciğerde HDAg'nin gösterilmesinde immünoperoksidaz ve immüno Floresans yöntemleri kullanılır. HDAg'nin karaciğerde gösterilmesi tanı için altın standart olmasına rağmen karaciğer biyopsisi gerektirdiğinden rutinde uygulanmaz. HDAg'nin serumda gösterilmesinde Radyoimmunoassay (RIA), Enzyme Immunassay (EIA) ve immunoblotting yöntemleri kullanılmaktadır. HDAg'nin saptanmasında kullanım kolaylığından dolayı EIA yöntemi sıklıkla tercih edilmektedir.

Serumda HDAg miktarı, HDV infeksiyonunun süresine ve dönemine bağlı olarak değişmektedir. İnfeksiyonun ilk 2-3 haftasında HDAg'nin serumda pozitif olduğu kabul edilmektedir. Kronik olgularda ise HDAg'ye karşı gelişen antikorlarla immün kompleks oluşmakta ve HDAg pozitifliği intermittant seyir göstermektedir. Bu nedenlerle HDV infeksiyonunun tanısında HDAg aranması rutin kullanıma girmemiştir.

HDAg'ye karşı hem IgM hem de IgG sınıfından antikorlar gelişmektedir. Serumda RIA veya EIA yöntemleri ile saptanırlar. Anti-Delta IgM etkenin alınmasından 1 ay içinde serumda saptanabilir. 2-4 hafta gibi kısa süre içerisinde kaybolur ve anti-Delta IgG antikorları ortaya çıkar ve en az 6 ay pozitif kalır. Anti-Delta IgM antikorlarının persistansı kronikleşmeye gidişi gösterir. Anti-Delta IgM düzeyinde azalma veya tamamen yok olması rezolüsyonu göstermektedir. Standart testlerde anti-Delta IgM ve anti-Delta IgG antikorları birlikte ölçülmektedir. Total anti-Delta titresinin 1/100'ün üzerinde pozitif olması kronik Delta hepatitini düşündürmelidir. Akut Delta hepatitinde titreler daha düşüktür.

Moleküler tekniklerin hızla ilerlemesi HDV infeksiyonu tanısında yeni olanaklar sağlamıştır. Serumda HDV RNA'nın gösterilmesinde hibridizasyon yöntemleri

geliştirilmiştir. Karaciğer dokusunda HDV RNA'nın insitu hibridizasyon yöntemleri ile gösterilmesi HDAg'nin immunohistokimyasal boyama yöntemlerinden daha duyarlı olduğu saptanmıştır. Son yıllarda en seçkin metod, infekte serumda 10-100 kopya HDV genomunu dahi saptayabilen RT-PCR yöntemidir. Bu yöntem, hibridizasyon yöntemlerinden 100 kat daha duyarlıdır. RT-PCR ile negatif sonuç pratik olarak HDV enfeksiyonunun eradikasyonuna eşittir (5, 19, 39).

3.7.1 Ayırıcı Tanı

Hepatit D, HBsAg pozitif bireylerde veya yakın zamanda geçirilmiş HBV enfeksiyonuna ait bulgusu olan kimselerde göz önünde bulundurulmalıdır. Yine HDV enfeksiyonu kan-kan ürünleriyle temas etmiş kimseler, yüksek riskli popülasyon grubundan olan kimseler ve yüksek riskli endemik bölgelerde yaşayanlarda da düşünülmelidir (40).

HDV enfeksiyonunun teşhisinde akut ve kronik enfeksiyonlu hastaları ayırmak önemlidir. Akut enfeksiyonlu hastalar arasında, Delta koinfeksiyonu hastaları, süperenfeksiyonlu hastalardan ayırmak da benzer şekilde önemlidir. Çünkü klinik seyir iki durumda çok farklıdır.

Akut HDV enfeksiyonu koinfeksiyon durumunda akut hepatit B'den doruk aminotransferaz yüksekliğinin bifazik olması ile ayırt edilebilir. Ancak koinfeksiyonda görülen bifazik seyir süperenfeksiyonda görülmez. Süperenfeksiyon ile koinfeksiyonun ayırımında anti-HBc IgM testi kullanılmaktadır. Anti-HBc IgM koinfeksiyon sırasında pozitif iken süperenfeksiyonda negatif seyir göstermektedir (Tablo 4).

Tablo 4: HDV enfeksiyonunda serolojik tanı (Kaynak 40'dan alınmıştır).

Klinik	HBsAg	Anti-HBc IgM	HDAg	HDV RNA	Anti-HD IgM	Total anti-Delta
Koinfeksiyon	+/-	+	+	+	+	+
Süperenfeksiyon	+	-	+	+	+	+
Kronik HDV	+	-	+/-	+	+/-	+/-

Kronik Delta hepatiti klinik olarak diğer kronik viral hepatitlerden ayırt edilemez, yani kronik Delta hepatitin klinik özellikleri nonspesifiktir. Bununla birlikte kronik Delta hepatit şu durumlarda akla gelmelidir.

- a) Anti-HBe (+), HBV DNA (-) olan kronik B hepatiti
- b) Hepatit B enfeksiyonlu bir hastada gözlenen hastalık aktivasyonu
- c) Hızlı seyreden, kısa sürede siroz gelişen hepatit vakalar

Kronik HBV enfeksiyonu seyrinde akut alevlenmeler görülebilir. Bu alevlenmeler HBV ile HDV arasındaki dual interferansa bağlı olabileceği gibi tedavi sırasında bir virusun baskılanmasıyla diğerinin dominant hale geçmesiyle de olabilir. Bu nedenle HBsAg pozitif kimselerde akut alevlenmelere bağlı gelişen şiddetli hepatit tablolarında HDV enfeksiyonu mutlaka göz önünde bulundurulmalıdır. Kronik HBV enfeksiyonunun akut ataklarında HDV'nin dışında Hepatit A Virus (HAV), Hepatit C Virus (HCV), Citomegalovirus (CMV), Epstein-Barr virus (EBV), Herpes simplex virus (HSV) ve Parvovirus B-19 gibi hepatotrop virusları ayırıcı tanıda düşünülmelidir.

Özet olarak HDV enfeksiyonlarının tanısında belli başlı 4 yöntem kullanılır;

1. Serumda hepatit Delta antijenine karşı gelişen antikorların saptanması.
2. Serumda HDV RNA'nın moleküler yöntemler ile gösterilmesi.
3. Fikse karaciğer dokusunda direkt in-situ hibridizasyon yöntemiyle HDV RNA'nın saptanması.
4. Biyopsi ile alınan karaciğer dokusunda immunohistokimyasal teknikler kullanılarak hepatit Delta antijeninin gösterilmesi (28).

3.8 TEDAVİ ve KORUNMA

HDV enfeksiyonunun özgül tedavisi henüz yoktur. Alfa-interferon ile yüksek doz ve uzun süreli tedavi uygulanması remisyon sağlayabilmektedir. Tedavi ile klinik olarak hastalığın ilerlemesi yavaşlatılabilmekte, fakat HDV RNA'nın kaybolması sağlanamamaktadır. Fulminan seyreden akut HDV enfeksiyonunda ve son dönem kronik HDV enfeksiyonunda karaciğer transplantasyonu endikasyonu vardır. Transplantasyon sonrası HDV replikasyonu devam etse bile HBV enfeksiyonu baskılandığı sürece karaciğer hastalığı engellenebilmektedir (15).

HDV enfeksiyonu için etkili bir tedavi yöntemi bulunmadığından dolayı korunmaya önem verilmelidir. Kan ve kan ürünleri HBV yönünden taramalıdır. Hepatit B aşısı

kullanarak HBV enfeksiyonu yanında HDV enfeksiyonuna karşı da korunma sağlanabilir. Birçok ÷lkede Hepatit B'ye karşı geniş çaplı aşılama kampanyaları sonucunda HBV ve HDV enfeksiyonu sıklığında azalma g÷zlenmiştir (23).

HDV'nin akut kendini sınırlayan bir imm÷nite geliştirebildiği belirtilmektedir. Yapılan çalışmalarda "wood chuck" modelinde HDV'nin sentetik veya eksprese gen ÷r÷nleriyle aktif olarak imm÷nize edilmesinin enfeksiyonu azaltabileceği g÷sterilmiştir. DeneySEL çalışmalarda rekombinant HDAg aşılarınin koruyucu etkinliği hen÷z g÷sterilememiştir (41, 42) .

HDV'den korunmada temel prensip hepatit B hastalığı geçirmemiş veya bağışık olmayanların aşılanması, kronik hepatit B hastalarının ise cinsel temasla geçiş ve kontamine iğne kullanma gibi riskli davranışlar konusunda eğitilmeleridir (23).

3.9 KAN BANKACILIğI VE HDV

Alıcıya zarar verebilecek herhangi bir mikroorganizma veya kimyasal madde içermeyen kan ve kan ÷r÷nleri olarak tanımlanan "g÷venli kan"a ulaşmak bug÷n kan bankacılığının en önemli hedefi durumundadır. Don÷r sorgulama ve mikrobiyolojik tarama testleri bu hedefe ulaşmak için kullanılan iki önemli yoldur. ÷lkeler bu amaçla kan bağışçılarını kendi sağlıkları ve alıcı açısından taşıyabilecekleri risklerle ilgili olarak ayrıntılı olarak sorgulamakla birlikte çeşitli enfeksiy÷z tarama testleriyle tarayarak, kullanıma sunulan kanı m÷mk÷n olduğu kadar g÷venli hale getirmeye çalışmaktadırlar. ABD, Avrupa Birliği ve ÷lkemizde bu amaçla kullanılan testler bazı farklılıklar g÷sterir. Bunun nedeni enfeksiyon etkenlerinin farklı epidemiyolojik ÷zellikler ve fiyat yarar-etkinlik değerlendirmeleri ile elde edilen verilerdir (43) .

Birçok ÷lkede rutin olarak çalışılan HBsAg, anti-HCV, anti-HIV ve Venereal Disease Research Laboratory (VDRL) testleri çalışılmaktadır. Brezilya'da b÷lgede endemik olarak bulunan Chagas Hastalığı'na, ABD'de Human-T Cell Lymphotropic Virus (HTLV 1-2)'ye ve sıtmanın endemik olduğu b÷lgelerde, hatta 1987 yılına kadar ÷lkemizde de sıtmaya y÷nelik taramaların kan don÷rlerinde rutin olarak yapılması enfeksiy÷z tarama testlerinin ÷lkeler arasındaki çeşitliliğine ÷rnek olarak g÷sterilebilir. ÷lkemizde 2857 sayılı Kan ve Kan ÷r÷nleri Kanunu ve ilgili y÷netmeliklerinde, kan bağışçılarında çalışılması zorunlu enfeksiy÷z tarama testleri, HBsAg, anti-HCV, anti-HIV ve VDRL olarak belirtilmiştir (43) .

Son 20 yılda tarama testlerindeki ilerlemeler sayesinde transf÷zyonla bulaşan enfeksiyonlar belirgin olarak azalma sağlamıştır. Kan don÷rlerinde HBsAg'ye rutin

taranması aynı zamanda HDV'nin posttransfüzyonel bulaşını da engellemektedir. Ancak sık kan ve plazma ürünleri alan hastalar HDV infeksiyonu açısından yüksek risk grubunu oluşturmaktadırlar (37). Plazma ürünleri, plazma fraksinasyon tesislerinde binlerce plazmanın havuzlanmasından sonra ayrıştırılmasıyla elde edilmektedir. Plazma havuzuna katılacak bir infekte plazmanın tüm lotu infekte edebileceği bir gerçektir. Bu nedenle plazma fraksinasyonunda, viral inaktivasyon işlemleri uygulanmakta ve risk minimize edilmeye çalışılmaktadır. Ancak yine de sıfırlanmadığı bilinmektedir (43).

Tarama duyarlılığını arttırmak ve serokonversiyonun henüz oluşmadığı pencere dönemindeki infeksiyonları yakalayabilmek amacıyla geliştirilmiş olan Nükleik asit amplifikasyon testleri (NAT) gelişmiş ülkelerde 1999'dan itibaren kan bankacılığında rutine girmiştir. NAT'ın rutine sokulmasına karar verilmesinde transfüzyon ile infeksiyon bulaş riskinin ne olduğu, NAT ile bunun ne kadar aşağılara çekilebileceği ve maliyet-yararlılık değerlendirmeleri önem taşımaktadır (44).

3. MATERYAL VE METOD

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesi Kan Merkezi'ne Ocak 2007-Şubat 2007 tarihleri arasında başvuran toplam 4882 gönüllü kan donörü HBsAg, anti-HCV, anti-HIV 1-2 ve nontreponemal sifilis antikorları açısından rutin olarak tarandı. HBsAg, anti-HCV, anti-HIV 1-2 testleri Mikropartikül Enzim Immünoassay (MPEIA, Axym, ABBOTT, Germany) yöntemiyle incelendi. Sifilis için RPR (Rapid Plasma Reagin, BioSystem S.A. Spain) aglütinasyon testi yapıldı. Bu testlerin tamamı kan merkezinde çalışıldı. Ancak anti-HIV pozitif bulunan serumların Western Blot (WB) doğrulama testi Refik Saydam Hıfızısıhha Merkezinde (RSHM) yapılmıştır. HBsAg pozitif 160 serum örneği, total anti-Delta antikoru ve HDV RNA çalışılmak üzere -70 °C' de saklandı. Anti-Delta pozitif serum örnekleri HBeAg, anti-HBe, anti-HBcIgM ve anti-HBcIgG açısından EISA (Modular Analytics E 170, Roche, Germany) yöntemi kullanılarak incelendi.

3.1 TOTAL ANTİ-DELTA ANTİKORLARININ ARAŞTIRILMASI

Total anti-Delta antikoru, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarında, EIA (ABBOTT Murex, 65205 Wiesbaden, Germany) yöntemi kullanılarak çalışıldı.

Murex anti-Delta (total), rekabete dayalı bir EIA testidir. HDAg ile kaplı kuyucuklara serum örnekleri eklenir. Örneklerde anti-Delta antikorlarının bulunması durumunda kuyucuklardaki HDAg'lere bağlanır. Daha sonra eklenen konjugatlı anti-Delta antikorları serbest kalır ve yıkamayla uzaklaştırılır. Test edilen örnekler anti-Delta antikoru içermediğinde ise HDAg'ler konjugatlı anti-Delta antikorlarına bağlanarak kuyucuklar mavi/yeşil bir renk alır. Reaksiyon sülfürik asit ile durdurulduğunda bu renk turuncuya döner. Anti-Delta antikoru pozitif örneklerde konjugat bağlanımı söz konusu olmadığından mavi/yeşil renk oluşumu yoktur. Bu durumda sülfürik asit eklendiğinde pembe renk oluşur.

Kit içeriği:

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

Test Prosedürü:

1. Öncelikle test plağı ve yıkama solüsyonu hazırlandı.
2. Her kuyucuğa 25 µl sample dilüent dağıtıldı.
3. Üçüncü kuyucuktan sonra her bir kuyucuğa 75 µl serum örneği eklendi.
4. Örneklerden sonra ilk iki kuyucuğa pozitif kontrol, üçüncü kuyucuğa negatif kontrol 75 µl olarak eklendi.
5. Kuyucukların üzeri kapatılarak 37 °C'de 60 dakika inkübe edildi.
6. İnkübasyon sonrası her kuyucuğa 50 µl konjugat dağıtıldı.
7. Plak 10 saniye çalkalandı.
8. Kuyucukların üzeri kapatılarak 37 °C'de 60 dakika inkübe edildi.
9. Bu arada substrat solüsyonu hazırlandı.
10. İnkübasyon bitiminde kuyucuklar yıkama prosedürüne göre yıkanır. Tüm kuyucuklara 500 µl yıkama solüsyonu koyularak 30 saniye beklendi ve yıkama solüsyonu kuyucuklardan çekildi. Bu işlem 6 defa tekrarlandı.
11. Yıkama işleminden sonra her kuyucuğa 100 µl substrat solüsyonu dağıtıldı.
12. Kuyucukların üzeri kapatıldı ve 30 dakika 37 °C'de inkübe edildi.
13. Her kuyucuğa 50 ml stop solüsyonu eklendi.
14. 15 dakika içerisinde 450 nm'de 620-690 nm referans dalga boyları kullanılarak okuma yapıldı.

Sonuçların Hesaplanması:

Kontrollerin absorbans değerleri üretici firmanın vermiş olduğu validite sınırları içerisinde ölçüldü. (Negatif kontroller > 0.60, pozitif kontrol < 0.20)

Cut-off değeri, negatif kontrollerin absorbanslarının ortalamasına, pozitif kontrol absorbansının eklenip ikiye bölünmesiyle bulundu.

Absorbans cut-off değerinden büyük sonuçlar negatif, eşit veya küçük sonuçlar pozitif olarak değerlendirildi.

3.2 HDV RNA ARAŞTIRILMASI

Serum örneklerinde HDV RNA varlığı Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Moleküler Tanı laboratuvarında, real-time RT-PCR (ABI-PRISM/7700 Sequence Detector, AJ Roboscreen GmbH, Germany) yöntemi kullanılarak araştırıldı.

Real-time PCR yönteminde amplifikasyon ve analiz birlikte yapılır. DNA boyları ya da floresan problemler gibi analiz için gerekli olan reaktifler PCR karışımına

amplifikasyondan önce eklenir. Veriler, amplifikasyon süresince aynı cihaz ile aynı tüp içerisinde toplanır. Örnek transferi, reaktif eklenmesi ve jel ayırımı gibi işlemlere gerek yoktur. Böylece kontamine olma riski büyük ölçüde azaltılmıştır. Hedef nükleik asit molekülleri ısı döngüleri kullanılarak artırılır. Her döngüde nükleik asit dizilerine özgü problemlerden elde edilen floresans değişimlerinin analiziyle reaksiyonlar değerlendirilir (45).

3.2.1 HDV RNA Ekstraksiyonu (RTP^R DNA/RNA Virus Mini Kit)

Kit içeriği ve hazırlık aşamaları:

1. Ekstraksiyon tüpleri içeriği (Toz halinde parçalama reaktiflerini içeriyor);
 - a. Carrier nükleik asit
 - b. Ekstraksiyon kontrol RNA'sı
 - c. Ekstraksiyon kontrol DNA'sı
2. Binding Solution
3. Elution Buffer R
4. Wash Buffer R1
5. Wash Buffer R2
6. Receiver tüpleri
7. Elution tüpleri
8. Spin filtreleri

Üretici firma tarafından verilen protokolde belirtildiği şekilde 50 ekstraksiyonluk Wash Buffer R1 şişesine 20 ml %99.80'lik etanol ilave edildi. 50 ekstraksiyonluk Wash Buffer R2 şişesine ise 48 ml %99.80'lik etanol eklendi.

Örneklerin Parçalanması: Örnek sayısı kadar içerisinde toz halinde parçalama reaktiflerini bulunduran ekstraksiyon tüpleri işaretlendi. Tüplere 200 µl distile su ve 200 µl örnek eklenip 2-3 saniye vortekslendi. Daha sonra su banyosunda 65 °C' de 15 dakika inkübe edildi.

DNA/RNA'ların filtrelere bağlanması: Örnek sayısı kadar spin filtresi receiver tüplerine yerleştirildi. Örnekler inkübatordan çıkarıldıktan sonra 400 µl binding solüsyon konuldu, vortekslendi. Daha sonra hazırlanan spin filtrelere aktarıldı, kapakları kapatıldı ve 10000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası receiver tüpleri atıldı ve spin filtreleri yeni receiver tüplerine yerleştirildi.

Spin filtrelerin ilk yıkaması: Yeni receiver tüplerine yerleştirilen spin filtrelerine 500 µl Wash Buffer R1 eklendi ve tüplerin kapakları kapatıldıktan sonra 10000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası receiver tüpleri yine atıldı ve filtreler yeni receiver tüplerine yerleştirildi.

Spin filtrelerin ikinci yıkaması: Spin filtrelerine 800 µl Wash Buffer R2 eklendi ve tüpler kapalı olarak 10000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.

Spin filtrelerden ethanol'ün uzaklaştırılması: Santrifüj sonrası spin filtreler çıkartılıp receiver tüpleri dikkatlice boşaltıldı ve tüplerin ağızları kurutma kağıtları ile silindi. Filtreler tekrar bu tüplere yerleştirilerek maksimum hızda 4 dakika santrifüj edildi.

DNA/RNA'ların filtrelerden elution tüplerinde toplanması: Son olarak spin filtreleri elution tüplerine yerleştirildi ve üzerlerine 70 °C' de ısıtılmış Elution Buffer R'den 60 µl eklendi, oda sıcaklığında 3 dakika bekletildikten sonra 10000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.

Elde edilen elution sıvısında RNA bulunduğu için ekstraksiyon sonrasındaki tüm işlemler elution tüpleri buz üzerinde tutularak yapıldı.

3.2.2 Kantitatif HDV RNA REAL-TİME PCR Amplifikasyonu (RoboGene^R HDV RNA Virus Kiti ile)

Kit içeriği ve hazırlık aşamaları:

1. HDV reagent mix (Liyofilize olup hedef bölgeye özgül primerleri ve TaqMan probunu içerir.)
2. HDV 2 x reaction mix (RT-PCR buffer, Mg-sülfat ve dNTP'leri içerir)
3. MgSO₄ (50mM)
4. PCR-grade water
5. 10 x Passive reference dye solution
6. SuperScriptTM III RT/Platinum^R Taq Mix (Kullanıncaya kadar -20 °C'de saklandı ve her çalışmada kullanmadan önce santrifüj edildi.)
7. Sample RNA strips (Örneklerin dağıtıldığı tüpler olup örnek sayısı kadar çıkarıldı.)
8. HDV control RNA strips (8 tane olup farklı miktarlarda plazmid DNA'sı içeren tüplerdir. Her çalışmada bir standart strip kullanıldı.)

Reaksiyon miksinin hazırlığı: Her bir örnek için toplam hacim 25 µl olacak şekilde buz üzerinde ependorf tüpünde aşağıdaki karışım hazırlanır.

PCR grade water	2.0 µl
10 x Passive reference dye solution	2.5 µl
2 x Reaction mix	12.5 µl
Mg-sulfate	1.0 µl
Reagent mix	1.0 µl
SuperScript TM III RT/Platinum ^R Taq Mix	1.0 µl
Ekstraksiyon ürünü	5.0 µl
Toplam hacim	25 µl

Ependorflar ABI PRISM 7700 SDS (Applied Biosystem) cihazına yerleştirilerek 59 °C'de 60 dakika revers transkripsiyon (RT) ve 95 °C'de 2 dakika hold sonrası 95 °C'de 15 sn denatürasyon ve 57 °C'de 01 sn bağlanma ve uzama 45 döngü şeklinde gerçekleştirildi.

Birbirine bağlı cihaz ve bilgisayardan oluşan bu sistem; test edilen kuyucuklara lazer kaynağından gönderilen lazer ışınlar kuyucuklarda bulunan floresanların uyarılmasını sağlamakta ve fiber optik kablolar kuyucuklardan yayılan floresanı toplayarak lens, filtre ve aynalardan oluşan sistem yardımıyla spectograph'a iletmektedir. Spectograph ise gelen ışığı dalga boyuna göre ayırarak CCD (charge-coupled device) kameraya aktarır. Cihaz ise kameradan aldığı floresan sinyallerine veri analiz algoritmalarını uygulayarak sonuç vermektedir.

4. BULGULAR

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Kan Bankasında 2007 yılının Ocak ve Şubat aylarında 4882 gönüllü kan donörü taranmıştır. Taramalar sonucunda 160 (%3.28) donörde HBsAg, 37 (%0.76) donörde anti-HCV, 8 (%0.16) donörde VDRL pozitif olarak saptanmıştır. Anti-HIV 1-2 pozitifliği, 7 (%0.14) donörde saptanmış olup bu serum örneklerinin RSHM'den doğrulama amacıyla yapılan WB test sonuçları negatif olarak bildirilmiştir (Tablo 5).

HBsAg pozitif 160 serum örneğinin 14'ünde (% 8.75) total anti-Delta antikorları pozitif bulunmuştur. Total anti-Delta antikorları pozitif örneklerin tümünde anti-HBe ve anti-HBc IgG antikorları pozitif olarak belirlenmiştir. Total anti-Delta antikorları pozitif bulunan 14 örneğin sadece 2 (%14.29)' sinde HDV RNA pozitif olarak saptanmıştır. Böylece tüm HBsAg pozitif donörler arasında HDV RNA pozitifliğinin %1.25 (2/160) olduğu belirlenmiştir. HBsAg pozitif bireylerdeki HDV göstergeleri Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 5: Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Kan Bankasındaki tarama sonuçları.

	2007 Ocak-Şubat (n=4882)	
	Sayı	Yüzde (%)
HBsAg	160	3.28
Anti-HCV	37	0.76
Anti-HIV ½*	7	0.14
VDRL	8	0.16

*RSHM'den WB test sonuçları negatif olarak bildirilmiştir.

Tablo 6: HBsAg pozitif donörlerde (n=160) HDV infeksiyon göstergelerinin yüzde dağılımları.

	Sayı	Yüzde (%)
Anti - Delta (+)	14/160	8.75
HDV-RNA (+)	2/160	1.25
HDV-RNA (+)*	2/14	14.29

*Anti-Delta pozitif 14 vakadaki oran

5. TARTIŞMA

Kan ve kan komponentlerinin transfüzyonu pek çok istenmeyen etkilere neden olmaktadır. Transfüzyon tıbbının temel hedefi bu olumsuz etkileri minimale indirmek ve transfüzyon güvenliğini, yani “güvenli kan”ı sağlamaktır. Günümüzde ayrıntılı değerlendirmelerle yapılan donör seçimi, son derece duyarlı yöntemler ile çalışan serolojik testler, kanın saklanması ile ilgili titiz uygulamalar, kanın lökositlerden arındırılması ve gerekli olduğu durumlarda ısıtılması gibi yöntemler transfüzyon güvenliğinde dev adımlar atılmasını sağlamıştır. Böylece infeksiyon/infeksiyon dışı pek çok istenmeyen etkinin önüne önemli ölçüde geçilebilmiştir. İnfeksiyon bulaş riskinin standart yöntemleri uygulayan gelişmiş ülkelerde çok azalmış olmasına rağmen, transfüzyon ile bulaşabilen infeksiyonlar halen güncelliğini korumaktadır (43).

Transfüzyon ile virüsler başta olmak üzere bakteriler, parazitler, riketsiyalar ve funguslar bulaşabilmektedir. Transfüzyonla bulaşan viral etkenlerden en önemlileri HBV, HCV, HIV 1-2 dir. Bunları CMV, EBV, HTLV 1-2, Parvovirüs B19 vb izler. Son yıllarda Hepatit G Virus, Transfüzyon Transmitted Virus, Human Herpes Virüs Tip 8, Multiple Sclerosis Related Virus ve Sen-V Virus gibi etkenler eklenmiştir. Transfüzyon ile bulaşabilen çok sayıda ve türde mikroorganizmanın varlığına rağmen tüm dünyada kan bankalarında rutin olarak sadece Hepatit B ve C, HIV, Sifilis ve bazı ülkelerde HTLV 1-2 ile Chagas hastalığı gibi sınırlı sayıda infeksiyon etkeni taranmaktadır. Ülkemizde yasal olarak kan ürünleri taramalarında EIA ile HBsAg, anti-HCV, anti-HIV 1-2 ve Sifilise yönelik VDRL/RPR testleri kullanılmaktadır (44).

Çalışmamızda Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Kan Bankasına başvuran gönüllü donörlerin HBV, HCV, HIV ve Sifilis için yapılan tarama test sonuçları %3.28, %0.76, %0, %0.16 olarak bulunmuştur. Ülkemizde kan donörlerinde yapılan çalışmalarda değişik oranlar elde edilmiştir. Gül ve arkadaşları donör taramalarında HBsAg, anti-HCV, anti-HIV testlerini MPEIA (AxSYM, ABBOTT, USA) yöntemiyle incelemiştir (46). Aynı çalışmada sifilis antikorları ise RPR (Omega, England) Lateks Agglütinasyon yöntemi ile saptanmıştır. Araştırmacılar tarama sonuçlarını sırasıyla %1.26, %0.24, %0 ve %0 olarak belirlemişlerdir (46). Dilek ve arkadaşları kan donörlerinde MPEIA (AxSYM, ABBOTT, USA) yöntemini kullanarak HBsAg, anti-HCV, anti-HIV pozitifliğini sırasıyla %2.55, %0.17 ve %0.036, sifilis antikorlarının pozitifliğini RPR (Acon, USA) testi ile %0.057 olarak bulmuşlardır (47). Değişik çalışmalardan

elde edilen farklı sonuçların nedeni; testlerin farklı laboratuvar çalışma koşullarında yapılmasına ve duyarlılıkları değişebilen farklı sistemlerin kullanılmasına bağlı olabilir (48). Ayrıca çalışmaların farklı bölgelerde yapılmış olması da farklı sonuçlara neden olabilir. Dilek ve arkadaşlarının farklı bölgelerden elde ettikleri sonuçlar Tablo 7’de verilmiştir (47).

Tablo 7: Bazı merkezlerdeki HBsAg, anti-HCV, anti-HIV, VDRL seropozitiflik oranları (Kaynak 47den alınmıştır).

Center	HBsAg	anti-HCV	anti-HIV	VDRL
Van (this study)	2.55%	0.17%	0.03%	0.057%
Ankara	2.3%	1.2%	0.5%	0.06%
Adana	4.52%	-	-	-
Konya	4.7%	0.25%	-	-
Diyarbakır	8.7%	0.7%	0.03%	0.6%
Afyon	4.3%	4.7%	-	-
Erzurum	4.5%	0.5%	-	-
İstanbul	3.13%	0.46%	0.66%	0.14%
Bursa	3.6%	0.07%	0%	0.002%
Trabzon	3.97%	0.82%	0%	0.48%
Çorum	3.82%	-	-	-
Malatya	5.16%	-	0%	-
Isparta	2.72%	1.31%	0.0022%	0.23%

Tüm tarama testlerine karşın kan ve kan ürünleri ile virus bulaş riski günümüzde halen az da olsa devam etmektedir. Gerek yöntemlerin duyarlılığı gibi testlere ait, gerekse pencere dönemleri gibi bu hastalıkların doğal seyirlerine ait çeşitli nedenlerle, rutin olarak taranan enfeksiyonlarda negatif çıkan test sonuçları kanın taranan enfeksiyonu bulaştırmayacağını %100 garantileyememektedir. Bu nedenle donör kanlarının güvenliği açısından pencere döneminin mümkün olan en kısa süreye indirilmesi için kan bankacılığı çalışmalarına NAT teknolojisi girmiştir. NAT’ın transfüzyon ile enfeksiyonun bulaşmasını engellemedeki rolü yanında infekte kişinin enfeksiyonun çok erken döneminde tanı almasını sağlaması da ayrı bir avantajdır. Ancak NAT yüksek maliyet, tam otomatize sistemler ve kalifiye eleman gerektirmesi gibi uygulamadaki güçlükleri nedeniyle sadece gelişmiş ülkelerde rutin kullanıma girmiştir. Ülkemizde NAT gibi yüksek maliyetli bir teknolojinin kan bankacılığına

girmesinin tartışılabilmesi için, bu verilerin ortaya konabileceği düzenlemelere ve çalışmalara gereksinim vardır (43, 44).

Viral etkenlerden HDV'nin bulaşması yardımcı virusu olan HBV gibi parenteraldır. Kan ve kan ürünleriyle geçiş olabilir. HBV'nin birlikteliğine zorunlu ihtiyaç göstermesi nedeniyle donörlerde HBsAg'nin taranması aynı zamanda HDV' nin bulaşmasını da engellemektedir. Ancak HBsAg testlerinin duyarlılığındaki problemler HDV'nin bulaşması için de risk oluşturabilir. Yine çok sayıda kan ve kan ürünleri transfüzyonu HDV bulaşmasında riski artıran önemli faktörlerden biridir (37).

HDV enfeksiyonu özellikle Balkan ülkeleri, eski Sovyet Cumhuriyetleri ve Türkiye olmak üzere tüm dünyada önemli bir halk sağlığı problemi olmayı sürdürmektedir (49). HDV, replikasyon için HBV'ye gereksinim duyan defektif bir RNA virüsüdür. HDV hem akut hem de kronik hepatite neden olurken, oluşturduğu klinik tablolar diğer virüslara kıyasla daha ağırdır. HDV enfeksiyonunda fulminan seyir ve kronikleşme sıktır (15). Bölgemizde hala yaygın ve ciddi bir sağlık problemi olması nedeniyle, HBsAg pozitifliği saptanan gönüllü kan donörlerinde HDV varlığını serolojik ve moleküler yöntemlerle araştırmayı amaçladık.

Bu çalışmada donasyon amacıyla Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Kan Bankasına başvuran bireylerde HBsAg pozitifliği saptanması durumunda total anti-Delta antikor pozitifliği araştırılmıştır. HBsAg pozitif donörlerde total anti-Delta antikor pozitifliği %8.75 oranında saptanmıştır.

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı kullanılarak yapılan başka bir çalışmada anti-Delta pozitifliği; asemptomatik HBsAg taşıyıcılarında %6, kronik aktif hepatit B hastalarında %27.50 olarak bulunmuştur (50). Van bölgesinde yapılan bir çalışmada asemptomatik HBsAg taşıyıcıları ve kronik hepatit B hastalarında total anti-Delta pozitifliği EIA (Guliana Diagnostica S.r.l., Italy) yöntemiyle sırasıyla %5, %16 olarak saptanmıştır (51). Yurt dışı çalışmaları da az gelişmiş ve kırsal alanlarda HDV enfeksiyonu prevalansının daha yüksek olduğunu göstermiştir. Flodgren ve arkadaşları Rusya'nın diğer bölgelerinden oldukça izole Samara bölgesinde radyoimmunopresipitasyon testi ile %39 oranında anti-Delta pozitifliği elde etmişlerdir (52). Hindistan'da yapılan bir çalışmada HBsAg pozitif akut viral hepatit, fulminan hepatit, kronik hepatit, siroz ve hepatosellüler karsinomlu gruplarda EIA yöntemi kullanılarak anti-Delta antikorlarının pozitifliği sırasıyla; %3.10, %20, %8.10, %15.20,

%33.30 olarak bulunmuştur (53). Inoue ve arkadaşları Moğolistan'da sağlıklı bireyler arasında EIA yöntemini kullanarak yaptıkları çalışmada %16.90 oranında anti-Delta antikor pozitifliği saptamışlardır (54). Arakawa ve arkadaşları karaciğer fonksiyon testleri normal olan vakaların serum örneklerinde EIA (Abott, Matsudo, Japan) yöntemi ile %8.50 oranında anti-Delta antikor pozitifliği bulmuşlardır (55). Bu meta-analizlerde farklı gruplar esas alındığından farklı sonuçlar elde edilmiştir. Ancak çalışma grubumuzu oluşturan HBsAg pozitif kan donörlerindeki total anti-Delta pozitiflik oranı (%8.75), inaktif HBsAg taşıyıcılarından elde edilen bulgularla uyumlu bulunmuştur.

HDV infeksiyonlarının laboratuvar tanısında serolojik ve virolojik tekniklerden yararlanılır. Klasik olarak en yaygın kullanılan gösterge total anti-Delta antikorudur; EIA ile araştırılan bu antikoru varlığı, etken ile temasın göstergesidir ve özellikle seroepidemiolojik çalışmalarda belirli bir grupta HDV ile temas sıklığının araştırılması amacıyla kullanılır (56). Akut ve kronik infeksiyonların ayırımında HDAg ve anti-Delta IgM araştırılması önerilmiş. Anti-Delta IgM HDV'ye bağlı karaciğer hasarının bir göstergesidir. Ancak etkenin alınmasından bir ay sonra anti-Delta IgM kaybolur ve anti-Delta IgG antikorları ortaya çıkar. Anti-Delta IgG düşük titrelerde 6 ay pozitifliğini sürdürür. Anti-Delta IgM antikorlarının kaybolması rezolusyonu, persistansı ise kronikleşmeye gidişi gösterir. Kronikleşme oranı yüksek olan koinfeksiyonun tanımlanmasında "anti-HBcIgM" kullanılan diğer bir göstergedir (23). Çalışmamızda total anti-Delta pozitif vakaların hiçbirinde anti-HBc IgM saptanmamıştır.

Çalışmamızda gönüllü kan donörleri arasında HBsAg ve total anti-Delta antikorları pozitif olan bireylerin serumlarında %14.29 oranında HDV RNA pozitifliği saptadık. Ayrıca çalışmamızda HDV RNA pozitifliği saptanan vakaların tüm HBsAg pozitif donörlerin %1.25'ini oluşturduğunu gösterdik. Sağlıklı gruplarda yapılan yurt dışı çalışmalarda bu oranlar %47.60, %40.60, %48.80 olarak saptanmıştır (54, 55, 57). HDV RNA ile anti-Delta antikorları arasındaki uyumun yurt dışı çalışmalarda bizim çalışmamızdan daha yüksek oranlarda olduğu gözlenmiştir. Ancak çalışmamızın sonucu, bölgemizde daha önce anti-Delta antikorları pozitif serumlarda yapılan başka bir çalışmadan elde edilen %12.40'lık HDV RNA pozitifliği ile paralellik göstermektedir (58).

Çalışmamıza benzer şekilde kan donörleri arasında yapılan çalışmalarda da birbirlerinden çok uzak olmayan sonuçlar elde edilmiştir. Moğolistan'da kan donörleri arasında %6.70 oranında HDV enfeksiyonu saptanmıştır (59). Doğanay ve arkadaşları kan donörleri arasında %2.70 oranında anti-Delta pozitifliği bulmuşlardır (60). Wang ve arkadaşları bizim çalışmamızda olduğu gibi gönüllü donörler arasından HBsAg taşıyıcılığı tespit edilenleri incelemişler ve %1.30 oranında HDV enfeksiyonu belirlemişlerdir (61).

Sonuç olarak bölgemizde HBV enfeksiyon prevalansının yüksek olması nedeniyle, HBsAg pozitif saptanan gönüllü kan donörlerinin aynı zamanda HDV enfeksiyonu yönünden de araştırılması uygun olacaktır. Bu taramanın, HDV enfeksiyonu yönünden endemik olan bölgemizde, sağlayacağı katkının önemi büyüktür. Böylece HDV ile enfekte vakaların daha erken tanınması sağlanabilir. Bu vakalarda serum örneklerinde serolojik yöntemler kullanılarak anti-Delta antikorunun saptanması güvenli bir tanı için yeterli olabilir. Ancak gerçek viremiyi, oldukça duyarlı bir yöntem olan real-time PCR yöntemi kullanılarak serumda HDV RNA'nın saptanmasıyla göstermek mümkündür. Gönüllü kan donörlerinde saptanan HBsAg taşıyıcılığıyla birlikte olabilecek HDV enfeksiyonlarına doğru tanı konulması ve viral replikasyonun gösterilmesi, bulaşın önlenmesi ile birlikte anti viral tedavinin başlanmasını ve izlenmesini böylece HDV'ye bağlı gelişebilecek karaciğer hasarının önlenmesini sağlayacaktır. Ülkemizde yüksek maliyet gerektiren moleküler tekniklerin rutin kullanımında "maliyet-yararlılık değerlendirmeleri" ayrıca tartışılması gereken bir konudur.

ÖZET

Kan transfüzyonu sırasında çoğu viral olmak üzere çeşitli infeksiyon etkenlerinin alıcıya bulaşması en sık karşılaşılan komplikasyonlarıdır. Günümüzde kan transfüzyonunun güvenilirliği donörlerin taranması sonucu infekte kan ürünlerinden kaçınılmasına bağlıdır. Hepatit göstergeleri (HBsAg, anti-HCV), donörlerden bakılan en önemli laboratuvar testleridir. HBsAg taşıyıcılığının tehlikeli yönlerinden biri HDV infeksiyon riskinin yüksek olmasıdır

HDV hastalık yapabilmek için HBsAg'ye gereksinim duymakta ve diğer hepatotrop virüslara göre daha ağır ve progresif karaciğer hastalıklarına neden olmaktadır. HDV infeksiyonu dünyada yaygın olarak karaciğer morbidite ve mortalitesinin önemli bir sebebidir. Kronik HDV infeksiyonlu hastalarda karaciğer hasarına HBV replikasyonu değil de HDV infeksiyonu temel neden olabilir.

Serum anti-Delta antikorlarının elde edilmesi gibi geleneksel yöntemler HDV infeksiyon tanısı için yeterlidir. Bununla beraber bu teknikler HDV infeksiyonunu daha doğru olarak tanımlamak ve tedavinin etkinliğini belirlemek için gerekli sensitivite ve spesifiteden yoksundur. Son zamanlarda HDV RNA'nın moleküler teknikler ile saptanması doğru tanı konulmasında artış sağlamıştır. HDV RNA'nın elde edilmesi asemptomatik hastalarda bile karaciğer hasarı ile güçlü ilişkilidir.

Bu çalışmada bölgemizde hala ciddi bir sağlık problemi olmaya devam eden HDV infeksiyonu, HBsAg pozitif gönüllü kan donörlerinde serolojik ve moleküler yöntemlerle araştırılmıştır.

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Kan Bankasına başvuran gönüllü kan donörleri arasında HBsAg pozitifliği saptanan 160 vakanın serum örneği EIA yöntemiyle total anti-Delta antikorları bakımından araştırılmıştır. Total anti-Delta antikor pozitif saptanan serum örneklerinde daha sonra real-time RT-PCR yöntemi kullanılarak HDV RNA pozitifliği araştırılmıştır.

Dicle üniversitesi Tıp Fakültesi Kan Merkezi'ne Ocak 2007 ve Şubat 2007 tarihleri arasında başvuran 4882 kan donöründe %3.28 (160/4882) oranında HBsAg pozitif olarak bulunmuştur. HBsAg pozitif 160 serum örneğinin 14'ünde (%8.75) total anti-Delta antikor pozitifliği saptanmıştır. Total anti-Delta antikor pozitif bulunan 14 örneğin sadece 2'sinde (%14.29) serumda HDV RNA pozitif olarak saptanmıştır.

Böylece tüm HBsAg pozitif donörler arasında HDV RNA pozitifliğinin %1.25 (2/160) olduğu belirlenmiştir.

HBsAg pozitifliği saptanan gönüllü kan donörlerinin aynı zamanda HDV enfeksiyonu yönünden de araştırılması uygun olacaktır. Bu taramanın, HDV enfeksiyonu yönünden endemik olan bölgemizde, sağlayacağı katkı ve yararın önemi büyüktür. Bu vakalarda serum örneklerinde serolojik yöntemler kullanılarak anti-Delta antikorunun saptanması güvenli bir tanı için yeterli olabilir. Bu vakalardaki gerçek viremi oldukça duyarlı bir yöntem olan real-time PCR yöntemi kullanılarak serumda HDV RNA'nın saptanmasıyla gösterilebilir.

SUMMARY

During the blood transfusion the contagious of various infection agents that are mostly viral to the recipients is the most often seen complications. Nowadays, the reliability of blood transfusion depends on escaping from the infected blood donors. Hepatitis markers (HBsAg, anti-HCV) are the most important tests which have to be done to donors. One of the most important problems in HBsAg carriers is the infection risks of HDV.

HDV needs HBsAg to cause disease and it causes more severe and progressive liver diseases compare to other hepatotropic viruses. In the world HDV infection is often an important cause of liver morbidity and mortality. Liver damage in patients with established chronic HDV infection may be caused by HDV infection not by HBV replication.

The traditional methods for the diagnosis of HDV infection, such as detection of serum anti-Delta antibodies, are sufficient for the clinical diagnosis of Delta infection. However, such techniques lack the sensitivity and specificity required to characterize the nature of HDV infection more accurately and to assess the efficacy of therapies. Recently, detection of HDV RNA by molecular techniques increased to obtain right diagnosis. Detection of HDV RNA was strongly associated with liver cell damage, even in asymptomatic cases.

In this study HDV infection, which is still a serious health problem in our region, is investigated within the HBsAg positive blood donors using serological and molecular methods.

Serum samples of 160 HBsAg positive blood donors, who applied to Blood Bank of University of Dicle, have been investigated in terms of total anti-Delta antibodies using EIA methods. Serum samples of anti-Delta positive cases were then examined for the presence of serum HDV RNA by real time RT-PCR method.

Serum HBsAg positivity was found in 3.28% of an increase (160/4882) of in 4882 blood donors who admitted to the Blood Bank of Dicle University between January 2007 and February 2007. Serum anti-Delta antibodies were detected in 8.75% (14/160) of HBsAg positive cases. Moreover, 2 cases, (%14.29, 2/14) that were

positive for anti-Delta antibody, had positive serum HDV RNA. HDV RNA positivity rate was 1.25% (2/160) among all HBsAg positive blood donors.

It is mandatory to examine the HBsAg positive blood donors for the possible presence of HDV infection. These screening is very important in our region, since HDV infection is still endemic in this part of Turkey. Serum anti-Delta antibodies detected by traditional serological methods are sufficient for a confident diagnosis. The real viremia in these cases can be best shown by using sensitive real time PCR method for the presence of serum HDV RNA.

KAYNAKLAR

1. Erhardt A, Gerlich W, Starke C, Ulrike W, Donner A, Sagir A, Heintges T, Haussinger D. Treatment of chronic hepatitis Delta with pegylated interferon- α 2b. *Liver International* 2006; 26: 805-810.
2. Farci P, Chessa L, Balestrieri C, Serra G, Lai ME. Treatment of chronic hepatitis. *Journal of Viral Hepatitis* 2007; 14: 58-63.
3. Baylan O, Güney Ç. B hepatitli hastaların ve asemptomatik HBsAg taşıyıcılarının korkulu rüyası: Delta Virus. *İnfeksiyon Dergisi* 2002; 16: 249-257.
4. Değertekin H. Dünyada ve Türkiye’de Hepatit Delta Virus enfeksiyonunun epidemiyolojisi. Değertekin H, Yalçın K eds. *Türkiye’de Hepatit Delta Virus enfeksiyonu dün, bugün, yarın*. 1. Baskı. Türkiye Karaciğer Araştırmaları Derneği, Diyarbakır. 2005: 36-44.
5. Modahl LE, Lai MM. Hepatitis Delta Virus: The molecular basis of laboratory diagnosis. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 2000; 37: 45–92.
6. Chao M. RNA recombination in Hepatitis Delta Virus: Implications regarding the abilities of mammalian RNA polymerases. *Virus Research* 2007; 127:208-215.
7. White OD, Fenner JF. *Medical Virology*. Academic Press 1994. s: 373-380.
8. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. *Manuel of Clinical Microbiology*. 8th ed. ASM Press, Washington. 2003: 1476.
9. Gudima S, He Y, Meier A, Chang J, Chen R, Jarnik M, Nicolas E, Bruss V, Taylor JM. Assembly of Hepatitis Delta Virus: Particle characterization, including the ability to infect primary human hepatocytes. *Journal of Virology* 2007; 81: 3608-3617.
10. Taylor JM. Hepatitis Delta Virus. *Virology* 2006; 344: 71-76.
11. Chadalavada DM, Sencak SE, Bevilacqua PC. The folding pathway of the genomic Hepatitis Delta Virus ribozyme is dominated by slow folding of the pseudoknots. *Journal of Molecular Biology* 2002; 317: 559-575.
12. Tanaka Y, Tagaya M, Hori T, Sakamoto T, Kurihara Y, Katahira M, Uesugi S. Cleavage reaction of HDV ribozymes in the presence of Mg^{2+} is accompanied by a conformational change. *Genes to Cells* 2002; 7: 567–579.

13. Chou HC, Hsieh TY, Sheu GT, Lai MC. Hepatitis Delta Antigen Mediates the Nuclear Import of Hepatitis Delta Virus RNA. *Journal of Virology* 1998; 72: 3684-3690.
14. Yeh TS, Lee YH. Assembly of Hepatitis Delta Virus particles: package of multimeric Hepatitis Delta Virus genomic RNA and role of phosphorylation. *Virology* 1998; 249: 12-20.
15. Bilgiç A, Özacar T. Hepatit B ve D virusları. Ustaçelebi Ş ed. *Temel ve Klinik Mikrobiology*. Güneş Kitabevi, Ankara. 1999: 878-880.
16. Heller T, Hofnagle JH. Denying the wolf Access to sheep's clothing *J Clin. Invest* 2003; 112: 319–321. doi:10.1172/JCI200319417.
17. Polish LB, Gallenher M, Fields HA, Hadler SC. Delta Hepatitis: Molecular biology and clinical and epidemiological features. *Clinical Microbiology Reviews* 1993; 6: 211-229.
18. Chang FL, Chen PJ, Tu SJ, Wang CJ, Chen DS. The large form of Hepatitis Delta antigen is crucial for assembly of Hepatitis Delta Virus. *Proc Natl. Acad Sci USA* 1991; 88: 8490-8494.
19. Şengezer T. Hepatit Delta Virus RNA'sının PCR ile belirlenmesi ve kronik Delta hepatitli Türk hastalarda HDV RNA genotiplendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara. 2000: 1-43.
20. Obaid Shakil A, Hadziyannis S, Hoofnagle JH, Di Bisceglie AM, Gerin JL, Casey JL, Geographic Distribution and Genetic Variability of Hepatitis Delta Virus Genotype I. *Virology* 1997; 234: 160-167.
21. Casey JL, Gerin JL, Genotype-Specific Complementation of Hepatitis Delta Virus RNA Replication by Hepatitis Delta antigen. *J. Virology* 1998; 72: 2806-2814.
22. Akkız H, Hepatoselüler Karsinomanın Moleküler Patogenezi. Değertekin H, Yalçın K, Türkiye'de Hepatit Delta Virüs Enfeksiyonu dünü, bu günü, yarını. Türkiye Karaciğer Araştırmaları Derneği Diyarbakır Şubesi Yayınları. 2005: 16-23.
23. Caymaz SÖ, Hepatit Delta Virus RNA'sının Saptanması ve Genotiplenmesi. Uzmanlık Tezi, İzmir. 2000: 1-104.
24. Göktaş P, Özsoy G, Dağ Z. Akut viral hepatit vakalarının etyolojik dağılımı. III. Viral Hepatit sempozyumu, Ankara 1996: 80.

25. Kurultay N, Ural S, Alicoşkun N ve ark. İzmir Atatürk Eğitim Hastanesi'nde 1993-1996 yılları arasında intaniye kliniğine yatırılan 230 akut viral hepatit olgusunun tiplendirilmesi. III. Ulusal Viral Hepatit Sempozyumu; Ankara 1996: 82.
26. Kılıç H, Arınç H, Şahin İ ve ark. Viral hepatit ön tanılı hasta serumlarında HAV, HBV, HCV, HDV, HEV seropravelansı. III. Ulusal Viral Hepatit Sempozyumu; Ankara 1996: 141
27. Güler Ö, Dündar İH, Saltoğlu N ve ark. Bölgemizde anti-Delta prevelansı ve HBV markırları ile ilişkisi. II. Ulusal Viral Hepatit Sempozyumu; Bildiri kitapçığı: Ankara 1994: 111.
28. Topalak O, Soytürk M, Okan G ve ark. DEÜTF Hepatoloji Kliniğinde HBV enfeksiyonlu hastalarda Delta enfeksiyon frekansı. 16. Ulusal Gastroenteroloji Haftası; Antalya 1999: 74.
29. Karakus R, Senol E, Cabadak H ve ark. HBsAg taşıyıcılarında HDV'nin seroprevalansı. V. Ulusal Hepatology Sempozyumu; Ankara 2000: 33.
30. Yıldırım Y, Yalçın K, Değertekin H. Güneydoğu Anadolu'da kronik HDV enfeksiyonları profili. IV. Ulusal Hepatoloji Kongresi; İstanbul 2001.
31. Kandemir O, Ersöz G, Oğuz K ve ark. Kronik hepatit B enfeksiyonlu hastalarda anti-Delta'nın sıklığı. Ulusal Hepatoloji Sempozyumu; İstanbul 2000: 40.
32. Ökten A, Çakaloğlu Y, Yalçın S ve ark. Hepatit-B virusu enfeksiyonunda Delta antikoru sıklığı ve klinik önemi. Klinik Gelişim 1988; 30.
33. Akarca U. Türkiye'de Hepatit B, C ve D'nun durumu. I. Doğu-Güneydoğu Anadolu Hepatogastroenteroloji Sempozyumu; Diyarbakır 2001; 24-36.
34. Görenek L, Coşkun O, Eyigün CP ve ark. Histopatolojik olarak araştırılan HBV enfeksiyonlu hastalarda Delta Virus antikor sıklığının araştırılması. Ulusal Viral Hepatit Sempozyumu; Ankara 2000: 26.
35. Koca S, Bahçecioğlu H, Ataser H ve ark. Elazığ'da yüksek hepatit D enfeksiyonu prevelansı. 4. Doğu-Güneydoğu Anadolu Hepatogastroenteroloji Sempozyumu; Elazığ 2004: 77.
36. Değertekin H, Yalçın K, Yakut M. The prevalence of Hepatitis Delta Virus infection in acute and chronic liver disease in Turkey: An analysis of clinical studies. Turkish Journal of Gastroenterology 2006: 17: 25-34.

37. Ponzetto A, Forzani B, Parravicini P.P, Hele C, Zanetti A, Rizetto M. Epidemiology of Hepatitis Delta Virus infection. *European Journal of Epidemiology* 1995; 1: 257-263.
38. Badur S. Hepatit A, B ve D Virusları. Ustaçelebi Ş, Abacıoğlu H, Badur S eds. Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji. Güneş Kitabevi, Ankara. 2004: 175-202.
39. Hadziyannis SJ. Delta Hepatitis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 1997; 12: 289:298.
40. Yalçın K. Hepatit Delta Virus enfeksiyonunda klinik özellikler ve tanı. Değertekin H, Yalçın K eds. Türkiye’de Hepatit Delta Virus enfeksiyonu dünü, bugünü, yarını. 1. Baskı. Türkiye Karaciğer Araştırmaları Derneği, Diyarbakır. 2005: 52-66.
41. Fiedler M, Lu M, Siegel F, Whipple J, Roggendorf M. Immunization of woodchucks (*Marmota monax*) with Hepatitis Delta Virus DNA Vaccine. *Vaccine* 2001; 20: 170-180.
42. Mauch C, Grimm C, Meckel S, Wands JR, Blum HE, Roggendorf M, Geissler M. Induction of cytotoxic T lymphocyte responses against Hepatitis Delta Virus antigens which protect against tumor formation in mice. *Vaccine* 2001; 20: 170-180.
43. Kabaş ZM. Anti-HCV negatif kan donörlerinde real-time PCR yöntemiyle HCV-RNA aranması ve sonuçların kan bankacılığı açısından öneminin tartışılması. Uzmanlık tezi, Bursa. 2007: 1-16.
44. Heper Y. Transfüzyonda mikrobiyolojik tarama testleri. *ANKEM Dergisi* 2207: 21: 146-152.
45. Wittwer CT, Kuskawa N, Real-Time PCR, Persing DH, Tenover FC, Versalovic J, Tang YW, Unger ER, Relman DA, White TJ. *Molecular Microbiology Diagnostic Principles and Practise*. ASM Press, Washington. 2004: 71.
46. Gül M, Çıragil P, Aral M, Doğramacı N. Gönüllü ve gönüllü olmayan kan donörlerinde HBV, HCV, HIV ve sifiliz tarama test sonuçlarının değerlendirilmesi. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi* 2006; 36: 35 – 39.
47. Dilek I, Demir C, Bay A, Akdeniz H, Öner AF. Seropositivity rates of HBsAg, anti-HCV, anti-HIV and VDRL in blood donors in Eastern Turkey. *Turkish Journal of Hematology* 2007; 24: 4-7.

48. Temiz H, Nergiz Ş, Özbek E, Gedik M, Meşe S, Gül K. Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Kan Merkezi'ne Başvuran Donörlerden Alınan Kanların HBsAg, Anti-HCV, Anti-HIV ve Sifiliz Yönünden Değerlendirilmesi. Biral Hepatit dergisi, 2004; 9: 166-169.
49. Yurdaydın C. Delta hepatitis in Turkey: Decreasing but not vanishing and still of concern. Turk J Gastroenterol 2006; 17: 74-5.
50. Çelen MK, Ayaz C, Hoşoğlu S, Geyik MF, Uluğ M. Anti-Hepatitis Delta Virus Seroprevalence and risk faktors in patients with hepatitis B in Southeast Turkey. Saudi Med J 2006; 27: 617-620.
51. Türkdoğan KM, Bozkurt H, Uygan İ, Tuncer İ, Irmak H, Buzgan T, Akdeniz H. Chronic Hepatitis Delta Virus infection in Van region of Eastern Turkey. Turk J Gastroenterol 2005; 16: 17-20.
52. Flodgren E, Bengtsson S, Knutsson M et al. Recent high incidence of fulminan Hepatitis in Samara, Russia: molecular analysis of prevailing Hepatitis B and D Virus strains. J Clin Microbiol 2000; 38: 3311-6
53. Chakraborty P, Kailash U, Jain A, Goyal R, Gupta RK, Das BC, Kar P. Seroprevalence of Hepatitis D Virus in patients with Hepatitis B Virus-related liver diseases. Indian J Medd Res 2005; 122: 254-257.
54. Inoue J, Takahashi M, Nishizawa T, Narantuya L, Sakuma M, Kagawa Y, Shimosegawa T, Okamoto H. High prevalence of Hepatitis Delta Virus infection detectable by enzyme immunoassay among apperantly healthy individuals in Mongolia. J Med Virol 2005; 76: 333-40.
55. Arakawa Y, Moriyama M, Taira M, Hayashi N, Tanaka N, Okubo H, Sugitani M, Arakawa Y. Molecular analysis of Hepatitis D Virus infection in Miyako Island, a small Japanese island. J Viral Hepat 2000; 7: 375-81.
56. Oymak S, Badur S. Hepatit Delta Virusu: Viroloji, tanı yöntemleri ve moleküler özellikleri. Değertekin H, Yalçın K (eds). Türkiye'de Hepatit Delta Virus enfeksiyonu dünü, bugünü, yarını. 1. Baskı. Türkiye Karaciğer Araştırmaları Derneği, Diyarbakır. 2005: 1-10.
57. Sakugawa H, Nakasone H, Kawakami Y, Adaniya H, Mizushima T, Nakayoshi T, Kinjo F, Saito A, Zukeran H, Miyagi Y, Yakabi S, Taira M, Kinoshita M, Yamakawa Y. Determination of Hepatitis Delta Virus HDV RNA in asymptomatic cases of HDV infection. Am J Gastroenterol 1997; 92: 2232-6.

- 58.**Ozekinci T, Atmaca S, Akpolat N, Temiz H, Arian E. Evaluation of the correlation between Hepatitis D Virus (HDV) RNA positivity and HDV antibodies. *Microbiol Bul* 2005; 39: 345-349.
- 59.**Tsatsralt-Od B, Takahashi M, Nishizawa T, Inoue J, Ulaankhuu D, Okamoto H. High prevalence of Hepatitis B, C and Delta Virus infections among blood donors in Mongolia. *Arch Virol* 2005; 150: 2513-28.
- 60.**Doğanay M, Patiroğlu T, Utaş C, Ozbakir O, Unal A, Utaş S, Aygen B, Yücesoy M. Comparison of HBsAg, anti-HCV and anti-Delta positivity in diverse groups. *Microbiol Bul* 1993; 27: 107-112.
- 61.**Wang SP, Ding H, Zhao OK. Studies on HDV and HCV infection in plasma donors with positive HBsAg. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue ZA Zhi* 1994; 28: 223-224.