



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



Osman YAŞAR

**TÜRKİYE'DE HEPATİT E VİRÜSÜ (HEV)
SEROPREVALANSININ YENİDEN
DEĞERLENDİRİLMESİ:
TİCARİ OLARAK KULLANILAN İKİ HEV TOTAL
ANTİKOR ELISA KİTİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

Osman YAŞAR

**DİSİPLİNERARASI TEMEL HEPATOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Yrd.Doç.Dr Senem Ceren ÖZEN KARATAYLI

DISİPLİNERARASI TEMEL HEPATOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

2017

ANKARA

2017

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TÜRKİYE'DE HEPATİT E VİRÜSÜ (HEV)
SEROPREVALANSININ YENİDEN
DEĞERLENDİRİLMESİ:
TİCARİ OLARAK KULLANILAN İKİ HEV TOTAL
ANTİKOR ELISA KİTİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

Osman YAŞAR

**DİSİPLİNLERARASI TEMEL HEPATOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün
14B0207001 proje numarası ile desteklenmiştir.**

**DANIŞMAN
Yrd.Doç.Dr Senem Ceren ÖZEN KARATAYLI**

**ANKARA
2017**

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Türkiye’de Hepatit E Virüsü (HEV) seroprevalansının yeniden değerlendirilmesi: Ticari olarak kullanılan iki HEV Total Antikor ELISA kitinin karşılaştırılması” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin

Adı Soyadı: Osman YAŞAR

Tarih: 13.09.2017

İmza:

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Disiplinlerarası Temel Hepatoloji Anabilim Dalında Osman YAŞAR tarafından hazırlanan “Türkiye’de Hepatit E Virüsü (HEV) seroprevalansının yeniden değerlendirilmesi: Ticari olarak kullanılan iki HEV total antikor ELISA kitinin karşılaştırılması” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 13.09.2017

Prof.Dr. A.Mithat BOZDAYI

Ankara Üniversitesi

Jüri Başkanı

Yrd.Doç.Dr. Senem Ceren ÖZEN

KARATAYLI

Ankara Üniversitesi

Üye

Prof.Dr. Kayhan ÇAĞLAR

Gazi Üniversitesi

Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza Unvanı

Adı ve Soyadı

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	viii
Çizelgeler	x
1. GİRİŞ	1
1.1 Hepatit E Virüsü (HEV) Tarihçesi	3
1.2 HEV'in Sınıflandırılması	5
1.3 HEV'in Morfolojik Özellikleri	6
1.4 HEV'in Epidemiyolojisi	7
1.5 HEV'in Genom Yapısı ve Genotipleri	14
1.6 HEV'in Klinik Açısından Önemi	16
1.7 HEV RNA'ya Yönelik Moleküler Tanı	18
2. GEREÇ VE YÖNTEM	19
2.1 Gereç	19
2.1.1 Gönüllü Olur Donör Formu	19
2.1.2 Kan Serum Örnekleri	20
2.1.3 HEV Total Antikor ELISA Kitleri	20
2.1.4 Primer ve Problar	20
2.1.5 HEV RNA Standartları	21
2.1.6 RNA İzolasyon Malzemeleri	22
2.1.7 cDNA Sentez Reaksiyon Malzemeleri	22
2.1.8 Gerçek Zamanlı (Real Time) PZR Malzemeleri	22
2.1.9 Kullanılan Kitler	22

2.1.10 Kullanılan Cihazlar	22
2.2 Yöntem	23
2.2.1 İndirekt ELISA Yöntemi	23
2.2.2 ELISA Hassasiyet Testi	25
2.2.3 RNA İzolasyonu	26
2.2.4 cDNA Sentez Reaksiyonu	26
2.2.5 Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR)	26
2.2.6 İstatiksel Analiz (Ki-kare testi)	27
3. BULGULAR	28
3.1 İndirekt ELISA Sonuçları	28
3.1.1 Dia.Pro HEV Total Antikor ELISA Sonuçları	29
3.1.2 Wantai HEV Total Antikor ELISA Sonuçları	29
3.1.3 Dia.Pro ve Wantai HEV Total Antikor ELISA Kitlerin Karşılaştırılması	30
3.2 Gönüllü Kan Donörlerinin Cinsiyet Dağılımı	31
3.3 Gönüllü Kan Donörlerinin Yaş Dağılımı	36
3.4 Dia.Pro ve Wantai HEV Total Antikor ELISA Kitleri Hassasiyet Testi	41
3.5 Gerçek zamanlı PZR sonuçları	42
4. TARTIŞMA	44
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	52
ÖZET	54
SUMMARY	56
KAYNAKLAR	58
ÖZGEÇMİŞ	65

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında Türkiye’de kan donörlerinden alınan serum örnekleri kullanılarak Hepatit E Virüsü (HEV) seroprevalansının yeniden değerlendirilmesi için ticari olarak kullanılan iki HEV total antikor ELISA kitinin karşılaştırılması, HEV kantitasyonu için yöntem geliştirilmesi ve HEV’in genotiplendirilmesi amaçlanmıştır.

Öncelikle tez konusunu seçerken isteklerimi göz önünde bulundurup bana çalışma esnasında ve sonunda her konuda yardımcı olan tez danışmanım Yrd.Doç.Dr. Senem Ceren Özen KARATAYLI’ya teşekkürlerimi sunarım. Bu çalışmada yardım talep ettiğim Mehtap KIZILPINAR, Esra YURDCU ve Güniz AŞUTLU’ya, Ankara’da faaliyet gösteren Algen Diagnostik firması çalışanları Şahmaran BAYSAL ve Haydar SAYILIR’a, Synevo Tıbbi Laboratuvarları çalışanlarına, bu zorlu tez sürecinde benden desteğini bir an için bile esirgemeyen Gazi Mustafa Kemal Devlet Hastanesi Merkez Laboratuvarı’nda çalışan Ayhan ŞAHİN, Halil SATIR başta olmak üzere değerli iş arkadaşlarıma, tüm eğitim hayatım boyunca benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen her zaman yanımda olan aileme ve sevgili eşim Zuhul YAŞAR’a, çalışma esnasında bütün yorgunluğumu unutturan kızım Zeynep Ela YAŞAR ve oğlum Metehan YAŞAR’a teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Ayrıca, bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü’nün 14B0207001 proje numarası ile desteklenmiştir.

SİMGELER VE KISALTMALAR

dH ₂ O	Distile su
µl	Mikrolitre
ml	Mililitre
mM	Milimolar
Anti-HEV IgG	HEV IgG Antikor
Anti-HEV IgM	HEV IgM Antikor
Anti-HEV IgA	HEV IgA Antikor
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
M	Molar
RNA	Ribonükleik Asit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
AOB	Açık Okuma Bölgesi
HAV	Hepatit A Virüsü
HEV	Hepatit E Virüsü
HBV	Hepatit B Virüsü
HCV	Hepatit C Virüsü
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
HRP	Horseradish Peroksidaz Enzimi
TMB	Tetra Metil Benzidinton
TOB	Translasyon Olmayan Bölge

ŞEKİLLER

Şekil 1.1 Hepatit E virüsünün endemik olarak görüldüğü bölgeler.	5
Şekil 1.2 HEV virion yapısı	6
Şekil 1.3 Dünya’da HEV yönünden endemik bölgeler ve Ülkelerin HEV seroprevalans oranları	8
Şekil 1.4 Dünyada HEV yönünden endemik bölgeler.	10
Şekil 1.5 HEV Genom Yapısı ve Açık Okuma Bölgeleri	15
Şekil 1.6 HEV genotiplerinin soyağacı.	16
Şekil 1.7 HEV enfeksiyonu gelişim süreci.	18
Şekil 2.1 İndirekt ELISA çalışma şeması.	23
Şekil 2.2 Dia.Pro ve Wantai HEV total antikor kitleri çalışma protokolü.	25
Şekil 3.1 Dia.Pro HEV total antikor ELISA sonuçları	28
Şekil 3.2 Wantai HEV total antikor ELISA sonuçları	28
Şekil 3.3 Farklı illerden toplanan serumlara göre HEV Seroprevalansı.	29
Şekil 3.4 Wantai ve Dia.Pro HEV total antikor kitlerinin illere göre sonuçları.	30
Şekil 3.5 Farklı illerden Toplam 2011 Kan Donörünün Cinsiyete Göre Dağılımı	31
Şekil 3.6 Ülkemizdeki 6 farklı ilden toplanan serumlara göre HEV total antikor pozitif örneklerin Cinsiyet Dağılımı	32
Şekil 3.7 Ankara ilindeki HEV Total Antikor Pozitif	33
Şekil 3.8 İzmir ilindeki HEV Total Antikor Pozitif Örneklerin	

Cinsiyet Dağılımı	33
Şekil 3.9 Kahramanmaraş ilindeki HEV Total Antikor Pozitif Örneklerin Cinsiyet Dağılımı	34
Şekil 3.10 Malatya ilindeki HEV Total Antikor Pozitif Örneklerin Cinsiyet Dağılımı	34
Şekil 3.11 Van ilindeki HEV Total Antikor Pozitif Örneklerin Cinsiyet Dağılımı	35
Şekil 3.12 Kayseri ilindeki HEV Total Antikor Pozitif Örneklerin Cinsiyet Dağılımı	35
Şekil 3.13 Ülkemizdeki 6 farklı ilden toplanan HEV Total Antikor Pozitif Örneklerin Yaşa Göre Dağılımı	37
Şekil 3.14 Ankara ilindeki HEV Total Antikor Pozitif Örneklerin Yaşa Göre Dağılımı	37
Şekil 3.15 İzmir ilindeki HEV Total Antikor Pozitif Örneklerin Yaşa Göre Dağılımı	38
Şekil 3.16 Kahramanmaraş ilindeki HEV Total Antikor Pozitif Örneklerin Yaşa Göre Dağılımı	38
Şekil 3.17 Malatya ilindeki HEV Total Antikor Pozitif Örneklerin Yaşa Göre Dağılımı	39
Şekil 3.18 Van ilindeki HEV Total Antikor Pozitif Örneklerin Yaşa Göre Dağılımı	39
Şekil 3.19 Kayseri ilindeki HEV Total Antikor Pozitif Örneklerin Yaşa Göre Dağılımı	40
Şekil 3.20 ELISA pozitif örnekler cinsiyet ve yaş genel karşılaştırma	41
Şekil 3.21 Dia.Pro ve Wantai ELISA Kitleri Hassasiyet Testi	42
Şekil 3.22 Gerçek zamanlı PZR optimizasyon	43

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1 Ülkelere göre HEV seroprevalansı	9
Çizelge 1.2 Türkiye’de günümüze kadar yapılmış HEV IgG seroprevalans çalışmaları	11
Çizelge 2.1 Kan donörleri genel durum	
Çizelge 2.2 Jothikumar ve ark. ları tarafından geliştirilen ve Garson ve ark. tarafından modifiye edilen AOB3 korunmuş dizisine ait primer prob dizileri.	21
Çizelge 2.3 GAPDH Primer ve Prob	21
Çizelge 2.4 Real time PZR protokolü	27
Çizelge 3.1 Dia.Pro ve Wantai HEV total antikor ELISA Kitlerinin Karşılaştırılması	29
Çizelge 3.2 Ülkemizdeki 6 farklı ilden toplanan serumlara göre HEV seroprevalans	31
Çizelge 3.3 İllere göre HEV Total Antikor Pozitif Örneklerin Cinsiyet Dağılımı	32
Çizelge 3.4 Türkiye Genelinde ve İllere göre HEV Total Antikor Pozitif Örneklerin Yaşa Göre Dağılımı	36

1. GİRİŞ

Hepatit E virüsü (HEV) *Hepeviridae* ailesi, *Hepevirus* cinsinde sınıflandırılan, pozitif yüklü ve tek zincirli bir RNA'ya sahip olan zarfsız, ikozahedral protein yapısında kapsidli bir virüstür (Riccoa ve ark., 2016, Hartl ve ark., 2016). HEV günümüzde gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde karaciğer enfeksiyonuna yol açan hatta gelişmekte ve sağlık bilgisi yönünden zayıf Asya, Orta Doğu ve Kuzey Afrika ülkelerinde salgına yol açan bir virüs tipidir.

Dünya genelinde özellikle tropikal ve subtropikal ülkelerde içme sularının kanalizasyon atıkları ile kirlenmesi sonucu salgınlara neden olmaktadır (Aggarwal ve ark.,2009, Browne ve ark., 2015). Kanalizasyon sistemlerinin içme sularını kirletmemesi için gelişmiş bir teknolojiye ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle HEV salgınları gelişmemiş ve gelişmekte olan ülkelerde, gelişmiş ülkelere nazaran daha yüksek oranlarda görüldüğü gösterilmiştir (Aggarwal ve ark., 2009).

Daha önceki yıllarda HEV seroprevalansı saptanması amacıyla ülkemizde yapılan çalışmalarda farklı bölgelerde farklı anti-HEV IgG pozitifliği gösterilmiştir. Bu farklılığın sebebi kişisel sağlık bilgilerindeki farklılık, içme suyu kaynaklarındaki kirlilik veya gelişmemiş kanalizasyon sistemleri olarak gösterilse de kullanılan serolojik kitlerin farklı olması, farklı hassasiyete sahip olmasının da bu farklılıklara neden olabilecek önemli etkenlerden biri olduğu uluslararası çalışmalarda gösterilmiştir (Bendall ve ark.,2010). Buna göre ilk olarak İngiltere'de yapılan bir çalışmada toplam 500 kan vericisi serumunda iki farklı ticari kitin karşılaştırılarak anti-HEV IgG seroprevalansı değerlendirilmiştir (Bendall ve ark.,2010). Bu çalışma, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından standart olarak belirlenmiş serumlar kullanılarak Wantai kitinin dünyada yaygın olarak kullanılan kitlerden biri olan GeneLabs kitine göre 10 kat daha duyarlı olduğunu ve post enfeksiyondan çok uzun süre sonra bile enfekte olmuş bireyleri belirlediğini göstermiştir. Ayrıca her iki kitin

sonuçları karşılaştırıldığında seroprevalans Wantai kiti ile %16,2 bulunurken diğer kit ile pozitiflik oranı %3,6 bulunmuştur (Bendall ve ark.,2010).

Bu çalışmayı yine aynı kit ile farklı ticari kitleri karşılaştıran çalışmalar takip etmiş ve daha önce belirlenmiş durumdaki seroprevalans yüzdeleri anlamlı şekilde artış göstermiştir (Mansuy ve ark.,2008 ve Mansuy ve ark., 2011 ve Park ve ark., 2012). Farklı ticari kitlerin duyarlılıklarının karşılaştırılması çalışmalarında Wantai kitinin daha duyarlı bulunmasının önemli nedeninin HEV genomunda yüksek derecede korunmuş olan 2 nolu açık okuma bölgesinden (AOB2) eksprese olan rekombinant kapsid antijeninin kullanılıyor olmasıdır. Bu konuyla ilgili Ma ve arkadaşlarının Journal of Medical Virology 2009 yılında yaptıkları çalışmada HEV genotip 1 ve genotip 4'ten 18 AOB2 ve AOB3'ten elde edilen protein parçacıkları ile HEV IgM ve IgG kullanarak EIA (enzyme-immunoassay) yöntemi uygulanmıştır. Sonuç olarak AOB3 antijenlerinin elde edildiği genotipe daha iyi bağlandığı gösterilirken, AOB2 antijenleri için genotipik farklılık gözlenmemiştir. Bu çalışmanın sonucu AOB2 antijenlerinin AOB3 antijenlerine göre ELISA çalışmaları için daha duyarlı olduğu gösterilmiştir (Ma ve ark., 2010).

Ülkemizde daha önceki yıllarda yapılmış durumdaki HEV seroprevalans çalışmalarının sonuçları bölgelere göre farklılık barındırmaktadır. (Thomas ve ark., 1993, Badur ve ark., 1995, Olcay ve ark., 2000). Bu farklılığın sebebinin kullanılan ticari anti-HEV IgG kitlerinden mi, yoksa bölgelerdeki kişisel sağlık bilgisi farklılıklarından mı kaynaklandığı tam olarak bilinmemektedir. Bu nedenle ülkemizdeki bu bilgi karışıklığına son vermek amacıyla ülkemizde yaygın olarak kullanılan İtalyan Dia.Pro firmasına ait bir HEV total antikor ticari kiti ile güncel bilimsel veriler ışığında geliştirilen ve uluslararası olarak yüksek hassasiyeti yapılan çalışmalar ile gösterilmiş, ülkemizde daha önce HEV seroprevalansı belirlenmesi amacıyla kullanılmamış Çin Wantai firmasına ait HEV total antikor ticari kitinin ALISEI tam otomatik ELISA cihazı kullanılarak karşılaştırılmasının yapılması amaçlanmıştır.

Bu çalışmada daha önceki yıllarda birçok defa yapılan ve çoğunlukla tek ilden toplanan serumlar kullanılarak yine tek bir ticari kit ile yapılan çalışmaların aksine ülkemizin 4 farklı bölgesinden olmak üzere 6 ilden toplanan serumlar 2 farklı ticari kit kullanılarak karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi ve ülkemizin HEV seroprevalansına ait literatür bilgilerinin güncellenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada ayrıca ülkemizde ilk defa HEV genotipleme çalışması yapılması amacıyla anti HEV pozitif bulunan tüm örnekler için HEV RNA saptaması yapılmıştır.

1.1. Hepatit E virüsü (HEV) Tarihçesi

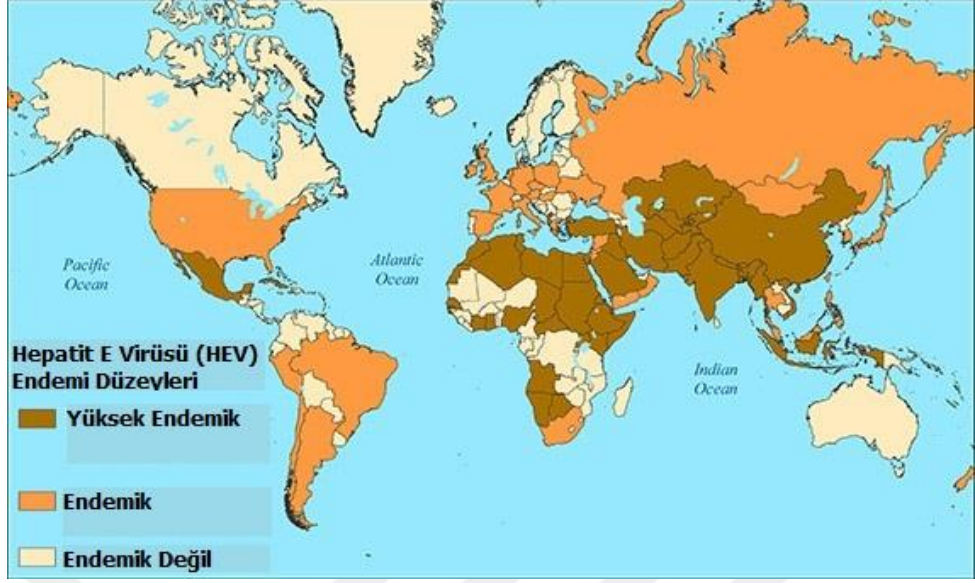
HEV 1990'lı yıllardan sonra daha iyi anlaşılmış ve serolojik testlerdeki bilimsel ve teknolojik gelişmeler sayesinde üzerine yoğun çalışmalar yapılmaya başlansa da tarihimizdeki bir enfeksiyon etkeni olarak ilk fark edilmesi sekizinci yüzyıla kadar gitmektedir. (Bradley, 1995) Belgelendirilmiş olarak tarihi belgelere yansımaları ise ilk defa 1794 yılında Almanya'nın güneybatısında kurulmuş olan Palatinate Hükümdarlığında bir salgın görülmesiyle olmuştur (Aggarwal, 2011). Hepatit A (HAV) ve Hepatit B (HBV) virüslerinin 1970 yılında tespit edilmesinden sonra, bu virüslerle alakası olmayan vakalar için A-Değil ve B-değil gibi isimlendirmeler kullanılmaya başlanılmıştır. 1974 yılında "non-A ve non-B" virüsü terimlerinin ortaya çıkmasından sonra, bu grupta birbirinden farklı iki virüsün daha olduğu yapılan çalışmalar sonucu anlaşılmıştır. Bunun üzerine 1978 yılında Hindistan'daki HAV ve HBV kaynaklı olmayan salgın sonrasında çalışmalar yoğunlaşmıştır. (Bradley, 1995) Bu çalışmalarda, "non-A ve non-B" virüslerinden birinin HBV'ye benzer özellikler taşıdığı ve kan yoluyla bulaştığı belirlenmiştir. Daha sonra bu virüs hepatit C virüsü (HCV) olarak isimlendirilmiştir. (Aggarwal, 2011) Diğer tanımlanamayan virüsün ise HAV'a benzer şekilde su ve su ürünleri ile bulaştığı anlaşılmıştır. Bu nedenle bu virüs enterik yolla bulaşan hepatit etkeni olarak kabul edilmiş ve hepatit E virüsü (HEV) olarak isimlendirilmiştir.

Yakın tarihimizde epidemik salgın ilk olarak 1955 yılında Hindistan'ın Yeni Delhi bölgesinde görülmüş ve yaklaşık 30 bin insanın ölmesi ile sonuçlanmış büyük bir hepatit salgınıdır. (Viswanathan, 1957) Bundan yaklaşık 20 yıl sonra yine salgın

olarak 1978 yılında Pakistan, Hindistan ve Çin'in arasında kalan Kaşmir olarak adlandırılan dağlık bir bölgede görülmüştür. Bu salgında yaklaşık 52 bin vaka tespit edilmiş ve bunların yaklaşık 1700 kadarı ölümlle sonuçlanmıştır. (Khuroo, 2011) Bu salgınlardan sonra yapılan çalışmalarda izole edilen örneklerde ne HBV ne de HAV serolojik belirteçleri bulunamamıştır. Bu sonuçlar bilim insanlarını HCV den farklı ama HAV ile benzer özellikleri olan başka bir virüs arayışına sürüklemiştir. Bu olaylardan yaklaşık 10 yıl sonra salgının etkeninin hepatit E virüsü olduğu anlaşılmıştır. (Khuroo, 2011)

HEV ilk olarak 1983 yılında Balayan ve ark., (1983) tarafından yayınlanan makalede tanımlanmıştır. Afganistan'daki non-A non-B hepatiti salgını esnasında hasta kişilerin dışkılarından alınan örnekler ile bu örnekler kullanılarak oral yolla enfekte sağlıklı kişilerde yine aynı belirtilerin görülmesi sonucu hepatit E virüsünün oral-fekal yolla bulaştığı anlaşılmıştır. 1990 yılında Reyes ve arkadaşları daha önceden enfekte edilmiş maymunlardan Hepatit E virüsüne ait bir genin bir kısmını klonlamayı başarmışlardır (Reyes ve ark., 1990). HEV'in moleküler yapısı ve tam genom diziliminin 1991 yılında Tam ve ark., tarafından yapılan çalışmada tanımlanmasından sonra diğer hepatit virüslerinden farkları tam olarak ortaya çıkarılmıştır.

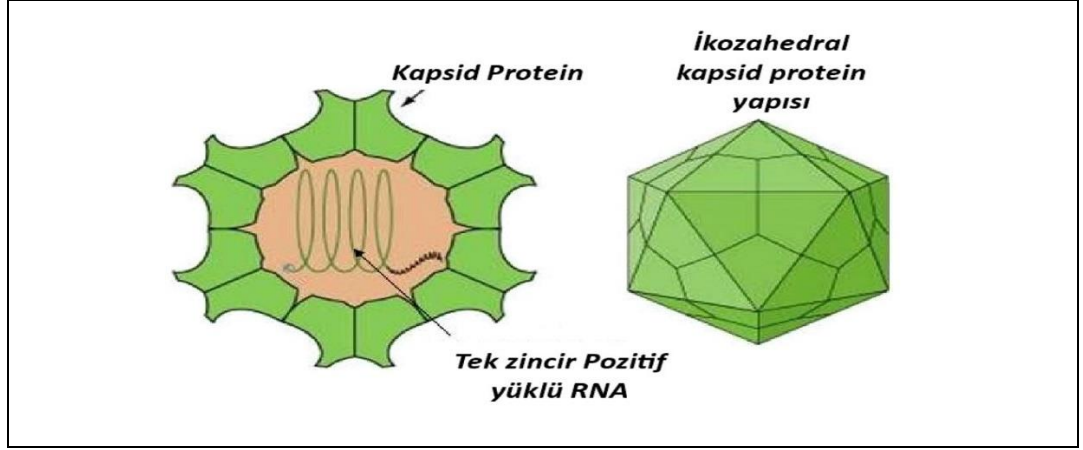
Hepatit E virüs enfeksiyonları kişisel hijyene dikkat edilmeyen, yetersiz sanitasyon ve kanalizasyon ile içme sularının birbirine karıştığı gelişmekte olan ülkelerde yaygın olarak görülmektedir (Şekil 1.1). Geçmişte gelişmiş ülkelerde HEV kaynaklı bir salgının görülme durumunun çok düşük bir olasılık olduğu ve sadece virüsün çok yaygın olduğu gelişmekte olan ülkelere yapılan seyahatler sonrası bulaşma olabileceği düşünülmektedir. Halbuki bu virüsün gelişmiş ülkelerde bir salgına yol açması çokta düşünüldüğü kadar uzak bir ihtimal değildir. (Teo, 2012)



Şekil 1.1 Hepatit E virüsünün endemik olarak görüldüğü bölgeler. (<https://www.cdc.gov/hepatitis/hev/hevfaq.htm> web sitesinden alınmıştır. Erişim tarihi: 15/01/2017.)

1.2. Hepatit E virüsü (HEV) Sınıflandırılması

Hepatit E virüsü (HEV) 27-34 nm uzunluğunda, zarfsız, silindirik, ikozahedral nükleokapsidli ve yaklaşık olarak 7200 baz uzunluğunda, pozitif polariteli tek zincirli bir RNA virüsüdür (Şekil 1.2). (Riccoa ve ark., 2016) HEV ilk tanımlandığı zamanlarda morfolojik yönden benzer özellikleri nedeniyle Caliciviruses grubuna dahil edilmiş olsa da günümüzde genotipindeki kendine özgü özellikleri nedeniyle Hepeviridae ailesine dahil edilmiştir ve bu ailedeki Hepevirus cinsi içinde bulunmaktadır (Hartl ve ark., 2016). HEV hepatit A virüsü gibi bir zarfsız virüs olmakla beraber, kapsidlerinin dışında bir zarf oluşuma sahip hepatit B, C, D virüslerinden farklıdır.



Şekil 1.2 HEV virion yapısı (http://viralzone.expasy.org/714?outline=all_by_protein).

Erişim tarihi: 15/03/2017.

Hepatit E virüsünün toplam beş farklı genotipi ve yalnızca bir serotipi bulunmaktadır. (Okamoto, 2007) Bu genotiplerden yalnızca 1 ve 2 insanda enfeksiyona neden olurken, 3 ve 4 hem insanda hem de hayvanlarda enfeksiyona neden olmaktadır. Kuşları hedef alan genotip 5 ise yalnızca kuşlarda görülmekte ve insanlarda enfeksiyon yapmamaktadır. Bu 5 genotipten 4 tanesi insanlarda enfeksiyon yapmasına rağmen, insanlarda sadece tek bir serotip bulunmaktadır. (Okamoto, 2007)

1.3. Hepatit E virüsü (HEV) Morfolojisi

Normalde hepatit E virüsleri zarflanmamış, küresel şekilli parçacıklardır. Virionun, yaklaşık 27-34 nm çapında 180 kopyadan oluştuğu düşünülmektedir. İnsan dışkı örneklerinin boyama yapılarak elde edilen elektron mikroskopisi görüntülerinde HEV çapının yaklaşık 32 nm olduğunu gösterilmiştir (Guu ve ark., 2009). Virionun yüzeyinde, Norovirüs'lerde görünenden biraz daha belirgin olan sivri uçlar bulunur ve hepatit A virüsünün pürüzsüz, özelliksiz yüzeyinden açıkça farklıdır. Bununla birlikte, tek başına morfolojiye dayanan bir metot kullanarak hepatit E virüsünü, dışkıda bulunan diğer küçük küresel insan bağırsak florası virüslerinden güvenilir şekilde ayırt etmek oldukça zordur. HEV parçacıklarının yüzey yoğunluğu 1,35 - 1,40 g / cm³'tür (Guu ve ark., 2009).

1.4. Hepatit E virüsü (HEV) Epidemiyolojisi

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre yılda yaklaşık olarak 20 milyon HEV kaynaklı enfeksiyon görülmektedir. Bu enfeksiyonlardan 3,3 milyon kişide enfeksiyona bağlı semptomlar görülmektedir ve sonuç olarak hepatit E virüsüne bağlı olarak 56.600 kişide ölüm gerçekleşmektedir (Rein ve ark., 2012 ve Lozano ve ark., 2012). HEV enfeksiyonları çoğunlukla kendi kendine iyileşen ve asemptomatik olarak görülmesine rağmen, nadiren akut karaciğer yetmezliğine sebep olan enfeksiyonlardır.

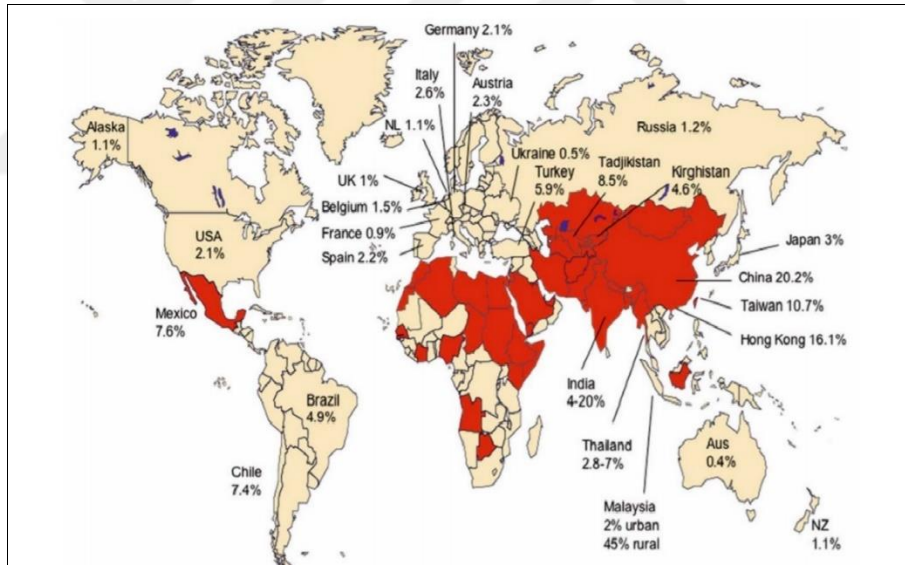
Hepatit E virüsünün, ilk tanımlanan klasik bulaş yolu fekal-oral yol olup, endemik bölgelerde görülen salgınlar ve sporadik enfeksiyonlar HEV ile kontamine suların kaynaklanmaktadır. Kişiden kişiye bulaş, muhtemelen kötü hijyen koşullarından kaynaklanan ve dışkı ile kontamine eller ve eşyalarla gerçekleşen fekal-oral mekanizmaya dayanmaktadır.

Hepatit E virüsünün diğer bulaş yolu ise, özellikle endemik olmayan gelişmiş ülkelerde gerçekleşen gıda kaynaklı bulaştır. Bu tip bulaş, HEV ile enfekte hayvanların (geyik, evcil domuzlar, kümes hayvanları vb.), iyi pişmemiş etlerinin tüketilmesiyle gerçekleşir. Daha önceleri, gelişmiş ülkelerde saptanan sporadik HEV olgularının, endemik bölgelere seyahat ile ilişkili olduğu düşünülürken, bu ülkelerde domuzlarda HEV varlığının saptanması ve insan ile domuz tiplerinin genetik benzerlik göstermesi, enfeksiyonların zoonotik olduğunu ortaya koymuştur.

Hastalık daha çok genç ve orta yaş (15-40 yaş) grubunda görülmekte, çocuk ve yaşlılarda daha nadir rastlanmaktadır (Balayan, 1997). Epidemiler sırasında semptomatik hastalık çocuklarda sık görülmemektedir. Bunun nedeni çocukların enfeksiyondan seçici olarak korunması değil, bu yaş grubunda daha hafif bir karaciğer hasarının meydana gelmesidir (Aggarwal ve ark.,2009). Semptomatik hastalık, ergen ve genç erişkinlerde belirgin olarak baskındır. Yapılan çalışmalar, HEV seropozitifliğinin yaşla birlikte arttığını göstermektedir. HEV enfeksiyonunun cinsiyetler arasındaki dağılımı ile ilgili veriler, bu enfeksiyonun belirli bir cinsiyette

yoğunlaştığını kanıtlamak için yetersizdir. Ancak bazı yayınlarda, erkeklerin iş ve sosyal yaşamda daha aktif olmaları nedeniyle, bu enfeksiyona kadınlardan daha fazla yakalandıkları belirtilmektedir (Aggarwal ve ark.,2009).

Hepatit E virüsü özellikle sosyoekonomik yönden ve kişisel hijyen yönünden zayıf durumda olan birçok tropikal ve subtropikal ülkelerde görülmektedir (Aggarwal ve ark.,2009). Hindistan başta olmak üzere, Sudan, Somali, Etiyopya gibi Güney Afrika ülkeleri, Tacikistan, Meksika, Çin gibi ülkelerde düşük ekonomik durum ve kişisel hijyen nedeniyle, aynı zamanda yetersiz altyapı nedeniyle kanalizasyon sularının içme sularına karışması nedeniyle bu ülkelerde birçok defa salgınlar meydana gelmiştir. (Browne ve ark., 2015) Yapılan diğer bir çalışmada HEV enfeksiyonunun Asya, Afrika ve Latin Amerika'nın büyük bir bölümünde endemik olduğu gösterilmiştir (Şekil 1.3).



Şekil 1.3 Dünya’da HEV yönünden endemik bölgeler ve ülkelerin HEV seroprevalans oranları (Chandra ve ark.,2008)

HEV için epidemiyolojik dağılım profil yönünden 2 gruba ayrılır. Birincisi, dünyada büyük salgınlara neden olduğu ve seroprevalansının yüksek olduğu gelişmekte olan ülkelerde görülen profildir (Aggarwal ve ark., 2009). Bu birinci profile çoğunlukla HEV genotip 1 tarafından kaynaklıdır ve hamilelerde, çocuklarda yüksek oranda enfeksiyona ve ölüme neden olur. İkincisi ise, daha çok

gelişmiş ülkelerde küçük bölgelerde görülen seroprevalansı düşük ve sporadik bulgular içeren tiptir. Bu profil yüksek oranda genotip 3 HEV kaynaklıdır ve düşük oranda enfeksiyona neden olmakta, hatta çoğu durumda herhangi bir semptomaya neden olamamaktadır. (Teshale ve ark., 2011) Çizelge 1.1’de gösterilen HEV’in yüksek salgına neden olduğu (akut hepatit olguları >%25) bölgeler, Orta Doğu, Orta ve Güneydoğu Asya, Kuzey ve Orta Afrika ve Meksika; düşük oranda salgına neden (akut hepatit olguları <%25) olduğu bölgeler ise Avrupa, Kuzey ve Güney Amerika ve Kuzeydoğu Asya’dır (Krush ve ark., 2013 ve Kamar ve ark., 2014).

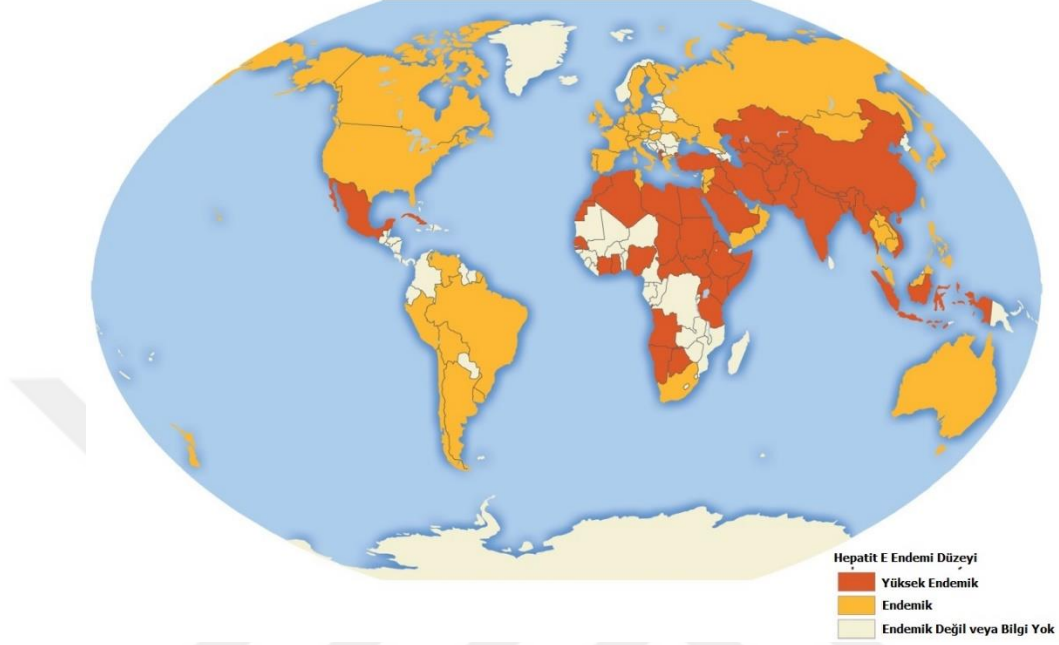
Çizelge 1.1 Ülkelere göre HEV seroprevalansı

(www.who.int/immunization/sage/meetings/2014/october/1HEV_burden_paper_final_03_Oct_14_yellow_book.pdf) Erişim tarihi: 15.05.2017

Bölge	Ülke	Özellikler
Kuzey Amerika, Avrupa, Japonya, Avustralya	ABD, Kanada	Çoğunlukla genotip 3 Seroprevalans %15-25 Salgın yok İmmün süpresiflerde kronik enfeksiyon
	Avrupa	Çoğunlukla genotip 3 Seroprevalans %4-52 Sıklıkla sporadik hastalıklar Organ transplant (OT) alıcılarında kronik enfeksiyon OT alıcılarında mortalite %4-9 Genel hastalık oranı düşük
	Japonya	Çoğunlukla genotip 3 Seroprevalans %2-20 Az sayıda gıda kaynaklı salgın
Latin Amerika ve Karayipler	Meksika, Brezilya, Venezuela, Uruguay, Küba	Genotip 1, 2, 3 Seroprevalans %1-16 Genotip 2 ile bildirilen ilk salgın Meksika’da
Kuzey Afrika ve Orta Doğu	Mısır, Libya, Fas, Irak, İran	Çoğunlukla genotip 1 Seroprevalans %1-58 Gebelerde hastalık nadir Mısır, Libya, Irak ve Fas’da salgınlar
Sahra-altı Afrika	Uganda, Güney Sudan, Kenya	Baskın olarak genotip 1 Su kaynaklı salgınlar yaygın Salgınlar göçebelerde sık Gebe kadınlarda yüksek mortalite
Güney Asya	Hindistan, Pakistan, Bangladeş, Nepal, Bhutan, Sri Lanka, Afganistan	Genotip 1 Seroprevalans %10-40 Gebe kadınlarda ve karaciğer hastalığı olanlarda yüksek mortalite Yüksek düşük oranı (%35-90) Su kaynaklı salgınlar yaygın Kronik enfeksiyon bildirilmemiş
Orta ve Doğu Asya		Baskın olarak genotip 1 Seroprevalans %0.6-40 Salgınlar nadir
Güneydoğu Asya		Genotip 1, 3 ve 4 Seroprevalans %0-12 Endonezya, Myanmar ve Vietnam’da su kaynaklı salgınlar

Ülkemizdeki durum ise Hastalık Kontrol ve Korunma merkezinin 2016 yılında yayınladığı bilgilere göre yüksek endemik bölgeler arasında gösterilmektedir.

(http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/70513/1/WHO_IVB_10.14_eng.pdf) Erişim Tarihi: 01.02.2017 (şekil1.4)



şekil 1.4 Dünyada HEV yönünden endemik bölgeler. (Hastalık Kontrol ve Korunma merkezinin 2016 yılında yayınladığı bildiriden uyarlanmıştır.) (http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/70513/1/WHO_IVB_10.14_eng.pdf) Erişim Tarihi: 01.02.2017

Ülkemizde HEV seropozitifliği yönünden yapılan ilk tarama 1993 yılında Thomas ve ark. tarafından ve farklı bölgelerden toplanan örnekler ile yapılmıştır. Bu çalışmada toplam 1350 örnek toplanmış ve bu örnekler kullanılarak yapılan HEV seroprevalans araştırmasında seropozitiflik %5,9 çıkmıştır. Çizelge 1.2’de bu çalışmaya benzer yine ülkemizin farklı bölgelerinden toplanan örnekler kullanılarak yapılan çalışmalarda birbirinden çok farklı seropozitiflik değerleri gösterilmiştir (Thomas ve ark., 1993).

Çizelge 1.2 Türkiye’de günümüze kadar yapılmış HEV IgG seroprevalans çalışmaları

Araştırmacı	Yıl	İl	Çalışma grubu	Örnek Sayısı	HEV- Seroprevalans (%)
Thomas ve ark.	1993	İstanbul Aydın Trabzon Adana	Erişkin	1350	5,9
Köksal ve ark.	1994	Trabzon	NANB Hastası	53	73
Gündeş ve ark.	1994	İstanbul	Çocuk	94	0
Gündeş ve ark.	1994	İstanbul	Sağlıklı Kişiler	100	6
Gündeş ve ark.	1994	İstanbul	Hepatit hastası	40	6,1
Gündeş ve ark.	1994	İstanbul	Diyaliz Hastası	40	5
Mıstık ve ark.	1994	Bursa	Kan donörü	66	9,1
Erdurak ve ark.	1994	Adana	Sağlıklı Kişiler	100	7
Taşyaran ve ark.	1994	Erzurum	Çocuk	180	6,1
			Sağlıklı Kişiler	180	10,1
Özacar ve ark.	1994	İzmir	Sağlık personeli	112	3,5
Badur ve ark.	1995	İstanbul, Trabzon, Aydın	Sağlıklı Kişiler	1580	5,3
Değertekin ve ark.	1995	Diyarbakır	Sağlıklı Kişiler	220	7,7
Hoşoğlu ve ark.	1996	Diyarbakır	Kan donörü	30	20
Çetinkaya ve ark.	1996	Ankara	Kan donörü	1351	7,6
Gültekin ve ark.	1996	Antalya	Sağlıklı Kişiler	167	11,1
Ayaz ve ark.	1996	Diyarbakır	7-12 yaş	382	12,8
Cengiz ve ark.	1996	Samsun	Diyaliz Hastası	72	5,5
Göral ve ark.	1997	Bursa	Kan donörü	66	7,5
Tülek ve ark.	1997	Ankara	Çocuk	180	1,1
			Erişkin	140	6,4
Yükselen ve ark.	1997	Diyarbakır	Sağlıklı Kişiler	34	23,5
Aydın ve ark.	1999	Diyarbakır	Sağlıklı Kişiler	100	29
		Trabzon	Sağlıklı Kişiler	100	3
Alibey ve ark.	1999	Manisa	1-15 yaş	82	7,3
Kaleli ve ark.	1999	Denizli	Diyaliz Hastası	96	10,4
Aksu ve ark.	1999	İzmir	Behçet hastası	124	7
			Kontrol	51	8
Karşılıgil ve ark.	2000	Gaziantep	Sağlıklı Kişiler	489	11,2

Güdücüoğlu ve ark.	2000	Van	Gebeler	324	3,7
Olca ve ark.	2000	Ankara, Manisa, Diyarbakır	Sağlıklı Kişiler	910	6,3
Altındış ve ark.	2000	Afyon	6-15 yaş Hepatit Hastası	42	4,8
Bozkurt ve ark.	2000	Van	Hastaneye başvurular	772	7,5
Mutlu ve ark.	2001	İstanbul	Kan donörü	360	4
Bozdayı ve ark.	2001	Ankara	Diyaliz Hastası	94	16
Sıdal ve ark.	2001	İstanbul	6 ay-15 yaş	909	2,1
Otlu ve ark.	2001	Malatya	Sağlıklı Kişiler	216	9,7
Çolak ve ark.	2002	Antalya	Çocuk	338	1,6
Yazgı ve ark.	2002	Erzurum	Gebe	78	9
			Sağlıklı Kişiler	25	8
Cesur ve ark.	2002	Ankara	Erişkin	1046	3,8
Yaylı ve ark.	2002	Isparta	5-16 yaş	340	9
Doyuk Kartal ve ark.	2003	Eskişehir	Kan donörü	178	3,9
Altuntaş Aydın ve ark.	2003	İstanbul	Kan donörü	160	4
Maral ve ark.	2003	Ankara	İlkokul çocukları	515	1.7 - 2.1
Ertek ve ark.	2003	Erzurum	Sağlıklı Kişiler	340	10,3
Ceylan ve ark.	2003	Diyarbakır	Tarım işçisi	46	34,8
			Kontrol	45	4,4
Şencan ve ark.	2004	Düzce	Çocuklar	476	4.7-17.2
Cevrioğlu ve ark.	2004	Afyon	Gebe	245	12,6
Atabek ve ark.	2004	Konya	Çocuk (6-11 yaş)	210	0
Tok ve ark.	2006	İstanbul	Çocuk ve erişkin	400	15,8
Öncü ve ark.	2006	Aydın	Gebe	386	7
Bayram ve ark.	2007	Gaziantep	Kronik HBV	190	13,7
			Kronik HCV	174	54
			Sağlıklı Kişiler	178	15,7
Kaya ve ark.	2008	Düzce	Çocuk	589	0,3
Uçar ve ark.	2009	Hatay	Diyaliz Hastası	92	20,6
Eker ve ark.	2009	Edirne	Sağlıklı Kişiler	582	2,4
Karaayak Uzun ve ark.	2012	İzmir	Erişkin	270	6,7

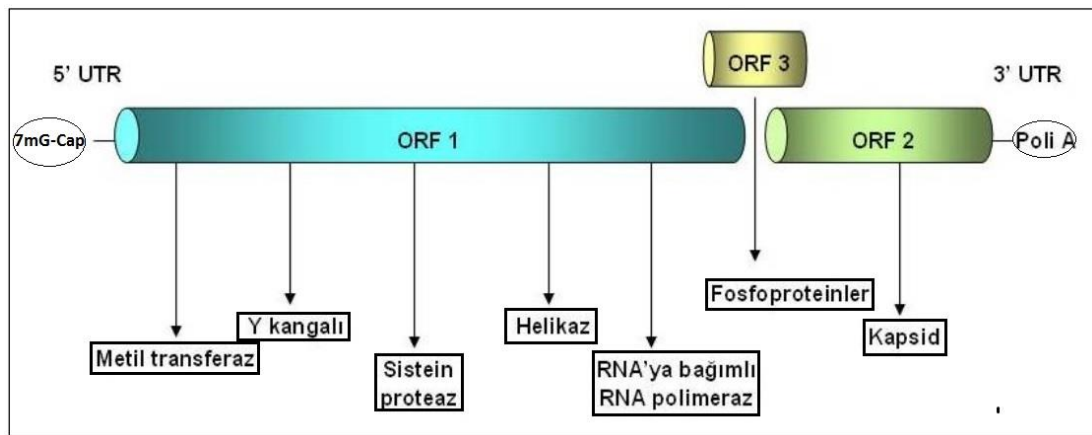
Aydın ve ark.	2013	Erzurum	Sağlıklı Kişiler	248	4
Cevahir ve ark.	2013	Denizli	İlkokul çocukları	185	12,4
Beyhan ve ark.	2016	Van	0-18 yaş çocuk	408	4,2

Çizelge 1.2’de görüldüğü gibi ülkemizde yapılan çalışmalarda oldukça farklı seropozitiflik sonuçları gösterilmiştir. Bunlara örnek olarak, Köksal ve ark., Trabzon’da 1994 yılında yapılan çalışmada, non A-non B hepatitli hastalarda %73 ve sağlıklı kişilerde %0; Badur ve ark.,1995 yılında farklı bölgelerdeki (İstanbul, Trabzon, Adana ve Aydın) normal popülasyonda %5.3; Yüce ve ark.,1999’da Ankara’da çocuk yaş grubunda %0; Bozkurt ve ark.,2000 yılında Van’daki sağlıklı erişkinlerde %7.5 ve gebelerde %3.7; Sıdal ve ark.,2001 yılında İstanbul’da çocuk yaş grubunda ortalama %2.1; Bozdayı ve ark., 2001 yılında Ankara’da hemodiyalizli hastalarda %16; Çolak ve ark., 2002 yılında Antalya’da ilköğretim çağı çocuklarda %1.6; Yazgı ve ark., 2002 yılında Erzurum’da gebelerde %9 ve sağlıklı yetişkinlerde %8; Maral ve ark.,2003 yılında Ankara’da ilköğretim çağı çocuklarda %1,7 ve %2,1; Cevrioğlu ve ark.,2004 yılında Afyon’da gebe kadınlarda %12.6; Şencan ve ark., 2004’de Düzce’de deprem sonrası kamplarda yaşayan çocuklar arasında ortalama %11; Eker ve ark., 2009 yılında Edirne’de normal yetişkinlerde %2.4; Uçar ve ark., 2009 yılında Hatay’da hemodiyaliz hastalarında %20.6; Maral ve ark.,2010 yılında Ankara’da ilköğretim okulu öğrencilerinde ortalama %2 ve Cevahir ve ark., 2013 yılında Denizli’de ilköğretim çağı çocuklarda %12.4 oranında HEV IgG seropozitifliği bildirilmiştir.

1.5. Hepatit E virüsü (HEV) Genom Yapısı ve Genotipleri

Hepatit E virüsü (HEV) genomu, pozitif yüklü, 7.2 kilobaz (kb) uzunluğunda, lineer tek zincirli bir RNA’ya sahiptir. (Riccoa ve ark., 2016, Hartl ve ark., 2016). HEV genom organizasyonu 3 farklı açık okuma bölgesinden (AOB) oluşur. Genomun kısa 5 've 3' translasyon olmayan bölgeleri, 5 ' - Metilguanin kapağı, 3' - poli (A) kuyruğu ve üç örtüşen açık okuma çerçevesi: AOB1, AOB2 ve AOB3 vardır. Ayrıca, AOB1’in 5 'ucuna yakın dizileri korunmuştur. Bunlar ve düzenleyici

unsurlar içeren AOB1, AOB2 ve AOB3 arasındaki bağlantı bölgesi, birlikte HEV genomunun replikasyonu için önemlidir (Aggarwall, 2011). Buna ek olarak 5' ucunda bulunan 27 nükleotid içeren ve 3' ucunda 65 nükleotid içeren translasyon olmayan bölgeler (TOB) mevcuttur (Song, 2010). Genomun her iki ucunda TOB vardır. 5' ucunda 7- metil guanozin (7mG) bulunur ve 3' ucu ise poliadenillenmiştir. 3' poli-A ucundaki TOB, 5' uçta daha kısadır. Bu açık okuma bölgeleri AOB1 AOB2 ve AOB3 olarak isimlendirilmektedirler (Panda, 2013). Bu okuma bölgelerinin her biri farklı proteinleri kodlamaktadırlar. AOB1 ve AOB3 bir nükleotidle örtüşmekte; AOB1 ve AOB2 yaklaşık 41 nükleotidle ayrışık; AOB2 ve AOB3 yaklaşık 28 nükleotidle örtüşmektedir (Şekil 1.5.). AOB1 bölgesi, yapısal olmayan sekiz adet protein; AOB2 bölgesi yapısal kapsid proteini, AOB3 bölgesi ise düzenleyici rolü olan küçük fosfoproteinlerin kodlanmasından sorumludur (Şekil 1.5) AOB1 bölgesi 5079 adet baz içermektedir ve yaklaşık olarak 1690 aminoasit (aa) içeren ve yapısal olmayan bir proteini oluşturmak üzere görev alırlar. Bu protein daha sonra modifiye edilerek RNA Helikaz, RNA Polimeraz gibi yapısal olmayan proteinlere dönüştürülmektedirler. AOB2 bölgesi ise yaklaşık 1980 adet baz içermektedir ve yapısal işlerde görev alan proteinleri ve kapsid proteinlerini kodlamaktadırlar. Son ve en kısa bölge olan AOB3 bölgesiyse 370 baz içermektedir ve hücre iskeletinde görev alan immünojenik fosfoproteinleri oluşturmaktadırlar (Whemeyer ve ark., 2012).

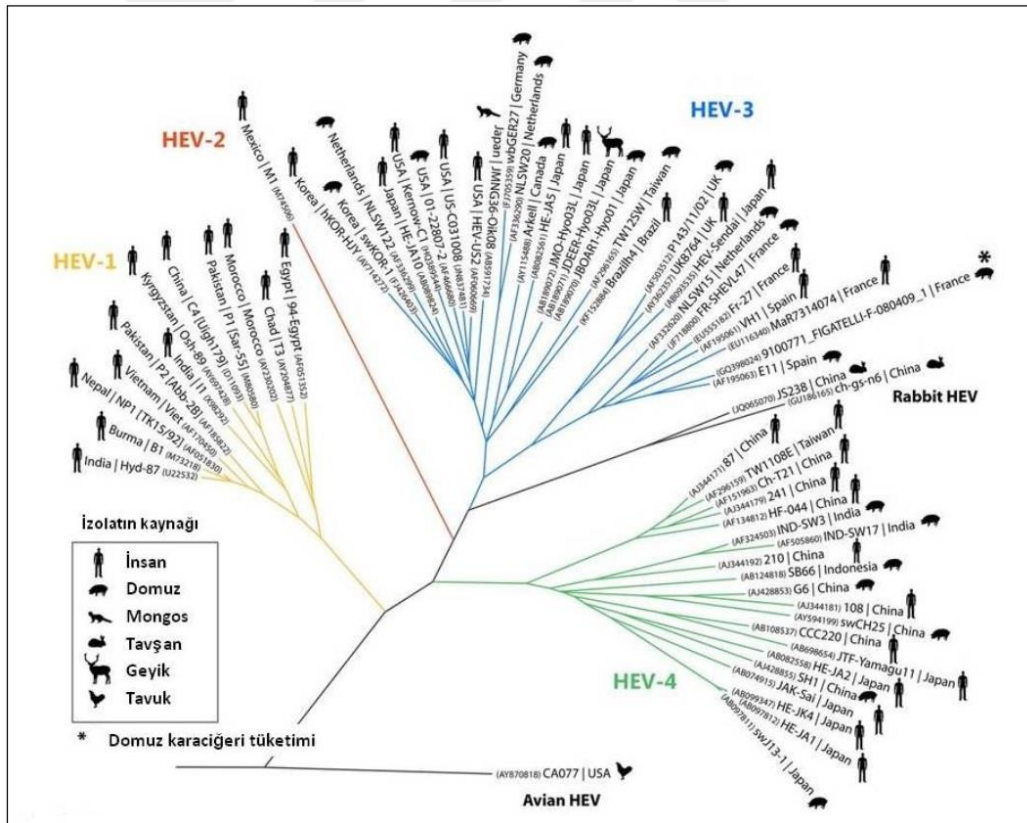


Şekil 1.5 HEV Genom Yapısı ve Açık Okuma Bölgeleri

AOB 1 yapısal olmayan proteinleri ve metiltransferaz, RNA Helikaz ve RNA bağımlı RNA polimeraz gibi enzimleri kodlamaktadır. Virüsün bu yapısal olmayan

proteinleri, viral transkripsiyon ve replikasyon esnasında düzenleyici görevi alırlar ve ayrıca virüsün, konak bağışıklık yanıtından kaçışını kolaylaştırmaktadırlar. (Panda, 2013, Cao ve ark., 2012 ve Graff ve ark., 2005)

HEV genomunun çok değişken yapısı temel alındığında, HEV sıra dizilimi 4 genotip şeklinde gösterilmektedir. (Şekil 1.6) Birinci genotip Asya ve Afrika kıtasında gelişmekte olan ülkelerde birçok salgına neden olmaktadır. İkinci genotip ise Meksika ve birkaç Afrika ülkesinde görüldüğü bilinmektedir. Üçüncü genotipin Afrika hariç çok geniş bir alanda görülmüş olup çoğunlukla domuzlardan izole edilen örneklerde görüldüğü gösterilmiştir. Son olarak dördüncü genotip ise özellikle Asya ülkelerinde hem insandan hem de domuzdan izole edilen örneklerde görüldüğü bildirilmiştir (Okamoto, 2007).



Şekil 1.6 HEV genotiplerinin soyağacı. Kapsid proteinin nükleik asit dizilimine göre sınıflandırma yapılmıştır. Genotip 1 ve 2 yalnızca Afrika ve Asya insanlarında enfeksiyona neden olurken, genotip 3 ve 4 ise çoğunlukla hayvanlarda, hayvanlardan insanlara bulaşan bir enfeksiyona yol açmaktadırlar. (Krain ve ark.,2014)

Günümüzdeki son veriler incelendiğinde HEV genotip sayısının 7'ye kadar çıktığı gösterilmiştir. (Tong, 2016) İlk 4 genotipin insanda hastalık etkeni olarak kabul edilirken, genotip 5 ve 6'nın yalnızca hayvanlarda hastalık yaptığı gösterilmiştir. Son olarak genotip 7 develerden insana bulaşmaktadır. Karaciğer nakli yapılan insanlarda kronik hepatit E'ye neden olduğu gösterilmiştir. (Lee, 2016)

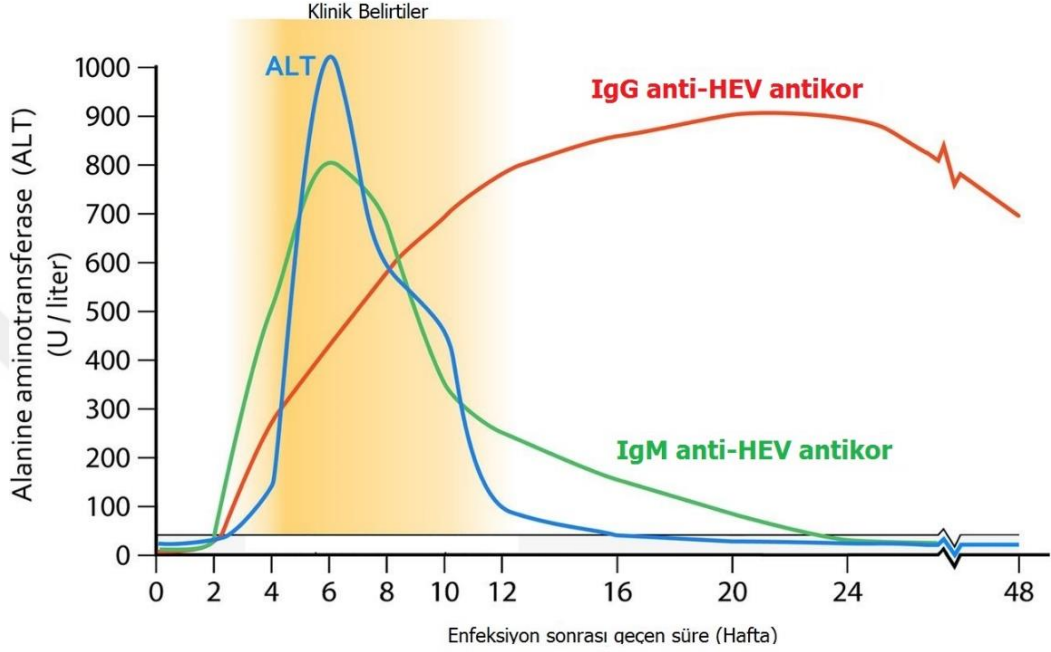
1.6. Hepatit E virüsü (HEV) Klinik Açıdan Önemi

HEV enfeksiyonlarının büyük çoğunluğu klinik olarak hiç hissedilmeden geçirilmektedir (Wedemeyer, 2012). Çocukluk yaşlarında enfeksiyon ile birlikte klinik olarak semptomların görülmesi çok azdır. (Buti, 2008) Virüsün oral-fekal yol ile bulaşmasından sonra enfeksiyonun klinik belirteçlerinin görülmesi 40 güne kadar ulaşmaktadır. Genellikle başlangıçta kas ve eklemlerde ağrı, kusma, halsizlik gibi klinik semptomlarla başlayan enfeksiyon, daha sonra sarılık, titreme, renksiz dışkı ve koyulaşmış idrar görülmektedir. Bunlara ek olarak karaciğer enzimlerinde, alkalin fosfataz ve bilirubin seviyelerinde yükselme tespit edilmiştir.

HEV enfeksiyonuna bağlı olarak özgün IgM, IgG ve IgA tipi antikorlar oluşmaktadır. Anti HEV IgM antikor, enfeksiyonun başlangıcından yaklaşık 1-4 hafta sonra ortaya çıkmakta ve olguların %50'sinde akut fazın başlangıcından 3 ay sonra kaybolmaktadır. Anti-HEV IgG ise akut hastalığın başlangıcından 2-4 hafta sonra en üst noktaya ulaşır ve zamanla miktarı azalır. HEV IgG antikorlarının vücutta ne kadar süre kaldığına dair net bir bilgi olmamasına rağmen enfeksiyondan 14 yıl sonra dahi olguların yarısında antikorların saptanabileceğine dair bilgiler mevcuttur (Kamar ve ark., 2014 ve Aggarwal ve ark.,2009).

HEV RNA hem serum hem de dışkıda enfeksiyondan erken dönemde saptanabilir, ancak serum viremi enfeksiyonun klinik belirtileri ortaya çıktığı zamana kadar algılanması zor olabilir. Anti-HEV IgM titreleri hızla yükselir ve enfeksiyondan sonraki haftalar boyunca zayıflarken, anti-HEV IgG antikor titreleri,

iyileşme döneminde daha yavaş yükselmeye devam eder ve saptanabilir anti-HEV IgG aylar veya yıllarca sürebilir. (Krain ve ark.,2010) (Şekil 1.6)



Şekil 1.7 HEV enfeksiyonu gelişim süreci. Klinik semptomların başlangıcı serum alanin transaminaz (ALT) düzeylerinde keskin bir artış ile görülmektedir. Belirtiler birkaç hafta ile bir ay veya daha fazla sürebilir. İyileşme sırasında ALT seviyeleri normale döner. (Krain ve ark.,2014)

Özellikle hamile kadınlarda enfeksiyon çok daha ciddi seyretmektedir. Enfeksiyon gelişen hamilelerde kronik karaciğer hastalığı gelişebilmekte, bazen de ani karaciğer yetmezliği görülmektedir. Bazı enfeksiyon durumlarında, hamilelerde virüs yüküne bağlı olarak progesteron hormonu baskılanmakta ve bu nedenle ölü doğumlara sebebiyet vermektedir. HEV'in bu şekilde hastalıklara neden olduğu araştırmalar neticesinde tespit edilmiş olmasına rağmen, karaciğer sirozuna ve hepatosellüler karsinoma sebep olduğuna dair herhangi bir rapor bulunmamaktadır (Wedemeyer, 2012).

1.7. HEV RNA'ya Yönelik Moleküler Tanı

Son yirmi yılda HEV RNA tanısında birçok serolojik ve nükleik asit tabanlı tanı testi geliştirilmiştir. HEV enfeksiyonu tanısında yalnız başına bu serolojik testler özellikle immünitesi zayıflamış hastalarda yanlış sonuçlar verdiği bilinmektedir (Mokhtari ve ark.,2013). Bu nedenle daha hassas ve yüksek oranda güvenilir bir sonuç elde etmek için nükleik asit tabanlı tanı testlerine ihtiyaç duyulmaktadır. HEV enfeksiyonun akut döneminde viral RNA'yı sadece serumda değil aynı zamanda feçesde de saptamada kullanılan konvansiyonel bir tanı yöntemi olan gerçek zamanlı ("Real-Time") PZR en kesin tanı yöntemidir (Baylis ve ark.,2011). Bunun ülkemizde rutinde kullanımı oldukça kısıtlıdır. Bu nedenle ülkemizde rutinde de kullanılabilir Real-Time PCR temelinde yüksek doğruluk ve duyarlılıkta uygun maliyetli bir yöntem geliştirilmesi gerekmektedir.

Çalışmada yapılan gerçek zamanlı PZR analizinde kullanılan primer ve prob tasarımı HEV genomunu yüksek korunmuş bölgesi olan AOB3'ten ilk olarak Jothikumar ve ark. tarafından 2006 yılında geliştirilmiştir. Daha sonra Garson ve ark. tarafından 2012 yılında proba farklı modifikasyonlar yapılmış ve hassasiyeti daha da artırılmıştır. Gerçek zamanlı PZR deneylerinde bir "housekeeping" gen olan GAPDH iç kontrol olarak kullanılmıştır. Böylece hem deneyin optimizasyonu ve hassasiyeti denenmiş hem de antikor pozitif serumlarda RNA pozitifliği analiz edilmiştir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1 GEREÇ

2.1.1 Etik Kurul Raporu ve Gönüllü Olur Kan Donör Formları

Bu çalışmada kullanılmak üzere yapılan kan toplama işlemi ve kan örneklerinin proje kapsamında kullanılması için gerekli olan Etik Kurul izin belgesi Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan kan örnekleri toplanmaya başlamadan önce alınmıştır (Karar No: 03-85-14, 10 Şubat 2014). Buna ek olarak kan örneklerini veren donörlerden alınan gönüllü olur formu da kan veren kişiler tarafından imzalanarak, kayıt altına alınmıştır.

2.1.2 Kan Serum Örnekleri

Bu araştırmada kullanılan kan serumu örnekleri Ankara Üniversitesi BAP tarafından desteklenen 14B0207001 numaralı HEV projesi kapsamında ülkemizin farklı bölgelerindeki kan merkezlerinden getirilen serum örnekleridir. Bu çalışmada 18–65 yaş arasındaki İzmir, Kayseri, Kahramanmaraş, Van, Malatya ve Ankara illerindeki kan merkezlerine başvuran sağlıklı donörlerden alınan toplam 2011 serum örneği kullanılmıştır. Gönüllü kan donörlerinden toplam 2011 serum örneğinin 807'si Ankara, 243'ü Kayseri, 200'ü Malatya, 284'ü İzmir, 200'ü Kahramanmaraş ve 277'si Van'dan toplanmıştır. 18–65 yaş arasındaki donörlerin 1880'i (%93) erkek ve 131'i (%7)'i kadındır (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1 Kan donörleri genel durum.

İL ADI	KAN DONÖR SAYISI	KADIN	ERKEK	YAŞ ORTALAMA
ANKARA	807	62	745	35,5±12
KAYSERİ	243	18	225	33,8±13
İZMİR	284	32	252	37,1±17
VAN	277	8	269	36,7±16
MALATYA	200	11	189	34,9±14
KAHRAMANMARAŞ	200	10	190	36,7±17
TOPLAM	2011	141	1870	35,8±15

2.1.3 ELISA Kitleri

Bu serum örnekler kullanılarak Akut hepatit E enfeksiyonu sıklığının belirlenmesi çalışmalarına ve Hepatit E enfeksiyonu teşhisine yardımcı olmak üzere tasarlanmış iki farklı ticari kit karşılaştırılmıştır. Bu kitler; Wantai (Çin) ve DiaPro (İtalya) firmalarına ait HEV total antikor ELISA kitleridir. Bu kitler Ankara Üniversitesi BAP tarafından 14B0207001 no'lu proje kapsamında temin edilmiştir.

2.1.4 Primer ve Problar

Yapılan polimeraz zincir reaksiyonlarında kullanılan primerler ve prob ELLA Biotech (Ella Biotech GmbH, Almanya) tarafından sentezlenmiştir. Prob ve primerler, deiyonize steril su ile üreticinin belirttiği miktarda sulandırarak 100 picomol olarak hazırlanmıştır. Çizelge 2.1'de dizileri verilmiş olan bu primerler ve prob kullanılarak gerçek zamanlı PZR çalışmaları yapılmıştır.

Çalışmada bir “housekeeping” gen olan GAPDH kontrol olarak kullanılmıştır. Çizelge 2.2'de kullanılan GAPDH primer ve probları gösterilmiştir.

Çizelge 2.2 Jothikumar ve ark. ları tarafından geliştirilen ve Garson ve ark. tarafından modifiye edilen AOB3 korunmuş dizisine ait primer prob dizileri.

	5'→3' dizi	Erime sıcaklığı (T _m)	Kaynak
Primer İleri	GGTGGTTTCTGGGGTGAC	61 °C	Garson ve ark.,2012
Primer Geri	AGGGGTTGGTTGGATGAA	61 °C	Garson ve ark.,2012
TaqMan Prob	Fam-TGATTCTCAGCCCTTCGC-BHQ MGB modifiye	71 °C	Garson ve ark.,2012

Çizelge 2.3 GAPDH Primer ve Prob

	5'→3' dizi	Kaynak
GAPDH Primer ileri	CCACCCATGGCAAATTCC	Karataylı ve ark.,2014
GAPDH Primer geri	TCGCTCCTGGAAGATGGTG	Karataylı ve ark.,2014
GAPDH prob	JOE-TGG CACCGT CAA GGC TGA GAA CGT-Black hole quencher	Karataylı ve ark.,2014

2.1.5 HEV RNA Standartları

HEV birincil referansı olarak DSÖ'den alınan HEV RNA materyali (HEV referans materyal kodu: PEI kod 6329/10, version 1.0, 7th July 2011) 250,000 IU/ml viral yük miktarına sahiptir. Toplamda 0,5 ml olarak sulandırılan liyofilize örnekten 200 ul 2,5 x 10⁵ IU/ml viral yük stok olarak saklanmış ve 3 ml 2,5 x 10⁴ IU/ml, 10 ml 2,5 x 10³ IU/ml, 10 ml 2,5 x 10² IU/ml ve 10 ml 2,5 x 10¹ IU/ml viral yüke sahip örnek dilüsyonları elde edilmiş ve kullanıma kadar -20°C'de saklanmıştır.

2.1.6 RNA İzolasyon Malzemeleri

Hazırlanan 2,5 x 10⁴, 2,5 x 10³, 2,5 x 10² ve 2,5 x 10¹ IU/ml viral yüke sahip örneklerden 200 ul ile "High Pure Viral RNA" (Roche, Almanya) kiti kullanılarak RNA ekstraksiyonu yapıldı. Elde edilen 50 ul bekletilmeden cDNA sentezi gerçekleştirildi.

2.1.7 cDNA Sentez Reaksiyonu Malzemeleri

Araştırmada cDNA sentezi için ‘‘Transcriptor First Strand cDNA’’ sentez kiti (Roche, Almanya) kullanılmıştır.

2.1.8 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Malzemeleri

PZR için Light Cycler 480 cihazı kullanılarak, ‘‘LightCycler 480 Probes Master’’ (Roche, Almanya) kiti ile gerçek zamanlı PZR deneyleri yapılmıştır.

2.1.9 Kullanılan Kitler

Viral RNA İzolasyon Kiti (Roche Applied Science, Almanya)

First Strand cDNA Sentez Kiti (Roche Applied Science, Almanya)

Light Cycler Probes Master Kit (Roche Applied Science, Almanya)

2.1.10 Kullanılan Cihazlar

Soğutmalı Santrüfuj (Hawk 15/05 Sanyo Refrigerated, İngiltere)

Thermal Cycler PZR cihazı (Eppendorf Mastercycler Personal, Almanya)

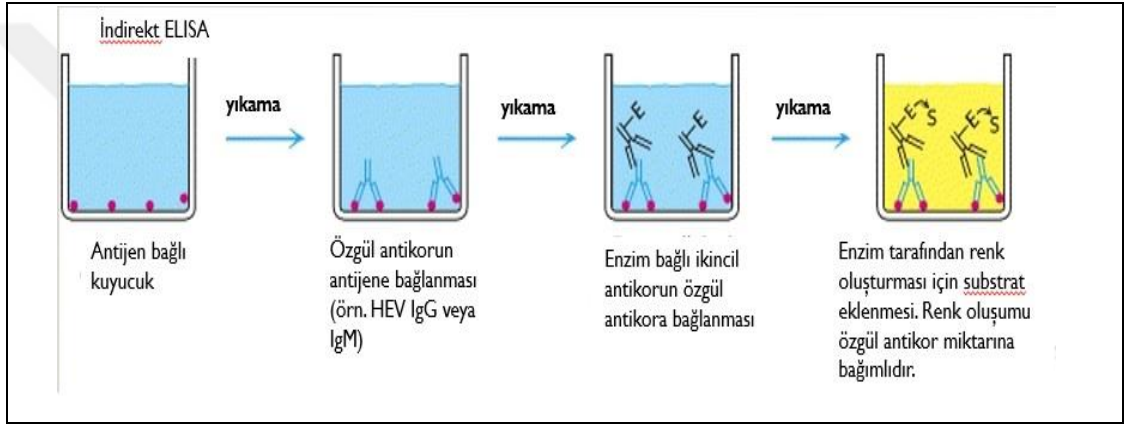
Light cycler 480 Gerçek Zamanlı PZR Cihazı (Roche Applied Science, Almanya)

2.2 YÖNTEM

2.2.1 İndirekt ELISA Yöntemi

Her bir örnek hem Dia.Pro hem de Wantai HEV total antikor ELISA kitleri ile ticari firmanın önerileri doğrultusunda ALISEI tam otomatik ELISA cihazında indirekt ELISA yöntemi ile çalışılmıştır. Ayrıca her iki kit için de yine indirekt ELISA yöntemi ile duyarlılık testi yapılmıştır.

Bu çalışmada kullanılan Wantai ve DiaPro firmasına ait farklı kitlerin kullanımı ile HEV total antikor ELISA enzime bağlı immünosorbent deney ile insan serumundaki hepatit E virüsüne ait IgG ve IgM sınıfındaki antikorların tespiti yapılmıştır. Antikor varlığının tespiti için gönüllülerden biyokimya tüpünde alınmış kan örneklerinden 4000 devirde 10dk santrifüjleme yöntemi ile serum elde edilmiştir ve bu örnekler ticari firmanın önerileri doğrultusunda laboratuvar koşullarında çalışılmıştır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. İndirekt ELISA çalışma şeması.

Wantai HEV total antikor ELISA'nın 2 aşamalı inkübasyon sürecinde HEV'e ait IgG ve IgM sınıfı antikorlarının tespiti için indirekt ELISA yönteminde katı faz kullanılır. Polistiren mikro şeritler rekombinant HEV ile önceden kaplanmıştır. İlk inkübasyon adımı sırasında, HEV'e özgü antikorlar, mevcut olduğu takdirde, katı faz önceden kaplanmış HEV antijenlerine bağlı olacaktır. Kuyular bağlanmamış serum proteinlerini uzaklaştırmak için yıkanır ve sonra tavşan insan total antikorları (Anti-HEV IgG ve IgM)'na bağlanmış "horseradishperoxidase" (HRP-Conjugate) ilave edilir. İkinci inkübasyon adımı sırasında bu HRP ile konjüge edilmiş antikorlar antijen antikor (IgG) komplekslerine bağlanır ve sonra önceden oluşturulan ve bağlanmamış HRP-konjüğü ve yıkama ile uzaklaştırılır. Tetra metil benzidin (TMB) ve üre peroksit içeren Kromojen çözeltileri çukurlara ilave edilir ve antijen-antikor Anti-HEV IgG ve IgM (HRP) immunokompleksinin varlığında, renksiz kromojenleri mavi renkli bir ürüne bağlı HRP konjüğü ile hidrolize edilir. Mavi

renk sülfirik asit ile inkübasyonu sona erdikten sonra sarıya döner. Renk yoğunluğu miktarı ölçülebilir ve sırasıyla kuyularda yakalanan antikor miktarı, numune ile orantılıdır denilebilir. Anti-HEV IgG için negatif örnekleri içeren kuyular renksiz kalır (Şekil 2.2).

Dia. Pro kiti ile yapılan deneyde de benzer şekilde Mikroplak'lar immünodominant belirteçleri ve HEV'e özgü sentetik antijenler ile kaplanır. Katı faz önce seyreltilmiş numune ile işleme tabi tutulur ve eğer varsa Anti-HEV IgG ve IgM antijenleri tarafından, yakalanır. Numunenin tüm diğer bileşenleri yıkandıktan sonra, 2. İnkübasyonda peroksidaz (HRP) ile etiketlenmiş poliklonalspesifik anti hlgG antikorlarının bağlandığı Anti-HEV IgG ve IgM bağlı IgG ve IgM tespit edilir. Katı faz üzerinde yakalanan enzim substrat-kromojen karışımı üzerine etki eden numune içinde HEV total antikor miktarına orantılı bir optik sinyal üretir. Bu eşik değeri optik yoğunluğun HEV total antikor negatif ve pozitif sonuçlar olarak yorumlanabilmesini sağlar (Şekil 2.2).

DIAPRO Anti-HEV Ab		WANTAI Anti-HEV Ab	
1	100 ul serum ekle	1	100 ul dilüent + 10 ul serum ekle
2	45 dk inkübasyon 37°C	2	30 dk inkübasyon 37°C
3	3 defa yıka	3	3 defa yıkama
4	100 ul konjugant ekle	4	100 ul konjugant ekle
5	45 dk inkübasyon 37°C	5	30 dk inkübasyon 37°C
6	3 defa yıka	6	3 defa yıkama
7	100 ul Substrat ekle	7	50 ul renklendirici A + 50 ul renklendirici B ekle
8	15 dk inkübasyon 25°C (Karanlık odada)	8	15 dk inkübasyon 25°C (Karanlık odada)
9	100 ul Sonlandırıcı solüsyon ekle	9	50 ul Sonlandırıcı solüsyon ekle
10	450 - 620 dalga boyunda okuma yap	10	450 - 620 dalga boyunda okuma yap
Cut-Off = Negatif kontrol (OD450nm) + 0.350		Cut-Off = Negatif kontrol (OD450nm) + 0.16	

Şekil 2.2. Dia.Pro ve Wantai HEV total antikor kitleri çalışma protokolü.

Bu deneyler sonucunda elde edilen pozitiflik ve negatiflik oranları iki test için de karşılaştırılmıştır ve sonuçlar ayrıca yaş grupları ve cinsiyet dağılımına göre değerlendirilmiştir.

2.2.2 ELISA Hassasiyet Testi

Bu çalışmada her iki kit için de hassasiyet deneyi yapılmıştır. Bunun için Dünya Sağlık Örgütü'nden temin edilen Ulusal Biyolojik Standartlar ve Kontrol Enstitüsü 95/584 kod numaralı Anti-HEV serumu kullanılmıştır. Çalışmada bu serum 1/10'dan başlayarak 1/1000 oranına kadar dilüsyon yapılmıştır. İlk çalışmada 1/10, 1/20, 1/30, 1/40, 1/50 ve 1/100 şeklinde dilüsyonlar kullanılmıştır. Dilüsyon yapılmış serumların hepsinde pozitif sonuç alındığı için daha yüksek dilüsyonlara ihtiyaç duyulmuştur. Daha sonra 1/100, 1/200, 1/300, 1/400, 1/500, 1/600, 1/700, 1/800, 1/900 ve 1/1000 oranlarında dilüsyonlar yapılarak çalışılmıştır. Bu farklı oranlarda serum içeren örnekler iki farklı kit kullanarak ELISA testi uygulanmıştır.

2.2.3 RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için Roche firmasına ait "High Pure Viral RNA" Kit kullanılmıştır. Bu aşamada üretici firmanın önerileri doğrultusunda; 200 µL "binding buffer" üzerine 4µL polly A solüsyonu eklenerek karıştırıldı. Üzerine 200 µL serum eklendi ve vortex yapıldı. Karışımı sliikalı (filtreli) ependorflara aktarıldı. Santrifüjde 11000 devirde 1dk santrifügasyon yapıldı. Altta kalan sıvı kısım atılarak slika yeni bir ependorfa aktarıldı. Üzerine 500 µL inhibitör temizleyici eklendi. Santrifüjde 11000 devirde 1dk santrifügasyon yapıldı. Altta kalan sıvı ve ependorfu atılarak slika yeni bir ependorfa aktarıldı. En yüksek hızda tekrar santrifügasyon yapıldı. 50 µL elüsyon tampon eklendi ve santrifüjde 11000 devirde 1 dk santrifügasyon yapıldı. Bu basamaktan sonra filtreye yapışık durumda olan RNA aşağı indiği için üstteki sliikalı ependorf atıldı. Altta kalan kısım RNA içerdiğinden alınarak hemen çalışmaya devam edildi. Kalan RNA sonraki çalışmalar için -80°C'de saklanmıştır.

2.2.4 cDNA Sentez Reaksiyonu

Ekstrakte edilmiş olan 10 µL HEV RNA 0.2 ml'lik PZR tüpüne pipetlendi. 2 µL random hekzamer (600 µM) solüsyonu eklendi. Daha sonra 1 µL H₂O eklenerek karıştırıldı. Termal döngü cihazı kullanılarak 65 °C' de 10dk inkübasyon yapıldı. Daha sonra 4 µL transcriptor RT (5X) reaksiyon tamponu, 0,5 µL koruyucu RNAaz inhibitörü (40U/µl), 2 µL dNTP karışımı (10mM her biri) ve 0,5 µL ters transkriptaz enzimi (20U/µl) konularak karışım hazırlandı. İnkübasyonda bekleyen karışım üzerine bu karışım eklenerek toplam hacim 20 µL olarak ayarlanmıştır. Yine termal döngü cihazında 10 dk 25°C, 30 dk 55°C, 5 dk 85°C 'de inkübasyona bırakılmıştır ve son olarak 4°C'de beklemeye alınmıştır.

2.2.5 Gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR)

Serumdan elde edilen virüs RNA'sının çoğaltılması için gerçek zamanlı PZR tekniği kullanılmıştır. Gerçek zamanlı PZR, hacmi 0,2 ml olan steril reaksiyon tüplerinde gerçekleştirildi. Her reaksiyon için hazırlanan PZR karışımının son hacmi, ddH₂O ile 20 µl'ye tamamlanmıştır.

HEV Primer İleri: 0,6 µL (6 pmol)

HEV Primer Geri: 0,6 µL (6 pmol)

HEV MGB Prob: 0,6 µL (6 pmol)

GAPDH Primer İleri: 0,6 µL (6 pmol)

GAPDH Primer Geri: 0,6 µL (6 pmol)

GAPDH Prob: 0,6 µL (6 pmol)

Master mix: 10 µL

cDNA: 5 µL

Son hacim 20 µL olması için 1,4 µL deiyonize su eklenmiştir. Roche Lightcycler 480 cihazı kullanılarak Çizelge 2.3'de gösterilen protokole göre çalışma tamamlanmıştır.

Çizelge 2.4 Real time PZR protokolü

	Sıcaklık °C	Süre	Döngü Sayısı
Denatürasyon	95	10 dak.	1
Kantifikasyon	95	10 sn	45
	60	30sn	
	72	1sn	
Ergime	40	1 dk	1

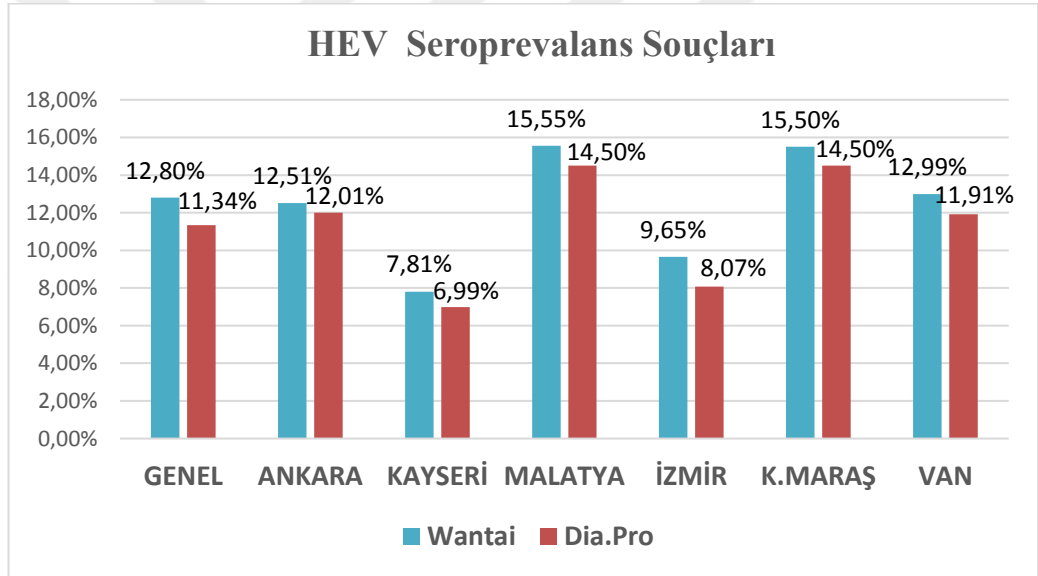
2.2.6 İstatiksel Analiz (Ki-kare testi)

İstatistiksel analiz yapılırken χ^2 (ki-kare) testi kullanılmıştır. $p < 0,05$ olan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3. BULGULAR

3.1 İndirekt ELISA sonuçları

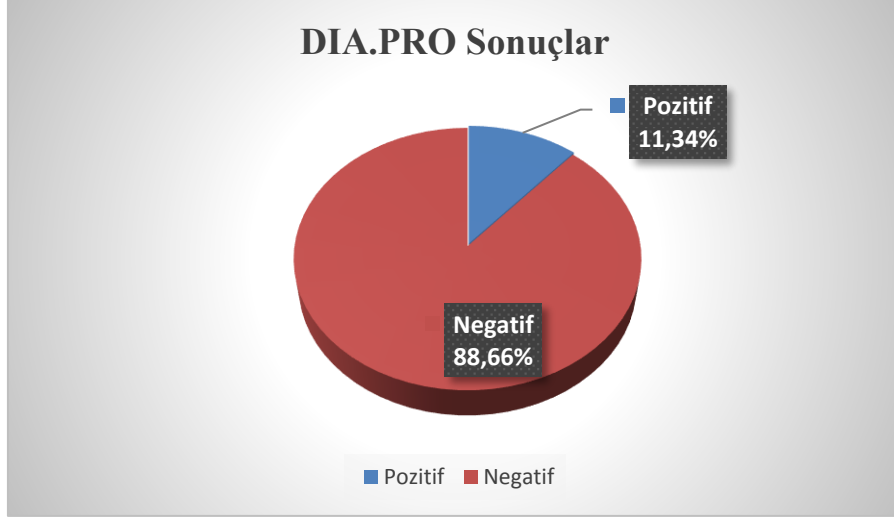
Elde edilen sonuçlara göre sırayla Wantai ve Dia.Pro kitleri için anti-HEV pozitiflik oranları şöyledir; Ankara: %12,55-%12,01, Kayseri: %7,81-%6,99, Malatya: %15,55-%14,5, İzmir: %9,65-8,07, Kahramanmaraş: %15,5-%14,5, Van: %12,99-%11,91. Buna göre en yüksek pozitiflik iki kit için ortalama %15 oranı ile Malatya ve Kahramanmaraş'ta olup en düşük pozitiflik %7,4 ile Kayseri ilimizde görülmektedir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4 Wantai ve Dia.Pro HEV total antikor kitlerinin illere göre sonuçları.

3.1.1 Dia.Pro HEV total antikor ELISA sonuçları

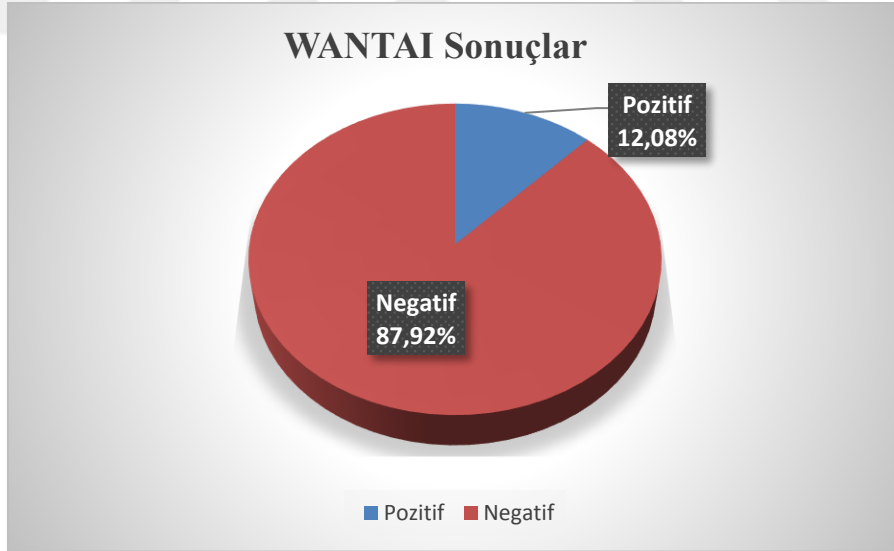
Dia.Pro sonuçlarına göre 2011 gönüllü donör serum örneğinden 228 (%11,34) pozitif, 1783 (%88,66) negatif bulunmuştur (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 Dia.Pro HEV total antikor ELISA sonuçları

3.1.2 Wantai HEV total antikor ELISA Sonuçları

Aynı örnekler için Wantai kitine göre 2011 gönüllü donör serum örneğinden 243 (%12,08) pozitif, 1768 (%87,92) negatif bulunmuştur.

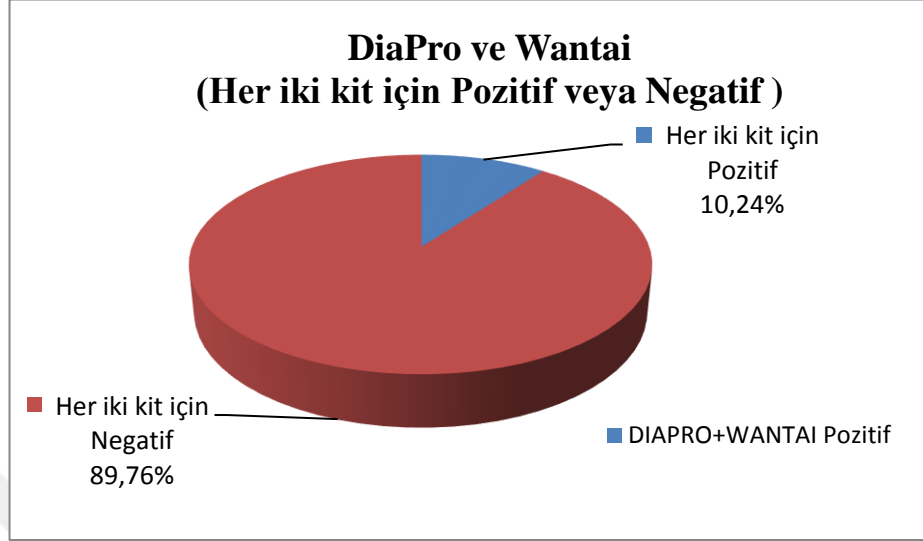


Şekil 3.2 Wantai HEV total antikor ELISA sonuçları

3.1.3 Dia.Pro ve Wantai HEV total antikor ELISA Kitlerin Karşılaştırılması

Çalışma kapsamında HEV IgG ve IgM antikor seviyesi değerlendirmesi için toplanan 2011 kan serum örneği kullanılarak her iki ticari kit tarafından 206

(%10,24) HEV total antikor pozitif, 1805 (%89,76) HEV total antikor negatif sonuçlar elde edilmiştir. (Şekil 3.3)



Şekil 3.3 Farklı illerden toplanan serumlara göre HEV Seroprevalansı. Her iki kit tarafından pozitif veya negatif olarak sonuç veren örneklerdir.

Bu araştırmada her iki kit tarafından pozitif bulunan kişi sayısı 265 (%13,1), negatif bulunan kişi sayısı 1746 (%86,9) olarak belirlenmiştir. Sadece Wantai kiti tarafından pozitif bulunan kişi sayısı 243 olurken, Dia.Pro kiti tarafından pozitif kişi sayısı 228 olarak sonuçlandırılmıştır. Toplamda 15 kişinin Wantai kiti ile pozitif sonuç verirken Dia.Pro kiti ile negatif sonuç vermiştir. Sadece Wantai kiti tarafından pozitif olup, Dia.Pro kiti tarafından negatif olarak bulunan 37 ($243-206 = 37$) kişi vardır. Aynı şekilde sadece Dia.Pro kiti tarafından pozitif bulunan ama Wantai kiti tarafından negatif bulunan kişi sayısıysa 22 ($228-206 = 22$) olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1 Dia.Pro ve Wantai HEV total antikor ELISA Kitlerinin Karşılaştırılması

HEV Total Antikor ELISA Kitleri Sonuçları	Kişi Sayısı
DIA.PRO POZİTİF ve WANTAI NEGATİF	$228-206=22$
WANTAI POZİTİF ve DIA.PRO NEGATİF	$243-206=37$

Bu sonuçlar her iki Dia.Pro ve Wantai kitleri ile ortak pozitif sonuç veren örneklerdir. Her iki kit arasında hassasiyete bağlı olarak pozitif sonuçlar yönünden

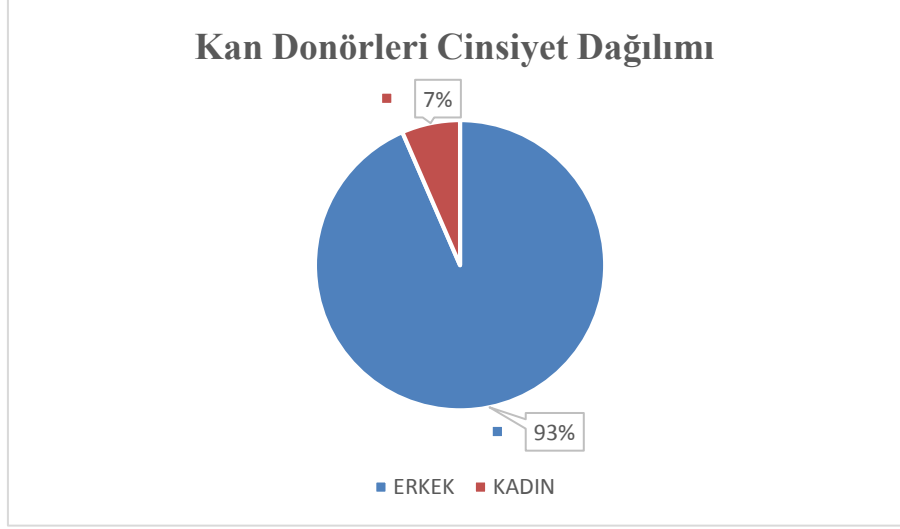
farklılıklar görülmüştür. Dia.Pro kiti ELISA yöntemi ile çalışılan 2011 kan serum örneğinden HEV total antikor pozitif yönünden 228 (%11,3) pozitif, 1783 (%88,7) negatif sonuç elde edilmiştir. Aynı şekilde Wantai kiti ELISA yöntemi ile çalışılan 2011 kan serum örneğinden HEV total antikor yönünden 243 (%12,1) pozitif, 1768 (%87,9) negatif olduğu sonucuna ulaşılmıştır. (Çizelge 3.2)

Çizelge 3.2 Ülkemizdeki 6 farklı ilden toplanan serumlara göre HEV seroprevalans

	WANTAI		DIAPRO		DIAPRO+WANTAI	
	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif
Ülkemizdeki 6 farklı ilden toplanan örnekler	243 (% 12,1)	1768(%87,9)	228(%11,3)	1783 (%88,7)	265(%13,1)	1746 (%86,9)
	Toplam = 2011		Toplam = 2011		Toplam = 2011	
	Seroprevalans: % 12,1		Seroprevalans: % 11,3		Seroprevalans: % 13,1	

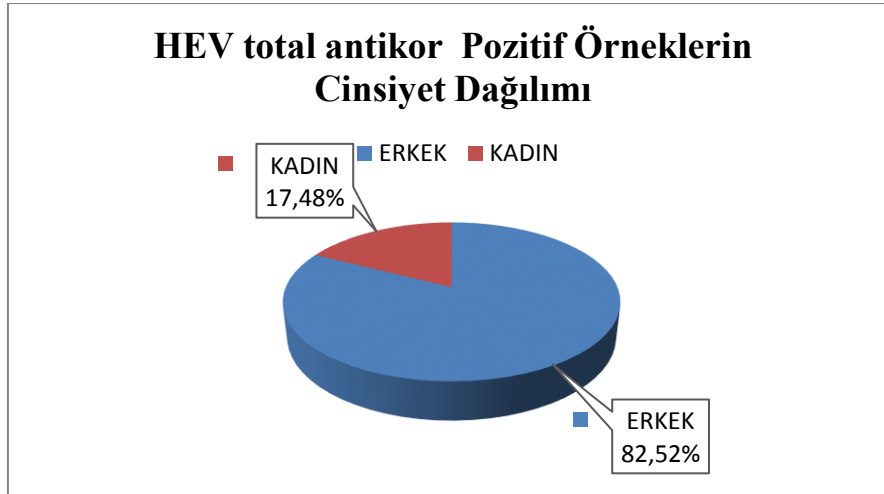
3.2 Gönüllü Kan Donörlerinin Cinsiyet Dağılımı

Bu çalışmada kullanılan örnekler Ankara, İzmir, Kahramanmaraş, Malatya ve Van illerinde yaşayan sağlıklı kan donörleri tarafından verilmiştir ve -80 derecede saklanmıştır. Toplamda ülkemizdeki farklı 6 ilden 2011 kan serum örneği toplanmıştır. Bu donörlerin 1880 (%93)'ni erkek ve 131 (%7)'i ise kadın olduğu belirlenmiştir. (Şekil 3.5)



Şekil 3.5 Farklı illerden Toplam 2011 Kan Donörünün Cinsiyete Göre Dağılımı

Her iki kit sonuçlarına göre pozitif bulunan toplam 206 kan serum örneğinin cinsiyet yönünden değerlendirilmesi yapılmıştır. ELISA HEV total antikor pozitif örneklerden 170 (%82,52) tanesinin erkek donörden, 36 (%17,48) tanesinin kadın donörden alındığı bilgisine ulaşılmıştır. (Şekil 3.6)



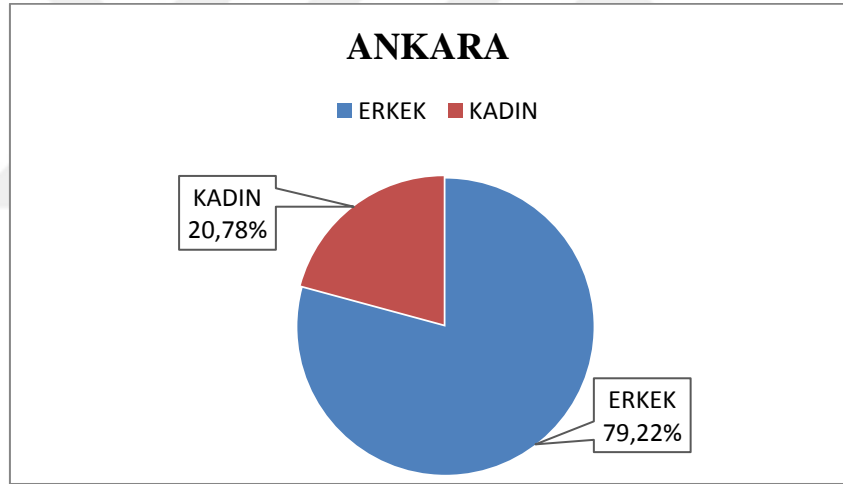
Şekil 3.6 Ülkemizdeki 6 farklı ilden toplanan serumlara göre HEV total antikor pozitif örneklerin cinsiyet dağılımı

Genel cinsiyet dağılımı sonuçlarının yanı sıra, her bir il için kendi çapında yine cinsiyet dağılımına ait istatistiksel veriler hesaplanmıştır. (Çizelge 3.3)

Çizelge 3.3 İllere göre HEV Total Antikor Pozitif Örneklerin Cinsiyet Dağılımı

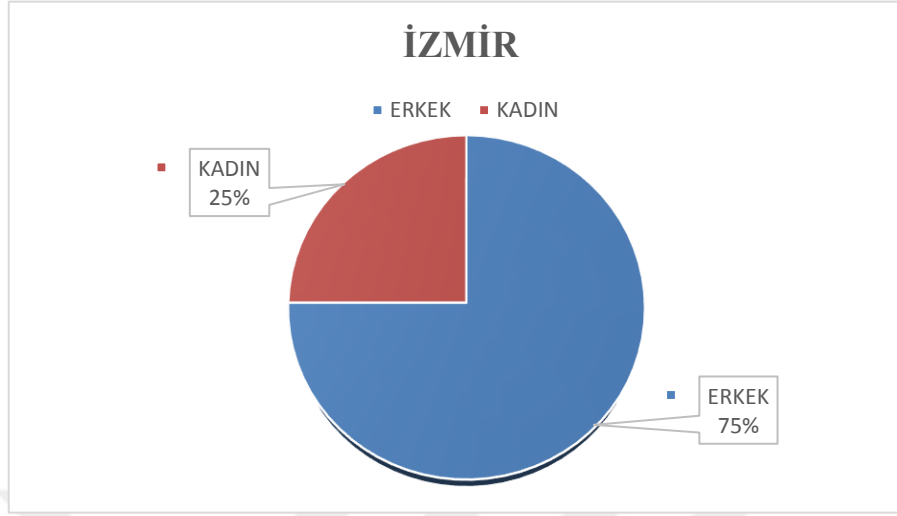
ÖRNEK İLLER	TOPLANAN	POZİTİF ÖRNEKLER CİNSİYET DAĞILIM		
		ERKEK	KADIN	TOPLAM
ANKARA		61 (%79,22)	16 (%20,78)	77
İZMİR		15 (%75,00)	5 (%25,00)	20
KAHRAMANMARAŞ		29 (%96,67)	1 (%3,33)	30
MALATYA		26 (%100)	0 (%0,00)	26
VAN		35 (%100)	0 (%0,00)	35
KAYSERİ		17 (%94,44)	1 (%5,56)	18
TOPLAM		183 (%88,83)	23 (%11,16)	206

Bu verilere göre Ankara ilinde toplam 77 adet HEV total antikor seropozitif örnekten 61 (%79,22) tanesi erkek olarak tespit edilirken, 16 (%20,78) tanesi ise kadın olarak belirlenmiştir (Şekil 3.7).



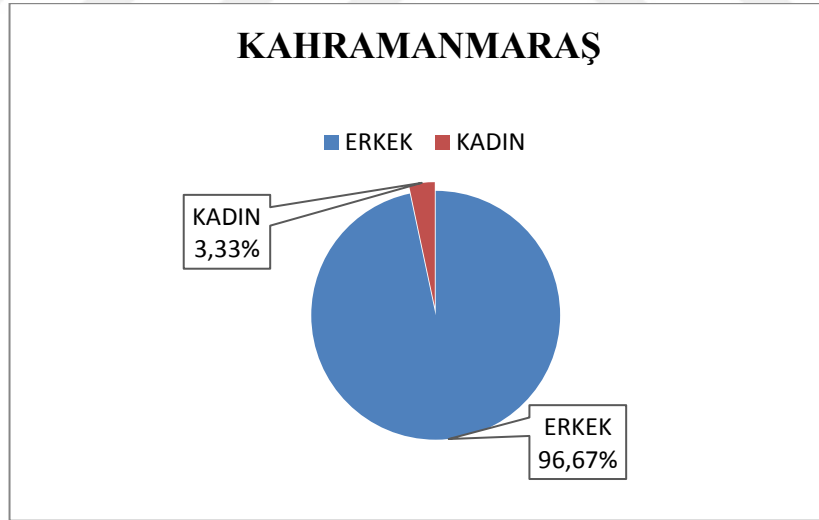
Şekil 3.7 Ankara ilindeki HEV Total Antikor Pozitif Örneklerin

İzmir ilinde toplam 20 tane HEV total antikor seropozitif örnekten 15 (%75) kişi erkek olarak tespit edilirken, 5 (%25) kişi kadın olarak belirlenmiştir (Şekil 3.8).



Şekil 3.8 İzmir ilindeki HEV Total Antikör Pozitif Örneklerin Cinsiyet Dağılımı

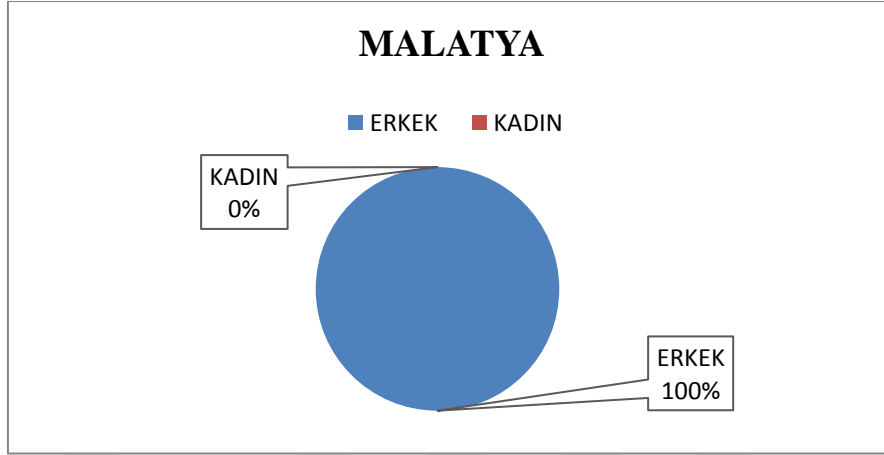
Kan serum örneği topladığımız illerden biri olan Kahramanmaraş ilimizdeki toplam 30 tane HEV total antikör seropozitif örnekten 29 (%96,67) kişi erkek olarak sınıflandırılırken, 1 (%3,33) kişi kadın olarak kaydedilmiştir (Şekil 3.9).



Şekil 3.9 Kahramanmaraş ilindeki HEV Total Antikör Pozitif Örneklerin Cinsiyet Dağılımı

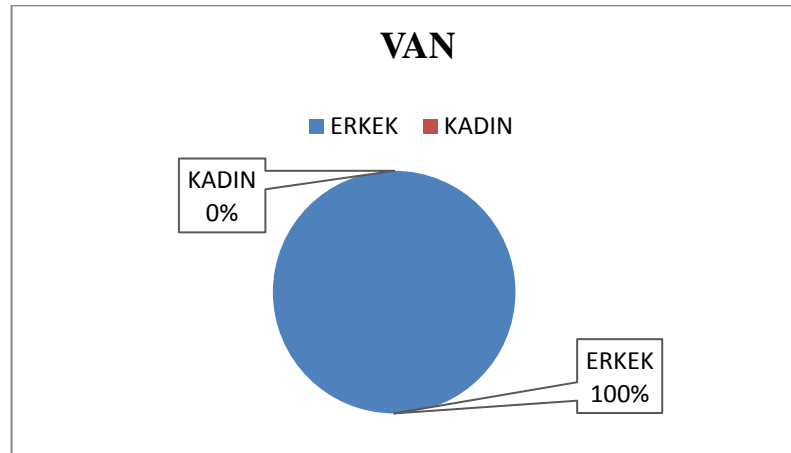
Elimizdeki kan serum örneklerini temin ettiğimiz diğer illerden biri olan Malatya ilimizdeki toplam 26 tane HEV total antikör seropozitif örnekten 26 (%100)

kişi erkek olarak sınıflandırılmıştır. Bu ilimizde seropozitif örneklerden hiç birisi kadın bir donöre ait olmadığı görülmüştür (şekil 3.10).



şekil 3.10 Malatya ilindeki HEV Total Antikor Pozitif rneklerin Cinsiyet Dağılımı

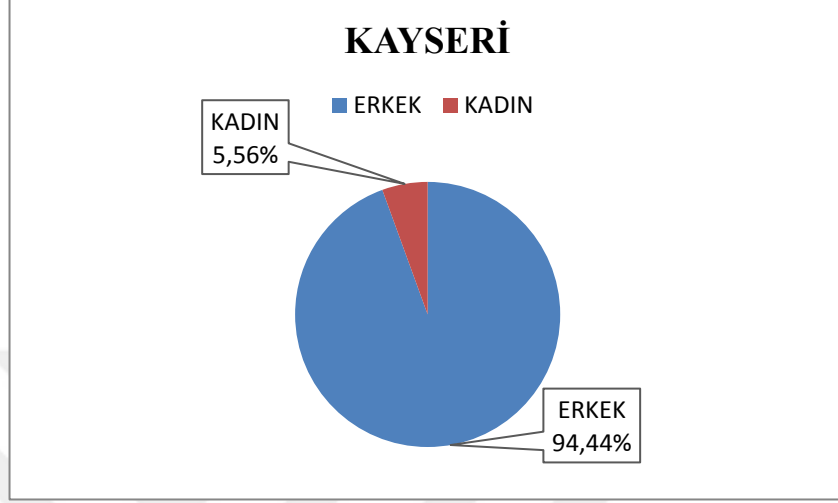
Kan serumu topladığımız diğer illerden başka bir tanesi de ülkemizin en doğusunda bulunan Doğu Anadolu Bölgesi'ndeki Van ilimizdir. Bu ilimizde toplam HEV total antikor seropozitif örnek sayımız 35'tir. Bu ilimizdeki bütün pozitif örneklerimiz erkek kan donörlerine aittir. Bu nedenle hiçbir kadın donörden pozitif sonuç elde edilmemiştir (şekil 3.11).



şekil 3.11 Van ilindeki HEV Total Antikor Pozitif rneklerin Cinsiyet Dağılımı

Elimizdeki verilere göre kan serum rneği toplanılan son ilimiz İç Anadolu Bölgesi'nde bulunan Kayseri ilimizdir. Bu ilimizde toplam 18 adet HEV total antikor

pozitif örnek tespit edilmiştir. Bu seropozitif örneklerden 17 (%94,44) tanesi erkek bir kan donörüne ait olurken, 1 (%5,56) tanesi kadın kan donörüne ait olduğu görülmüştür (Şekil 3.12).



Şekil 3.12 Kayseri ilindeki HEV Total Antikör Pozitif Örneklerin Cinsiyet Dağılımı

3.3 Gönüllü Kan Donörlerinin Yaş Dağılımı

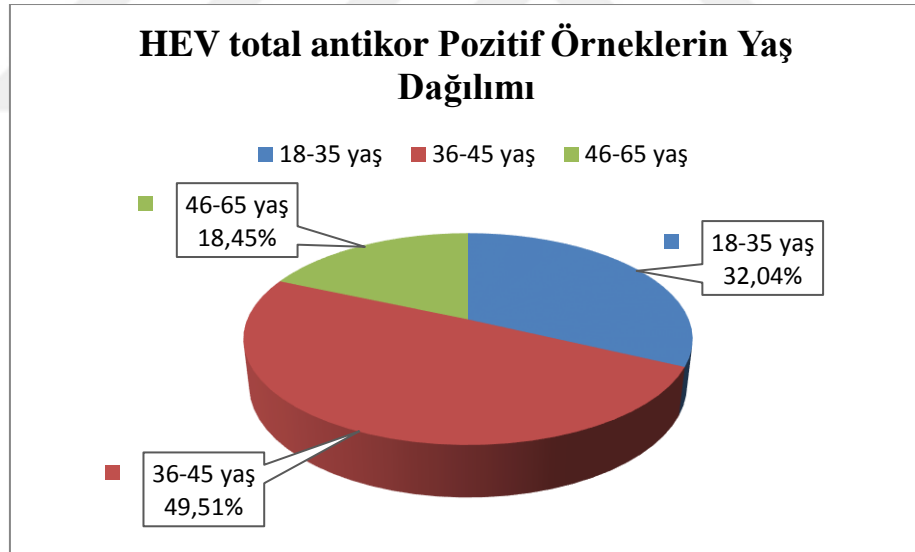
Toplanılan kan serumu örneklerin alındığı kan donörlerinin yaş aralığı 18-65 arasındadır. Bu bilgiler ele alındığında, toplam kan donörlerinin yaş ortalaması $35,8 \pm 1$ olarak hesaplanmıştır.

Diğer bir istatistik çalışması olarak elimizdeki pozitif sonuçlar yönünden kan veren donörlerin yaş grupları üzerine çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre toplam 2011 kan serum örneğinden her iki ticari ELISA kit kullanılarak 206 örneğin ortak pozitif yani her iki ticari kit tarafından pozitif olduğu tespit edilmiştir. Bahsedilen toplam 206 adet HEV total antikör pozitif kan serum örneklerini veren donörler yaş yönünden değerlendirilmiştir. Sonuç olarak Çizelge 3.3'teki istatistik bilgilerine ulaşılmıştır.

Çizelge 3.4 Kan Donörleri Genel HEV Total Antikor Pozitif Örneklerin Yaşa Göre Dağılımı

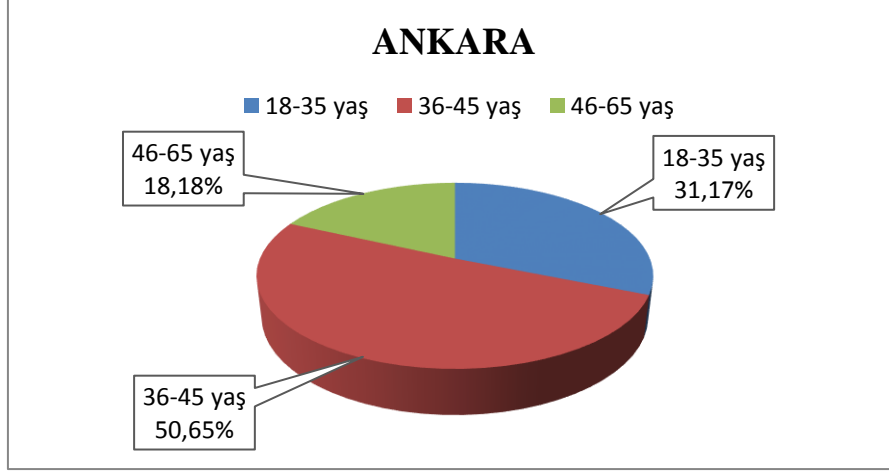
ÖRNEK İLLER	TOPLANAN	POZİTİF ÖRNEKLER YAŞ DAĞILIM			TOPLAM
		18-35 YAŞ	36-45 YAŞ	46-65 YAŞ	
ANKARA		24 (%31,17)	39 (%50,65)	14 (%18,18)	77
İZMİR		7 (%35,0)	10 (%50,0)	3 (%15,0)	20
KAHRAMANMARAŞ		9 (%30,0)	13 (%43,33)	8 (%26,67)	30
MALATYA		8(%32,26)	14 (%54,84)	4 (%12,90)	26
VAN		12 (%34)	17 (%49,0)	6 (%17,0)	35
KAYSERİ		6 (%33,33)	9 (%50,0)	3 (%16,67)	18
TOPLAM		66 (%32,04)	102 (%49,51)	38 (%18,45)	206

Çizelgede yer alan bütün illerdeki seropozitif örnekleri dahil ederek ulaştığımız verilere göre 18-35 yaş arası kan donörlerinin sayısı 66 (%32,04) olarak belirlenirken, 36-45 yaş arasındaki donörlerin sayısı 102 (%49,51) olarak tespit edilmiştir. Son olarak, 46-65 yaş arası donörlerin sayısı ise 38 (%18,45) olarak belirlenmiştir alınmıştır (Şekil 3.13).



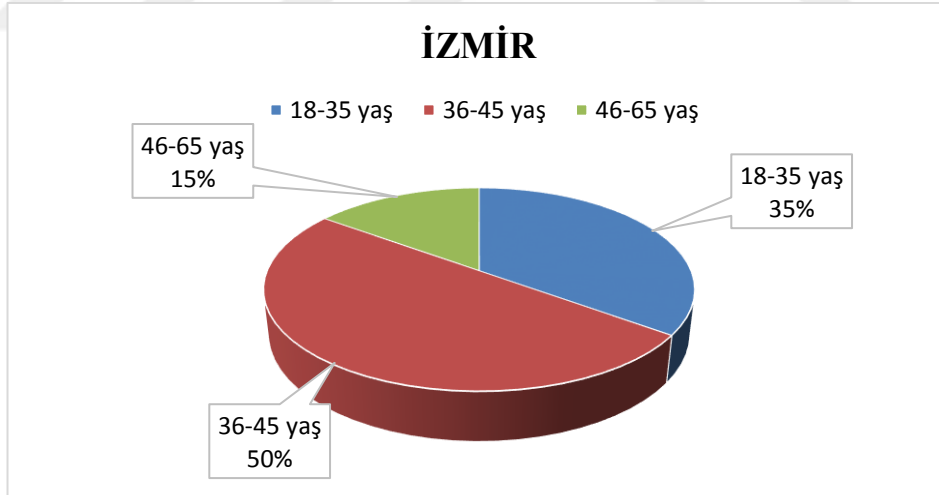
Şekil 3.13 Ülkemizdeki 6 farklı ilden toplanan HEV Total Antikor Pozitif Örneklerin Yaşa Göre Dağılımı

Bu verilere göre İç Anadolu Bölgesi'ndeki Ankara ilinde toplam 77 adet HEV total antikor yönünden seropozitif örnekten 24 kişi (%31,17) 18-35 yaş, 39 kişi (%50,65) 36-45 yaş ve 14 kişi (%18,18) ise 46-65 yaşları arasında olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.14).



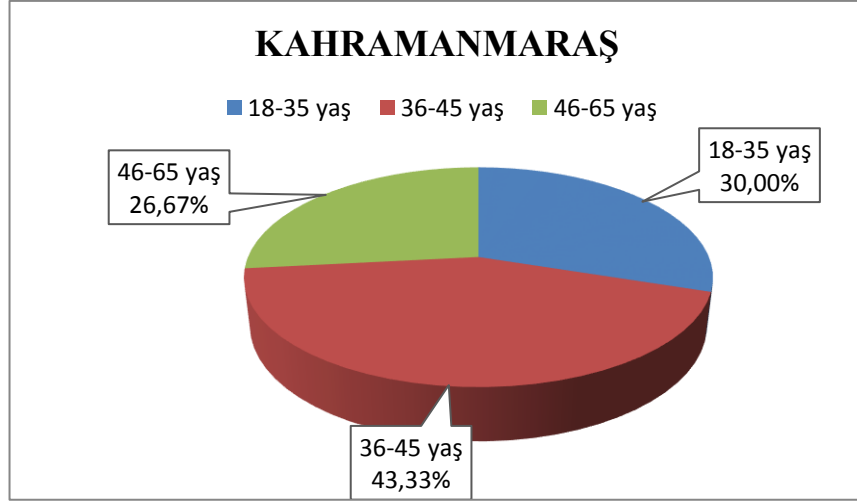
Şekil 3.14 Ankara ilindeki HEV Total Antikör Pozitif Örneklerin Yaşa Göre Dağılımı

Yine elimizdeki aynı verilere göre Ege Bölgesinde bulunan İzmir ilinde toplam 20 tane HEV total antikör yönünden seropozitif örnekten 7 kişi (%35) 18-35 yaş, 10 kişi (%50) 36-45 yaş ve 3 kişi (%15) ise 46-65 yaşları arasında olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.15).



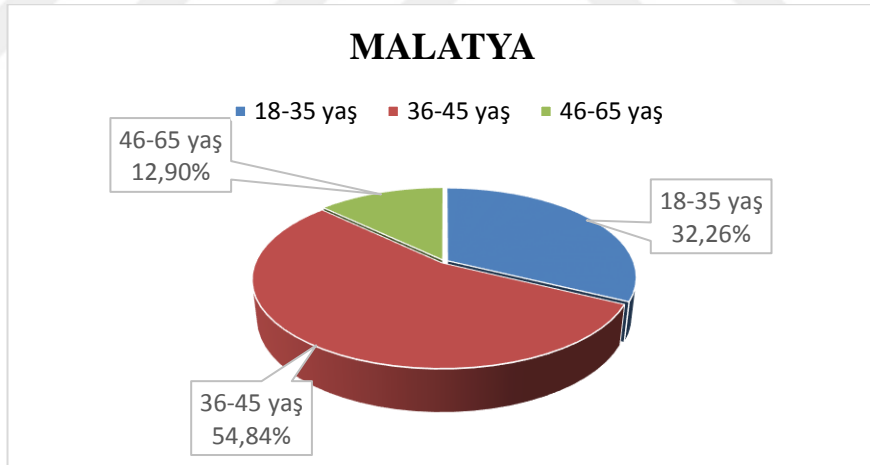
Şekil 3.15 İzmir ilindeki HEV Total Antikör Pozitif Örneklerin Yaşa Göre Dağılımı

Kan serum örneği topladığımız illerden biri olan Kahramanmaraş ilimizdeki toplam 30 tane HEV total antikör yönünden seropozitif örnekten 9 kişi (%30) 18-35 yaş, 13 kişi (%43,33) 36-45 yaş ve 8 kişi (%26,67) ise 46-65 yaşları arasında olduğu gösterilmiştir (Şekil 3.16).



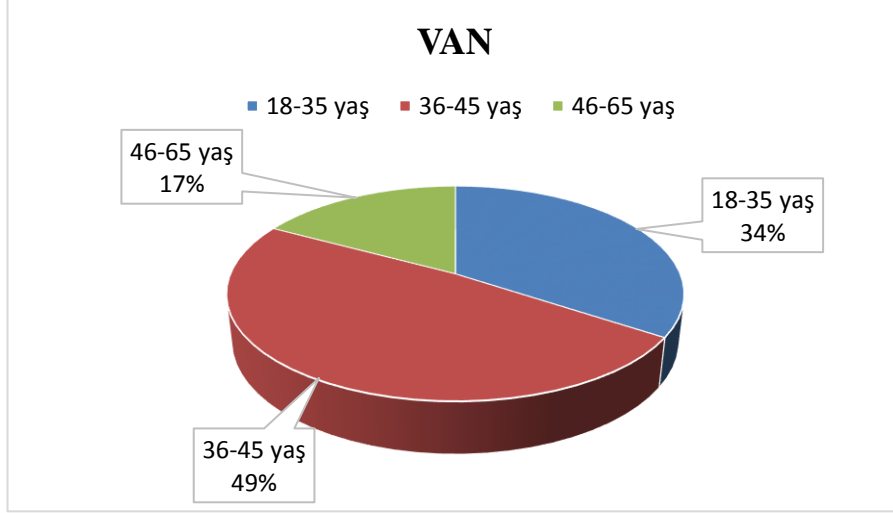
Şekil 3.16 Kahramanmaraş ilindeki HEV Total Antikör Pozitif Örneklerin Yaşa Göre Dağılımı

Elimizdeki kan serum örneklerini temin ettiğimiz diğer illerden biri olan Malatya ilimizdeki toplam 26 tane HEV total antikör yönünden seropozitif örnekten 8 kişi (%32,26) 18-35 yaş, 14 kişi (%54,84) 36-45 yaş ve 4 kişi (%12,90) ise 46-65 yaşları arasında olduğu görülmüştür (Şekil 3.17).



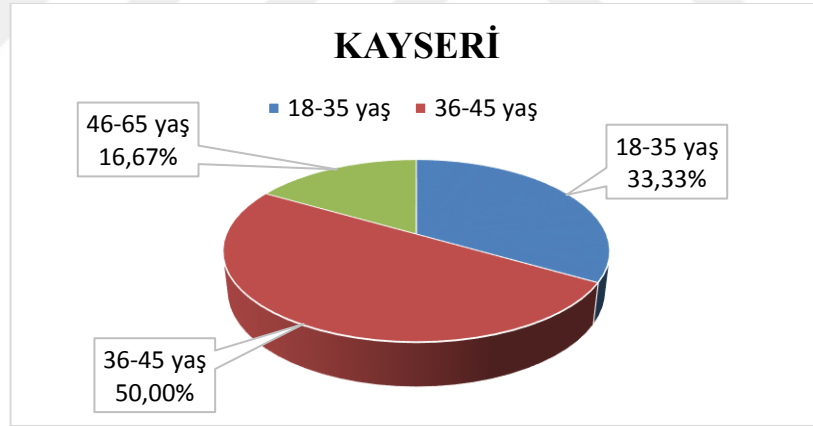
Şekil 3.17.Malatya ilindeki HEV Total Antikör Pozitif Örneklerin Yaşa Göre Dağılımı

Kan serumu topladığımız diğer illerden başka bir tanesi de ülkemizin en doğusunda bulunan Doğu Anadolu Bölgesi'ndeki Van ilimizdir. Bu ilimizde toplam HEV total antikör yönünden seropozitif örnek sayımız 35'tir. Bu ilimizdeki pozitif örneklerimizden 8 kişi (%34) 18-35 yaş, 14 kişi (%49) 36-45 yaş ve 4 kişi (%17) ise 46-65 yaşları arasında olduğu gözlemlenmiştir. (Şekil 3.18).



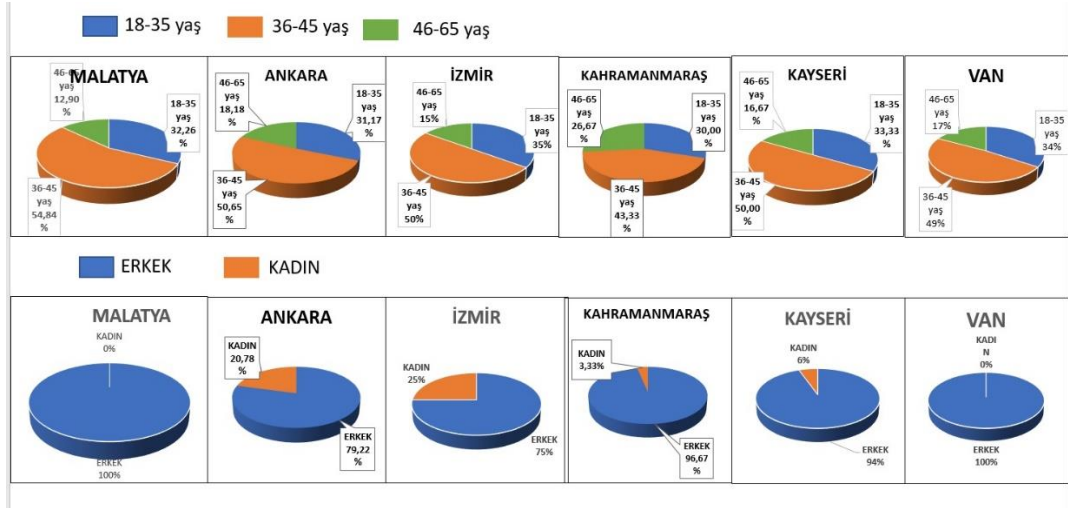
Şekil 3.18 Van ilindeki HEV Total Antikör Pozitif Örneklerin Yaşa Göre Dağılımı

Elimizdeki verilere göre kan serum örneği toplanılan son ilimiz İç Anadolu Bölgesi'nde bulunan Kayseri ilimizdir. Bu ilimizde toplam 18 adet HEV total antikör pozitif örnek tespit edilmiştir. Bu seropozitif örneklerden 6 kişi (%33,33) 18-35 yaş, 9 kişi (%50) 36-45 yaş ve 3 kişi (%16,67) ise 46-65 yaşları arasında olduğu kayıt belirlenmiştir (Şekil 3.19).



Şekil 3.19 Kayseri ilindeki HEV Total Antikör Pozitif Örneklerin Yaşa Göre Dağılımı

Kan donörlerinin ELISA pozitif örneklerin cinsiyet ve yaş genel karşılaştırması yapılmıştır (Şekil 3.20). Pozitif sonuç veren kan donörlerinin çoğunluğunun 36-45 yaş aralığındaki erkek vericilerden oluştuğu görülmüştür.

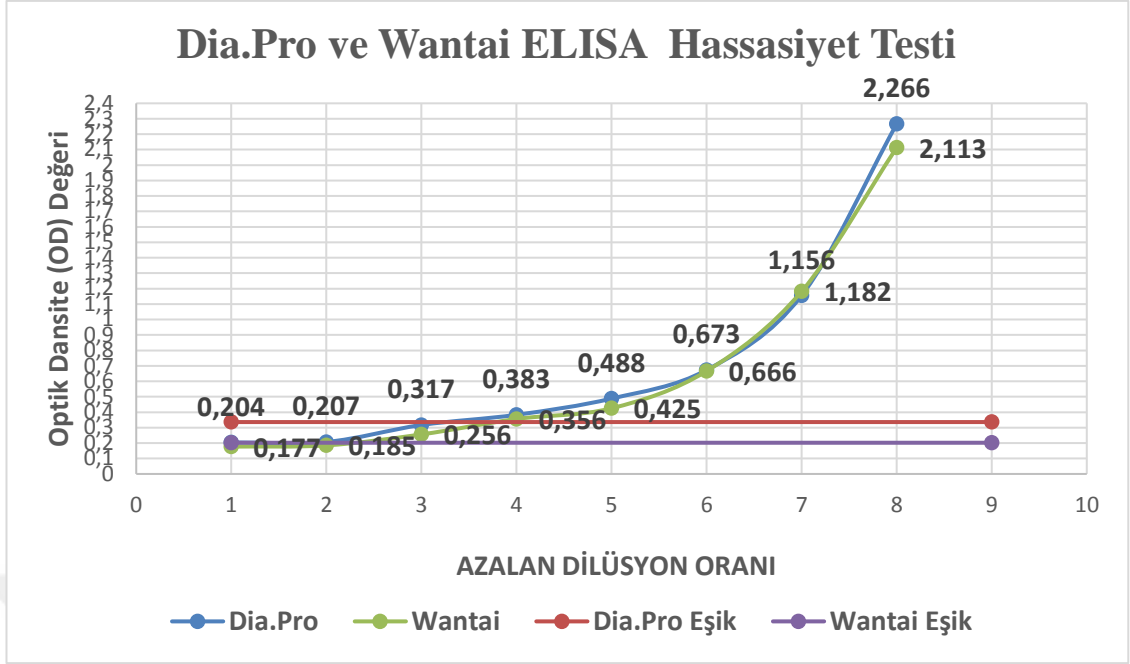


Şekil 2.20 ELISA pozitif örnekler cinsiyet ve yaş genel karşılaştırma

3.4 Dia.Pro ve Wantai HEV total antikor ELISA Kitleri Hassasiyet Testi

Bu çalışmamızda ayrıca her iki kit için de hassasiyet deneyi yapılmıştır. Bunun için Dünya Sağlık Örgütü'nden temin edilen Anti-HEV serumunu 1/10'dan başlayarak 1/1000 oranında kadar dilüsyon yapılmıştır. Daha sonra bu farklı oranlarda serum içeren örnekler iki farklı kit kullanarak ELISA testi uygulanmıştır. Bu çalışmada 3 adet negatif kontrol kullanılarak "cut-off" eşik değerleri hesaplanmıştır.

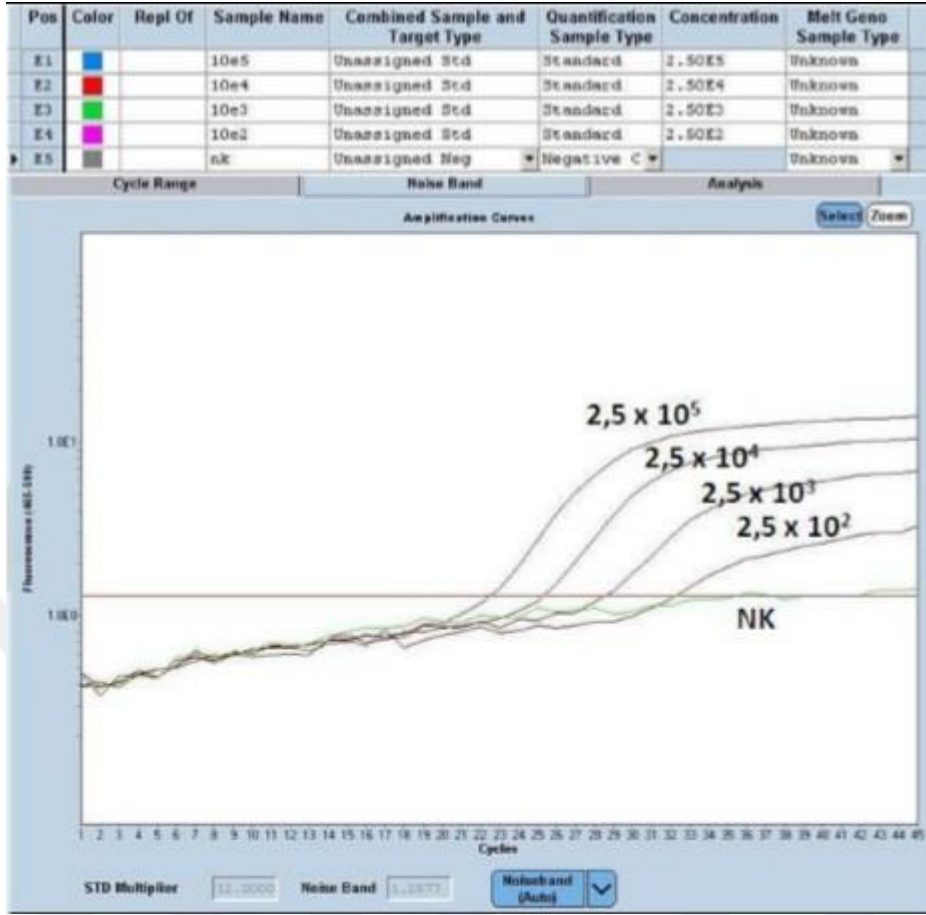
Yapılan çalışmada sonuç olarak iki kit arasındaki hassasiyet farkı belirlenmiştir. Şekil 3.20'de gösterildiği gibi Dia.Pro için 1/10'dan 1/600 oranındaki kuyucuğa kadar sonuçlar eşik değeri üzerinde yani pozitif olarak okunmuştur. Wantai kitindeyse 1/10'dan 1/700 dilüsyon oranındaki kuyucuktaki serum örneğine kadar sonuçlar eşik değeri üzerinde yani pozitif sonuç alınmıştır. Sonuç olarak uluslararası ünite olarak değerlendirildiğinde Wantai kitinin yakalayabildiği en küçük değer 0,14 IU/ml olarak çıkarken Dia-pro kitinin en düşük pozitiflik yakalama değeri 0,16 IU/ml olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.21 Dia.Pro ve Wantai ELISA Kitleri Hassasiyet Testi

3.5 Gerçek zamanlı PZR sonuçları

HEV total antikor enzime bağlı immunosorbent testi (ELISA) neticesinde her iki kit tarafından pozitif bulunan 206 örnek, sadece Wantai kiti tarafında pozitif bulunan toplam 37 örnek ve sadece Dia.Pro kiti tarafından pozitif bulunan 22 örnek toplamda 265 örnek HEV RNA saptaması için gerçek zamanlı PZR yöntemi ile çalışılmıştır. Çalışmada bütün deneylerde GAPDH pozitif bulunmuştur. GAPDH pozitif çıkmayan deneyler tekrarlanmıştır. Gerçek zamanlı PZR çalışmasında en düşük viral yük yakalama seviyesi $2,5 \times 10^2$ olarak gerçekleşmiştir (Şekil 3.21). Çalışma sonucunda hiçbir örnekte HEV RNA pozitifliği saptanamamıştır.



Şekil 3.22 RT-PZR optimizasyon çalışması sonucu

4. TARTIŞMA

HEV günümüzde karaciğer enfeksiyonuna yol açan hatta gelişmekte ve sağlık bilgisi yönünden zayıf Asya, Orta Doğu ve Kuzey Afrika ülkelerinde salgına yol açan bir virüs tipidir. Önemli bir oranda da sporadik hepatit olgularının sebebidir. HEV enfeksiyonuna bağlı olarak özgün IgM, IgG ve IgA tipi antikorlar oluşmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) yıllık yayınlarında dünyada yaklaşık 20 milyon HEV enfeksiyonu görüldüğü ve bunların yaklaşık 3,3 milyonunun semptomatik Hepatit E vakası olduğunu ve 56 600'ünün de ölümle sonuçlandığını belirtilmektedir (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs280/en/> Erişim Tarihi: 05.06.2017). Bu nedenle HEV enfeksiyonu önemini korumakta ve hastalığın tanısında doğru sonuç önem kazanmaktadır.

Dünya genelinde HEV seroprevalansı bölgelere ve ülkelere göre farklılıklar göstermektedir. Bu farklılıkların önemli nedenleri bölgelerin coğrafik koşulları ve ülkelerin sosyoekonomik yönleri olarak rapor edilmiştir. (Aggarwal ve ark.,2009, Kamar ve ark., 2014, Teshale ve ark., 2011). Örneğin, gelişmekte olan yani sosyo ekonomik düzeyi oldukça düşük ülkelerde HEV seroprevalansı; Mısır'da %17,2, Suudi Arabistan'da %8,4, Yemen'de %33, Tayland'da 15.7, Hindistan' da %50, Nepal' de %16-31, Somali'de %78 olarak bildirilmiştir (Darwish ve ark., 1996, Clayson ve ark.,1997, Kmush ve ark., 2013 ve Aggarwal ve ark., 1997). Bu örneklere ek olarak, refah seviyesi yüksek olan gelişmiş ülkelerde ise ABD'nde %2.1, Avustralya'da %0.4, İngiltere'de %3.9, İspanya'da %5.5 ve Yunanistan'da %2.2 oranlarında yani çok daha düşük olarak rapor edilmiştir (Kamar ve ark., 2014, Aggarwal ve ark., 1997, Pischke ve ark.,2014, Lewis ve ark.,2010, Christou ve ark.,2013).

Ülkemizde ise ilk defa Thomas ve ark. tarafında 1993 yılında yapılan ve en son 2013 yılında Cevahir ve ark. tarafından tekrar değerlendirilen araştırmalarda ülkemizin HEV seroprevalansı %0 ile %54 arasında oldukça farklı sonuçlar elde edilmiştir (Çizelge 1.2). Bu yapılan çalışmalardaki farklılıkların sebepleri; çalışma yapılan bölgelerin, yaş gruplarının, kan donörlerinin ve cinsiyet dağılımının farklı

olmasıdır. Günümüze kadar yapılan bütün bu çalışmalar değerlendirildiğinde, özellikle de yüksek örnek sayılı araştırmalar dikkate alındığında ülkemizin ortalama HEV seroprevalans oranı %6-7 civarında olduğu gösterilmiştir (Thomas ve ark.,1993, Badur ve ark.,1995, Çetinkaya ve ark.,1996).

Bir RNA virüsü olan HEV için araştırmalarda kullanılmak üzere geliştirilmiş bir hücre kültürü sistemi olmaması nedeniyle antikor tespiti için sentetik polipeptitler ve rekombinant proteinler kullanılmaktadır. Polipeptidlerin bağlanma kapasitelerinin proteinlere oranla daha düşük olsa da rekombinant proteinlere göre daha fazla tercih edilmektedir. Bunun nedeni rekombinant proteinlerin üretiminde kullanılan sistemlerin farklılığı (Escherichia coli, böcek hücreleri, bitki hücreleri ve Trichoplusia (güve)) gibi nedenlerle kullanılan farklı kitlerde alınan sonuçların oldukça farklı olmasıdır. (Bendall ve ark.,2010). Bu nedenle, rekombinant proteinlere göre zayıf epitop yapısına rağmen, polipeptit temelli sistemler tercih edilerek virüs genomunun en korunmuş bölgesi kullanılır. HEV genomunun en korunmuş bölgesi olan ORF2 ve ORF3 bölgelerinden elde edilen polipeptitler kullanılarak son zamanlarda geliştirilen kitlerin yüksek duyarlılığı yapılan uluslararası çalışmalarla gösterilmiştir (Bendall ve ark.,2010).

Bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre HEV seroprevalansı Türkiye’de farklı iki ticari kit ile çalışıldığında %11,34 (Dia.Pro, İtalya)- %12,08 (Wantai, Çin) olarak bulunmuştur. İllere göre elde edilen sonuçlar ise Dia.Pro ve Wantai sırsına göre Ankara %12,01 - %12,51, Kayseri %6,99 - %7,81, Malatya %14,50 – %15,55, İzmir %8,07 - %9,65, Kahramanmaraş %14,5 – %15,5 ve Van %11,91 - %12,99 olarak belirlenmiştir. Yapılan χ^2 testi sonuçlarına göre Ankara, Malatya ve Van illerinde 36-45 yaş arasında pozitif sonuç verme olasılığı 46-65 yaş aralığındaki gruba oranla istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Bunun da en önemli nedeni örneklerin kan donörlerinden alınmış olması ve donörlerin de çoğunluğunun 36-45 yaş arasında olmasıdır. HEV total antikor dağılımı kadın (%17,48) ve erkek (%82,52) cinsiyetleri arasında anlamlı bir farklılık bulunmuştur. ($p<0,01$). Bunun nedeni çalışmamızda kullandığımız serum örneklerinin gönüllü kan donörlerinden alınmış olmasıdır. Çünkü bir donörden kan alınabilmesi için vericinin

yeterli hemoglobin seviyesine sahip olması gereklidir. Ülkemizde kadınlardaki hemoglobin seviyesi kan donörü olmak için yeterli olmaması nedeniyle, kadınlar donör olarak seçilmemektedir.

Anti-HEV seropozitifliği ile ilgili olarak, ülkemizde 1993 yılında Thomas ve ark. tarafından yapılan ilk çalışmada, toplanan serum örneklerinde %5,9 oranında antikor pozitifliği bildirilmiş ve HEV enfeksiyonları açısından Türkiye, endemik olarak değerlendirilmiştir. Ülkemizde yapılan, tüm çalışmalar genel olarak özetlendiğinde, normal erişkin popülasyonda HEV-IgG seropozitifliğinin %3-11 arasında değiştiği görülmektedir (Çizelge 1.2). Bu seroprevalans oranının çocuk yaş gruplarında daha düşük olduğu (%0-6); doğu ve güneydoğu illerimizde ise daha yüksek sonuçların (%13-30) saptandığı görülmektedir. Çizelge 1.2’de gösterilen yayınlara göre ülkemizin sağlıklı bireyleri arasında yapılan çalışmalarda Eker ve arkadaşları Edirne’de %2.4; Aydın ve arkadaşları Trabzon’da %3; Özacar ve arkadaşları İzmir’de %3.5; Yavuz ve arkadaşları Van’da %4.3; Aldeniz ve arkadaşları İstanbul’da %4.8; Olcay ve arkadaşları Ankara, Manisa ve Diyarbakır’da %6.3; Çetinkaya ve arkadaşları Ankara’da %7.6; Sönmez ve arkadaşları Malatya’da 16-30 yaş grubunda %13.3; Ertek ve arkadaşları Erzurum’da %10.3; Göral ve arkadaşları Bursa’da %10.4; Kaleli ve arkadaşları Denizli’de %11.3; Gültekin ve arkadaşları Antalya’da %11.7; Saltoğlu ve arkadaşları ise Adana’da %17.8 oranlarında IgG antikor pozitifliği bulunduğu gösterilmiştir.

Bu çalışmada Ankara’da Dia.Pro ve Wantai kitleri sonuçlarına göre sırasıyla %12,01 ve %12,51 sonuçları elde edilmiştir. Çizelge 1.2’de verilmiş olan Ankara’da yapılan çalışma sonuçlarına göre; 1996 yılında Çetinkaya ve arkadaşları kan donörlerinde %7,6; Tülek ve arkadaşları 1997 yılında, erişkinlerde %6.4; Cesur ve arkadaşları 2002 yılında hastaneye başvuran yetişkinlerde %3.8 ve Maral ve arkadaşları 2003 yılında ilkokul öğrencilerinde %1.7-2.1 oranında seropozitiflik göstermişlerdir. Bu çalışma sonuçlarına göre Ankara ili HEV seroprevalans ortalamasını %12 olarak ele aldığımızda, geçmiş yıllarda yapılmış çalışmalara oranla sonucun yüksek olduğunu görmekteyiz. Ancak, 2001 yılında Bozdayı ve ark. tarafından hemodiyalizli hastalar üzerinde yapılan çalışmada Dia.Pro kiti ile çalışma

yapılmış ve %16 oranında bir anti-HEV seropozitifliği bulunmuştur. Bunun nedeni hasta grubunun HEV ile enfekte olma olasılığının sağlıklı kişilere göre oldukça yüksek olan hemodiyaliz hastalarından oluşmuş olması olabilir.

İzmir'den toplanan serumlardan elde edilen sonuçlar Dia.Pro ve Wantai kitleri için sırasıyla %8,07 ve %9,65 anti- HEV seropozitifliği vermiştir. İzmir ilinde Özacar ve ark., Aksu ve ark., Karaayak Uzun ve ark. tarafından sırasıyla 1994, 1998 ve 2012 yıllarında yapılan çalışmalarda HEV seroprevalans oranları %3,5, %7 ve %6,7 olarak bulunmuştur (Çizelge 1.2). Bu sonuçlar karşılaştırıldığında 2012 yılından 2016 yılı sonuna kadar İzmir bölgesindeki bireylerin HEV virüsüyle karşılaşmalarında ve anti-HEV seropozitifliğinde önemli bir yükselme olduğu görülmektedir.

Anti-HEV seroprevalans tespiti için 1994 ve 1998 yıllarında yapılan çalışmalarda Abbott Diagnostic (ABD) firmasına ait kitler kullanılmıştır. Uluslararası yayınlarda bu kitin Genlab (BK) kiti ile aynı hassasiyete sahip olduğu gösterilmiştir (Myint ve ark.,2006). Bu çalışmada kullanılan Wantai (Çin) kitinin ise Genlab (BK) kiti ile karşılaştırıldığında oldukça yüksek hassasiyete sahip olduğu uluslararası yayınlarda gösterilmiştir (Bendall ve ark.,2010) Bu nedenle İzmir'deki son yıllarda görülen yüksek anti-HEV pozitifliğinin nedeni çalışmada kullanılan kitlerin yüksek duyarlılığından kaynaklandığı düşünülebilir.

Bu araştırmada Van'dan kan donörlerinden alınan serumlardan elde edilen sonuçlara göre Dia.Pro ve Wantai kitleri için sırasıyla %11,91 ve %12,99 HEV seropozitifliği bulunmuştur. Daha önce Bozkurt ve ark. (2000), Güdücüoğlu ve ark. (2000) ve Bayhan ve ark. tarafından (2016) yapılmış çalışmalara göre HEV seroprevalansı sırasıyla %7,5, %3,7 ve %4,2 olarak bulunmuştur. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonucu ortalama olarak %12,5 olarak aldığımızda daha önce yapılan çalışmalara kıyasla sonucun oldukça yüksek olduğu görülmüştür. Güdücüoğlu ve ark. tarafından 2000 yılında yapılan çalışmanın sadece gebe olan genç yaştaki kadınlardan alınan örnekler kullanılarak yapılması nedeniyle anti-HEV sonucunun düşük olduğu düşünülebilir. Aynı şekilde 2016 yılında Bayhan ve ark. tarafından

yapılan çalışmada Dia.Pro kiti kullanılarak sadece 0-18 yaş aralığındaki kişilerden alınan örnekler ile çalışılmış olduğundan düşük anti-HEV pozitifliği bulunduğu düşünülmektedir. Ülkemizdeki ve uluslararası yayınlarda örnek alınan kişilerin yaş ortalaması arttıkça anti-HEV pozitifliğinin de aynı paralellikte arttığı gösterilmiştir (Eker ve ark., 2009). Bozkurt ve ark. tarafından 2000 yılında yapılan çalışmada ise GiulianaDiagnostics.r.l. (İtalya) kiti kullanılmıştır. Dia.Pro (İtalya) ve Wantai (Çin) kitleri tasarlanırken HEV genomunun özgün bölgeleri hedef alınarak üretim yapılmıştır ve bu nedenle hassasiyet oldukça yüksektir. GiulianaDiagnostics.r.l. (İtalya) kitinde herhangi bir özgün bölgenin hedef alınmaması nedeniyle hassasiyetinin oldukça düşük olması ve bu sebeple bu kit kullanılarak 2000 yılında yapılan çalışmanın sonucunun düşük olduğu düşünülmektedir.

Malatya'dan toplanan serumlardan yapılan çalışmaya göre Dia.Pro ve Wantai kitleri sonuçlarına göre HEV seroprevalans sonuçları sırasıyla %14,50 ve %15,55 bulunmuştur. Sönmez ve ark. tarafından 1995 yılında yapılan çalışmada 8-15, 16-30 ve 31-50 yaş gruplarında bulunan sırasıyla %2,5, %13,3 ve %10 seroprevalans oranları ve Otlu ve ark. tarafından 2001 yılında bulunan %9,7 seroprevalans oranı ile çalışmamızda elde ettiğimiz sonuç değerlendirildiğinde; çalışmamızdaki sonuç diğer sonuçlardan yüksek olduğu görülmektedir. Sönmez ve ark. tarafından 8-15 yaş grubu ile yapılan çalışma sonucunda seropozitifliğinin çok düşük çıkması, çalışma gruplarının yaş ortalamasının düşük olmasına bağlı olabilir. Malatya'da HEV seroprevalansı bu çalışmaya göre artmış gözükmemektedir. Bu artışın sebebi hijyen koşulları olabileceği gibi çalışmalarda kullanılan ticari kitlerin hassasiyetlerindeki farklılıklar da olabilir. Sönmez ve ark. tarafından 1995 yılında yapılan çalışmada Abbott Diagnostic (ABD) firmasına ait anti-HEV kiti, Otlu ve ark. tarafından 2001 yılında yapılan çalışmada ise Giuliana Diagnostic s.r.l. (İtalya) kiti kullanılmıştır. Daha önce de değinildiği gibi bu kitlerin hassasiyetinin yapılan uluslararası yayınlarda düşük bulunmuş olması da sonuçlar arasındaki farklılığın sebebi olarak düşünülebilir (Myint ve ark.,2006).

Araştırmada Kayseri'den toplanan serumlardan elde edilen sonuçlar Dia.Pro ve Wantai kitleri için sırasıyla %6,99 ve %7,81 anti- HEV seropozitifliği sonuçları elde

edilmiştir. Kılıç ve ark. tarafından 1999 yılında hemodiyaliz hastalarından alınan örneklerden yapılan çalışmada anti-HEV pozitifliği %5,7 bulunurken, sağlıklı bireylerde %1,6 bulunmuştur. Kayseri’de 1999 yılında yapılan çalışmada Abbott Diagnostic (ABD) firmasına ait kit kullanılmıştır. İzmir’deki 1994 ve 1998 yılında yapılan çalışmalarda kullanılan aynı Abbott kitinin hassasiyetinin çok düşük olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle bu çalışmada elde ettiğimiz yüksek sonuçların hassasiyet yönünden yüksek olan kitlerin kullanılmasından kaynaklandığı düşünülebilir.

Kahramanmaraş’tan toplanan kan serumları kullanılarak elde edilen sonuçlar Dia.Pro ve Wantai kitleri için sırasıyla %14,5 ve %15,5 bulunmuştur. Yapılan literatür araştırmasında daha önceki yıllarda Kahramanmaraş bölgesinde yapılan bir çalışmaya rastlanmadığı için, bu araştırma sonuçları bölgenin anti-HEV seroprevalans sonuçları açısından ilk bilgi olarak belirlenmiştir.

Çalışma sonuçlarına göre ülkemizde HEV seroprevalans oranı batıdan doğuya gittikçe artmaktadır. Bunun nedeni olarak birinci sırada doğu illerimizdeki çarpık şehirleşme sonucu olarak yetersiz altyapı nedeniyle temiz su kaynaklarının kirlenmesi gelmektedir (Olcay ve ark., 2003 ve Aydın ve ark., 2007). Bu nedenle virüslerin fekal-oral yol ile enfeksiyonlara yol açması kolaylaşmaktadır. Sosyoekonomik, kültürel düzey ve bireylerin kişisel hijyen bilgisi düzeyi de diğer sebepler arasında düşünülmektedir.

Sonuçların iki farklı ticari ELISA kiti ile yapılmış olması ve sonuçların birbirine oldukça yakın çıkması deney sonuçlarının doğruluğunu desteklemektedir. Ayrıca bu sonuçlar, son dönemde yüksek hassasiyeti ile uluslararası yayınlarda ön plana çıkmış olan Wantai kitinin ülkemiz laboratuvarlarında çalışılan Dia.Pro kiti ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak çok anlamlı bir farkının olmadığını göstermiştir. Ancak bu çalışma ile Wantai kitinin yüksek duyarlılığı da bir kere daha gösterilmiştir.

Wantai ve Dia.Pro HEV total antikor kitlerinin hassasiyetlerinin belirlenmesi ve karşılaştırılması amacı ile hassasiyet testi yapılmıştır. Bunun için Dünya Sağlık

Örgütü'nden temin edilen anti-HEV serumunu 1/10'dan başlayarak 1/1000 oranına kadar dilüsyonlar yapılmıştır. Daha sonra bu farklı oranlarda serum içeren örnekler iki farklı kit kullanarak ELISA testi uygulanmıştır. Bu çalışmada 3 adet negatif kontrol kullanılarak eşik değerleri hesaplanmıştır. Yapılan çalışmada sonuç olarak iki kit arasındaki hassasiyet farkı belirlenmiştir. Şekil 3.20'de gösterildiği gibi Dia.Pro için 1/10'dan 1/600 oranındaki kuyucuğa kadar sonuçlar eşik değeri üzerinde yani pozitif olarak okunmuştur. Wantai kitindeyse 1/10'dan 1/700 dilüsyon oranındaki kuyucuktaki örnek eşik değeri üzerinde yani pozitif sonuç alınmıştır. Yani Wantai kitinin yakalayabildiği en küçük değer 0,14 IU/ml olarak çıkarken Dia.Pro kitinin en düşük pozitiflik yakalama değeri 0,16 IU/ml olarak belirlenmiştir. Araştırma esnasında yapmış olduğumuz bu hassasiyet çalışmasında, Wantai ticari kitinin açık olarak Dia.pro kitine göre hassasiyetinin istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte yüksek olduğu sonucuna varılmıştır. Wantai kiti ile yapılan çalışmada Dia.pro kitine göre daha düşük eşik değeri elde edildiği için pozitif örnek yakalama olasılığı artmaktadır ve bu durum Wantai kitinin daha düşük yoğunluktaki pozitiflikleri yakalamasını sağlamaktadır.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde; her iki kit tarafından pozitif bulunan kişi sayısı 265, negatif bulunan kişi sayısı 1746 olarak belirlenmiştir. Sadece Wantai kiti tarafından pozitif bulunan kişi sayısı 243 olurken, Dia.Pro kiti tarafından pozitif kişi sayısı 228 olarak sonuçlandırılmıştır. Toplamda 15 kişinin Wantai kiti ile pozitif sonuç verirken Dia.Pro kiti ile negatif sonuç vermiş olması da bu hassasiyet farklılığından kaynaklandığını düşündürmektedir. Ancak sadece Wantai kiti tarafından pozitif olup, Dia.Pro kiti tarafından negatif olarak bulunan 37 ($243-206 = 37$) kişi vardır. Aynı şekilde sadece Dia.Pro kiti tarafından pozitif bulunan ama Wantai kiti tarafından negatif bulunan kişi sayısıysa 22 ($228-206 = 22$) olarak belirlenmiştir. Bu durumun nedeni olarak Wantai kitini daha hassas olduğunu belirlediğimiz için Wantai kitinde pozitif olan ve Dia.Pro kitinde negatif olan 37 kişinin bu hassasiyet nedeniyle Wantai tarafından pozitif yakalandığı düşünülebilir. Ancak Dia.Pro kitinde pozitif olan ama Wantai kitinde negatif olarak belirlenen 22 kişinin, Dia.Pro kiti tarafından çapraz reaksiyon sonucu veya yalancı pozitiflik sonucu pozitif olarak yakalandığı düşünülmektedir. Bu çalışmayı kitlerin duyarlılığı

açısından değerlendirdiğimizde iki kit arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı açık bir şekilde görülmektedir ($p>0,05$).

Araştırmada ELISA çalışması ile birlikte gerçek zamanlı PZR optimizasyon çalışması da yapılmıştır. HEV birincil referansı olarak kullanılan HEV RNA materyali optimizasyon sırasında standart olarak kullanılmıştır. Gerçek zamanlı PZR çalışmasında en düşük viral yük yakalama seviyesi $2,5 \times 10^2$ olarak gerçekleşmiştir. HEV total antikor enzime bağlı immünosorbent testi (ELISA) neticesinde her iki kit tarafından pozitif bulunan 206 örnek, sadece Wantai kiti tarafında pozitif bulunan 37 örnek ve sadece Dia.Pro kiti tarafından pozitif bulunan 22 örnek toplamda 265 örnek HEV RNA saptaması için Roche Lightcycler 480 cihazı kullanılarak gerçek zamanlı PZR yöntemi ile çalışılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda, iç kontrol olarak kullanılan GAPDH ve HEV RNA standartları (en az $2,5 \times 10^2$) pozitif sonuç vermesine rağmen donörlere ait hiçbir örnekte HEV RNA pozitifliği bulunamamıştır. Bunun en önemli nedeninin HEV ile bulaşma olduktan sonra 1 ya da 2 ay gibi çok kısa süreli bir akut dönemde kanda pozitif olarak bulunabilen HEV RNA'nın, hastalardan kan alındığı dönemde negatifleşmiş olması ihtimalidir. Çünkü Şekil 1.7'de da görüldüğü gibi hastalığın akut faz döneminde kanda RNA viral yükünün yükselme süresi 1-2 ay ile sınırlıdır. Bir diğer sebebinde vücuda giren virüsün bu kişilerde pencere döneminde olması veya bu dönemde viral yükün enfekte olan kişide $2,5 \times 10^2$ 'den daha az olması ihtimali olabilir. Bununla birlikte örnekler, kan donörlerinden, yani toplumda sağlıklı olarak nitelendirilen bireylerden alınmıştır. Tüm bu nedenlerle HEV RNA'nın pozitif bulunamamış olması olası bir durumdur. Hoaro ve ark., 2008 yılında yaptığı bir çalışmada 70 örnekte anti-HCV pozitif çıkmasına rağmen HCV RNA negatif çıkmıştır. Uzun bir takip sonrasında bu kişilerden 9 tanesi HCV RNA pozitive dönmüştür. Bu 70 kişiden karaciğer biyopsisi alınarak inceleme yapıldığında bu kişilerden sadece 5 kişide normal sonuç elde edilmiştir. Geri kalan kişilerde fibrosis gelişimi gösterilmiştir. Bu çalışmada da buna benzer şekilde hiçbir hastada HEV RNA pozitif sonuç bulunamamıştır. Gerçek zamanlı PZR çalışmasında iç kontrol olarak bir "housekeeping" gen olan GAPDH ve HEV RNA standartlarının kullanılması çalışma sonucu elde edilen sonucun güvenilirliğini artırmaktadır.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre yılda yaklaşık olarak 20 milyon HEV kaynaklı enfeksiyon görülmektedir. Bu enfeksiyonlardan 3,3 milyon kişide enfeksiyona bağlı semptomlar görülmektedir ve sonuç olarak hepatit E virüsüne bağlı olarak 56.600 kişide ölüm gerçekleşmektedir (Rein ve ark.,2012 ve Lozano ve ark.,2012). HEV çoğunlukla kendi kendine iyileşen ve asemptomatik olarak görülmesine rağmen, nadiren akut karaciğer yetmezliğine sebep olabilen bir virüstür (Yazıcı,2014).

Türkiye’de farklı şehirlerde daha önce sağlıklı kişiler ve donörler üzerinde yapılan çalışmalarda anti-HEV IgG pozitifliği oranı %3,9-%20 oranları arasında farklılık göstermektedir (Çizelge 1.2). Bu farklılığın; oral fekal yolla bulaşan HEV için çevresel faktörlerin değişiminden kaynaklandığı düşünülmekle birlikte yapılan çalışmalarda kullanılan kitlerin duyarlılıklarına da bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada ülkemizdeki HEV seroprevalansının güncellenmesi ve son dönemlerde yüksek hassasiyeti ile uluslararası yayınlarda ön plana çıkmış Wantai anti-HEV ELISA kiti ülkemizde ilk defa değerlendirilmiş ve yine ülkemizde yaygın olarak kullanılan Dia-Pro kiti ile karşılaştırılmıştır. Bunun için ülkemizin 4 farklı bölgesinden olmak üzere toplam 6 ilden toplanan 2011 kan donörü serumuyla yapılmıştır ve oldukça önemli sonuçlara ulaşılmıştır. Bu çalışmaya göre ülkemizde HEV seroprevalansı farklı iki ticari kit ile çalışıldığında %11,34 (Dia.Pro, İtalya)-%12,08 (Wantai, Çin) olarak bulunmuştur. İllere göre elde edilen sonuçlar ise sırasıyla Dia.Pro ve Wantai kit sonuçlarına göre; Ankara %12,01 - %12,51, Kayseri %6,99 - % 7,81, Malatya %14,50 – %15,55, İzmir %8,07 - %9,65, Kahramanmaraş %14,5 – %15,5 ve Van %11,91 - %12,99 olarak belirlenmiştir. Sonuçların iki farklı ticari HEV Total Antikor ELISA kiti ile karşılaştırmalı olarak yapılmış olması ve sonuçların birbirine yakın çıkması sonuçların güvenilirliğini arttırmaktadır. Kitlerin hassasiyetlerinin karşılaştırılması için yapılan deney sonuçlarına göre Dia.Pro için 1/600 dilüsyon (0,16 IU/mL) eşik değeri üzerinde iken Wantai kitinde bu değer 1/700 (0,14 IU/mL) bulunmuştur. Bu sonuçlara göre Wantai kitinin yüksek

hassasiyeti bir kere daha gösterilmiş olup ülkemiz laboratuvarlarında sıklıkla çalışılan Dia.Pro kiti ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0,05$).

ELISA testi neticesinde en az bir kit için pozitif bulunan 265 örnek için HEV gerçek zamanlı PZR yöntemi ile RNA saptaması için yapılmıştır. Bunun sonucunda hiçbir örnekte HEV RNA pozitifliği bulunamamıştır ve HEV genotipine bakılamamıştır. Bunun nedeninin çalışmaya dahil edilen örneklerin kan donörlerinden alınmış olması olarak düşünülmelidir.

Bu çalışmada seçilen şehirlerden Ankara, İzmir, Kayseri, Van ve Malatya dışında daha önce kan donörleri üzerinde bir HEV seroprevalans çalışması yapılmamıştır. Ankara'da 1996 yılında yapılan çalışma sonuçlarına göre HEV antikor pozitifliği artmış görünmektedir (%7,6'ya karşı %12,55). Aynı şekilde Malatya'da 2001 yılına göre pozitiflik oranında artış söz konusudur (%9,7'ye karşı %15). Benzer şekillerde İzmir ve Van illerimizde de bir artış görülmüştür (Sırayla %6,7'ye karşı %9,65 ve %7,5'e karşı %12,99). Bu farklılığın nedeninin kullanılan kitlerin duyarlılıklarına bağlı olabileceği gibi zamana bağlı çevresel faktör değişimleri, temiz su kaynaklarına ulaşımın gittikçe zorlaşması, yaşam bölgelerinin zamanla kalabalıklaşması ve çarpık kentleşme nedeniyle altyapı tesislerinin yetersiz kalması, kalabalık aileler nedeniyle kişisel hijyen kurallarının uygulanamaması gibi nedenlerinde etkili olabileceği düşünülmektedir.

Hepatit virüslerinden korunma amacıyla geliştirilen aşı çalışmaları sayesinde HAV ve HBV enfeksiyonlarına karşı korunma amacıyla aşılama yapılabilmektedir. Bu nedenle HEV enfeksiyonuna karşı aşı çalışmalarına hız verilmesi gerekmektedir.

ÖZET

Türkiye’de Hepatit E Virüsü (HEV) seroprevalansının yeniden değerlendirilmesi: Ticari olarak kullanılan iki HEV total antikor ELISA kitinin karşılaştırılması

Hepatit E virüsü (HEV) günümüzde gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde enfeksiyona yol açan hatta gelişmekte olan ve sağlık bilgisi yönünden zayıf olan Asya, Orta Doğu ve Kuzey Afrika ülkelerinde salgına yol açan bir virüs tipidir. Kişisel sağlık bilgisi şartlarının yetersiz olması, sağlıklı içilebilir sulara ulaşamaması ve kanalizasyon atıklarının içme sularına karışması başlıca nedenler olmak üzere, virüs çoğunlukla oral-fekal yolla bulaşmaktadır. HEV’in bu kadar yaygın olması nedeniyle ülkemizde ve dünyada HEV seroprevalans çalışmaları farklı zamanlarda ve bölgelerde defalarca yapılmıştır. Fakat yapılan bu kadar çalışmaya rağmen her çalışmada farklı sonuçlar elde edilmiştir.

Bu çalışmada, Türkiye’deki HEV seroprevalansı 4 farklı bölgeden olmak üzere 6 ilden elde edilen 2011 serum örneği kullanılarak yeniden değerlendirilmiştir. Bu iller; İzmir, Kayseri, Kahramanmaraş, Van, Malatya ve Ankara’dır. Gönüllü donör kan serum örnekleri ile aynı zamanda iki ticari kitin duyarlılığı karşılaştırılmıştır. Bu HEV total antikor kitlerinden biri ülkemizde yaygın olarak kullanıldığı bilinen İtalyan Dia.Pro firmasına ait bir ticari kit ve diğeri de güncel bilimsel veriler ışığında geliştirilen ve yapılan çalışmalarla yüksek hassasiyette çalıştığı gösterilmiş olan Çin Wantai firmasına ait bir ticari kittir. Deneyler direkt ELISA yöntemiyle ALISEI Tam Otomatik ELISA cihazı kullanılarak yapılmıştır. ELISA testi sonuçlarına göre anti-HEV pozitif çıkan örneklerle HEV RNA saptamak ve miktarını ölçmek amacıyla gerçek zamanlı PZR çalışması yapılmıştır.

Farklı iki ticari kit olan Dia.Pro (İtalya) ve Wantai (Çin) anti-HEV ELISA testleri sonuçlarına göre ülkemizde HEV seroprevalansı sırasıyla, %11,34 ve %12,08 olarak belirlenmiştir. Çalışmada örnekleri topladığımız illerin sonuçları Dia.Pro (İtalya) ve Wantai (Çin) için sırayla; Ankara %12,01 - %12,51, Kayseri %6,99 - %7,81, Malatya %14,50 – %15,55, İzmir %8,07 - %9,65, Kahramanmaraş %14,5 – %15,5 ve Van %11,91 - %12,99 olarak sonuçlanmıştır.

Bu çalışmada seçilen şehirlerden Kahramanmaraş dışındaki diğer illerde daha önceki yıllarda kan donörleri üzerinde anti-HEV seroprevalans çalışması yapılmıştır. Ankara’da 1996 yılında yapılan çalışma sonuçlarına göre anti-HEV pozitifliği artmış gözükmektedir.

(%7,6'ya karşı %12,55-12,01). Aynı şekilde Malatya'da 2001 yılına göre pozitiflik oranında artış söz konusudur (%9,7-%15). İzmir, Kayseri ve Van illerinde de benzer sonuçlara ulaşılmıştır. Sonuçların iki farklı ticari Anti-HEV ELISA kiti ile karşılaştırmalı olarak yapılmış olması ve sonuçların birbirine yakın çıkması test sonuçlarının doğruluğunu desteklemektedir. Ayrıca bu sonuçlar, son dönemlerde yüksek hassasiyeti ile uluslararası yayınlarda ön plana çıkmış Wantai kitinin ülkemiz laboratuvarlarında çalışılan Dia.Pro kiti ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak çok anlamlı bir farkının olmadığını göstermiştir. Ancak bu çalışma ile Wantai kitinin yüksek duyarlılığı da bir kere daha gösterilmiştir.

ELISA pozitif örneklerde HEV RNA viral yük bulunamamıştır. HEV enfeksiyonunda viral yükün tespit edilebilir seviyeye ulaşması ilk 1-2 ay ile sınırlı olması ve bu çalışmanın $2,5 \times 10^2$ 'ye kadar viral yük yakalama hassasiyetinin olması bu örneklerin negatif çıkmasına sebep olarak düşünülebilir.

Anahtar Sözcükler: Hepatit E Virüsü, HEV, Hassasiyet, , RNA, Seroprevalans

SUMMARY

Re-evaluation of Hepatitis E Virus (HEV) seroprevalence in Turkey: Comparison of two commercial anti-HEV Total Ab ELISA kit

Hepatitis E virus (HEV) is a type of virus that causes an infection in developed and developing countries, even in Asia, Middle East and North Africa, which are lack of sufficient health information. The virus is mostly transmitted by the oral-fecal route, mainly due to inadequate personal health information, inability to access healthy clean water, and the contamination of sewage wastewater into drinking water, which are the main reasons. Since HEV is so widespread, HEV seroprevalence studies have been carried out numbers of times at different times and regions in our country and even around the world. However, results of these studies show differences without regard to time and regions.

In this study, the seroprevalence of HEV in Turkey was reevaluated using the 2011 serum sample from 6 different cities, including: İzmir, Kayseri, Kahramanmaraş, Van, Malatya and Ankara from 4 different regions. Volunteer donor blood serum samples and two commercial kits sensitivities were compared at the same time. One of these HEV total antibody kits is a commercial kit of the Italian Dia.Pro company, which is known to be widely used in our country, and the other is a commercial kit of China, named Wantai, which has been developed in the light of current scientific data and has been shown to work with high accuracy in studies. Experiments were performed by direct ELISA using ALISEI Full Automatic ELISA device. Real-time PCR studies were performed to detect and quantitate HEV RNA viral load by using anti-HEV positive samples due to ELISA test results.

According to this study, HEV seroprevalence in our country were found to be 11,34% (Dia.Pro, Italy) and 12,08% (Wantai, China) depending on results of two different commercial kits. HEV seropositivity of the cities participated in the study were found to be; 12,01% - 12,51% in Ankara, 6,99% - 7,81% in Kayseri, 14,50% - 15,55% in Malatya, 8,07% - 9,65% in Izmir, 14,5% 15,5% in Kahramanmaras and 11,91% - 12,99% in Van, respectively for Dia.Pro (Italy) and Wantaii (China) kits.

Anti-HEV seroprevalence studies on blood donors have already been conducted in cities that were included in this study except Kahramanmaraş. According to the results of the study conducted in 1996 in Ankara, anti-HEV positivity seems to be increased due to the results of this study (7.6% vs. 12.55-12.01%). Likewise, there was an increasing in the positivity rate in Malatya compared to year 2001 (9,7% -15%). Similar to these differences, rise in HEV seropositivity was also seen in İzmir, Kayseri and Van. The accuracy of the test results was supported with similar positivity percentages achieved by two commercially available ELISA tests in each city. Among these kits Dia.Pro is the one which is being used in most of the laboratories in Turkey, routinely. And the other one was the Wantai kit, which has recently emerged as the one with highest sensitivity in international publications. In this study, although the high sensitivity of the Wantai kit was shown again, the difference between Dia.Pro kit was not statistically significant.

Among ELISA positive samples, none of them was found to be HEV RNA positive. This HEV RNA negativity might be either due to a window period which is the amount of time required for the viral load to reach detectable levels (1-2 months) or due to the sensitivity of the testing method in the current study with a limit of detection (LOD) value of $2,5 \times 10^2$ IU/ml.

Key words: Hepatitis E virus, HEV, RNA, Sensitivity, Seroprevalence

KAYNAKLAR

- AGGARWAL R (2011). Hepatitis E: Historical, contemporary and future perspectives.
- AGGARWAL R, JAMEEL S. Hepatitis E. *Hepatology*,**54**: 2218-26.
- AGGARWAL R, NAIK S (2009). Epidemiology of hepatitis E: current status. *J Gastroenterol Hepatol.*, **24**(9):1484-93.
- AGGARWAL R, NAIK SR.(1997) Epidemiology of hepatitis E: Past, present and future. *Trop Gastroenterol.* 1997; 18(2):49-56.
- AGGARWAL R.(2011) Clinical presentation of hepatitis E. *Virus Research.* 2011; 161(1):15-22.
- ALTINDİŞ M (2000). The Prevalans of Hepatitis A and B virus infection in children in Afyon Sultandagı region. *Türk Hij Den Biyol Derg.*, **57**(3): 147-52.
- ARENDS JE, GHISSETTI V, IRVING W.(2014) Hepatitis E: an emerging infection in high income countries. *J Clin Virol.* 2014; 59(2):81-8.
- AYDIN H, UYANIK H, ALBAYRAK A, ÖZMEN E, AKTAŞ O (2013). Erzurum’da Kan Donörlerinde Anti-HEV Seroprevalansı. *Viral Hepatit Dergisi*, **19**: 23-6.
- AYDIN K. Hepatit E, Tarihçe ve epidemiyolojik özellikler, s: 285-309. Tabak F, Balık İ, Tekeli E (Ed), *Viral Hepatit 2007*. Viral Hepatitle Savaşım Derneği, Ankara.
- AYDIN K. TABAK F, BALIK İ, TEKELİ E(2007). Hepatit E, Tarihçe ve epidemiyolojik özellikler. *Viral Hepatit*, s: 285-309.
- AYDIN NN, ERGÜNAY K, KARAGÜL A, PINAR A, US D (2015). Investigation of the Hepatitis E Virus Seroprevalence in Cases Admitted to Hacettepe University Medical Faculty Hospital. *Mikrobiyoloji Bülteni*, cilt:49 sayı: 4 Ekim 2015
- BALAYAN MS (1997). Epidemiology of hepatitis E virus infections. *J Viral Hepat.* **4**(3):155-65.
- BALAYAN MS, ANDIAPARIDZE AG, SAVINSKAYA SS, KETILADZE ES, BRAGINSKY DM, SAVINOV AP, POLESCHUK VF (1983). Evidence for a Virus in Non-A, Non-B Hepatitis Transmitted via the Fecal-Oral Route. *Intervirology.* **20**:23-31

- BAYHAN Gİ, DEMİRÖREN K, GÜDÜCÜOĞLU H (2016). Van ilinde çocuklarda hepatit E epidemiyolojisi. *Turk Pediatri Ars* 51: 148-51
- BENDALL R, ELLIS V, IJAZ S, ALI R, DALTON H. A comparison of two commercially available anti-HEV IgG kits and a re-evaluation of anti-HEV IgG seroprevalence data in developed countries. *J Med Virol.*, **82**:799-805
- BOZKURTH, KURTOĞLU MG, GÜDÜCÜOĞLU H, BAYRAM Y, BERKTAŞ M. Van Bölgesinde hepatit E virus seroprevalansı. *Viral Hepatit Derg.* 2003; 8(2):102-6.
- BRADLEY DW (1995). Hepatitis E virus: a brief review of the biology, molecular virology, and immunology of a novel virus. *J Hepatol* 22: 140-145
- BROWNE LL, MENKIR Z, KAHİ V, MAINA G, ASNAKEW S, TUBMAN M, ELYASH, NIGATU A, DAK D, MAUNG UA, NAKAO JH, BILUKHA O, SHAHPAR C (2015) Notes from the Field: Hepatitis E Outbreak Among Refugees from South Sudan, Gambella, Ethiopia. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, **64**(19);537-537
- BUTİ M, PLANS P, DOMINGUEZ A (2008). Prevalence of hepatitis E virus infection in children in the northeast of Spain. *Clin Vaccine Immunol.*, **15**:732–734.
- CAO D and MENG XJ (2012). Molecular biology and replication of hepatitis E virus. *Emerg Microbes Infect.*, **1**(8):e17.
- CHANDRA V, TANEJA S, KALIA M, JAMEEL S.(2008) Molecular biology and pathogenesis of hepatitis E virus. *J Biosci.* 2008;**33**(4):451-64
- CHRISTOU L, KOSMIDOU M. Hepatitis E virus in the Western world--a pork-related zoonosis. *Clin Microbiol Infect.* 2013; 19(7):600-4.
- CLAYSON ET, SHRESTHA MP, VAUGHN DW. Rates of hepatitis E virus infection and diseases among adolescents and adults in Kathmandu, Nepal. *J Infect Dis.* 1997; 176(3):763-6.
- CLAYSON ET, SHRESTHA MP, VAUGHN DW.(1997) Rates of hepatitis E virus infection and diseases among adolescents and adults in Kathmandu, Nepal. *J Infect Dis.* 1997; 176(3):763-6.
- DARWISH MA, FARIS R, CLEMENS JD, RAO MR, EDELMAN R. High seroprevalence of hepatitis A, B, C and E viruses in residents in an Egyptian village in The Nil Delta: a pilot study. *Am J Trop Med Hyg.* 1996; 54(6): 554-8.
- DARWISH MA, FARIS R, CLEMENS JD, RAO MR, EDELMAN R.(1996) High seroprevalence of hepatitis A, B, C and E viruses in residents in an Egyptian village in The Nil Delta: a pilot study. *Am J Trop Med Hyg.* 1996; 54(6): 554-8.

EKER A, TANSEL O, KUNDURACILAR H, OKUÇ B, YULUĞKURAL Z, YÜKSEL P.(2009) Hepatitis E virus epidemiology in adult population in Edirne province, Turkey. *Mikrobiyol Bul.* 2009; 43(2):251-8

EMERSON SU, PURCELL RH: Hepatitis E virus. *RevMedVirol.*, **13**:145.

ERTEK M, YAZGI H, YILMAZ O, EROL S. Erzurum Yoresinde Hepatit E Virus Seroprevalansı. *Flora Derg.*, **8**: 65-9.

EYASU H, TESHALE DALE J HU. Hepatitis E: Epidemiology and prevention.

GARSON JA, FERNS RB, GRANT PR, IJAZ S, NASTOULI E. (2012) Minor groove binder modification of widely used TaqMan probe for hepatitis E virus reduces risk of false negative real-time PCR results. *Journal of Virological Methods*, **186** (2012) 157-160

GRAFF J, NGUYENH, YU C, ELKINS W, CLAIRE M, PURCELL RH, and SUZANNE UE (2005). The Open Reading Frame 3 Gene of Hepatitis E Virus Contains a cis-Reactive Element and Encodes a Protein Required for Infection of Macaques. *J Virol.*, **79**(11):6680-9.

GUU TS, LIU Z, YE Q, MATA DA LI K, YIN C, ZHANG J, TAO YJ (2009). Structure of the hepatitis E virus-like particle suggests mechanisms for virus assembly and receptor binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**(31):12992-7.

GÜDÜCÜOĞLU H, KURTOĞLU MG, BOZKURT H, GÜL A, GÜLMEZ S, BERKTAŞ M. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde gebe kadınlarda hepatit E virus seroprevalansı. *Viral Hepatit Derg.* 2003; 8(1):36-9.

HARTL J, WEHMEYER MH, PISCHKE S (2016). Acute Hepatitis E: Two Sides of the Same Coin, *Viruses*, 3;8(11).

Hepatitis E (2016)

Erişim adresi: [<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs280/en/>] Erişim tarihi: 15/01/2017.

HOARE M, GELSON WTH, RUSHBROOK SM, CURRAN MD, WOODALL T, COLEMAN N, DAVIES SE, ALEXANDER GJM. (2008) Histological Changes in HCV Antibody-Positive, HCV RNA-Negative Subjects Suggest Persistent Virus Infection. *Hepatology*. 2008 Dec; 48(6): 1737-1745.

KAMAR N, BENDALL R, LEGRAND-ABRAVANEL F, XIA NS, IJAZ S, IZOPET J, DALTON HR. Hepatitis E. *Lancet* 2012; **379**: 2477-88.

KAMAR N, DALTON HR, ABRAVANEL F, IZOPET J (2014). Hepatitis E virus infection. *Clin Microbiol Rev.*, **27**(1): 116-138.

- KARATAYLI E, ALTUNOĞLU YÇ, KARATAYLI SC, ALAGÖZ SGK, ÇINAR K, YALÇIN K, İDİLMAN R, YURTAYDIN C, BOZDAYI M. (2014) A one step real time PCR method for the quantification of hepatitis delta virus RNA using an external armored RNA standard and intrinsic internal control. *Journal of Clinical Virology* **60** (2014) 11–15
- KHURROO MS (2011). Discovery of hepatitis E: the epidemic non-A, non-B hepatitis 30 years down the memory lane. *Virus Res.***161**:3-14.
- KMUSH B, WIERZBA T, KRAIN L, NELSON K, LABRIQUE AB (2013). Epidemiology of hepatitis E in low- and middle-income countries of Asia and Africa. *Semin Liver Dis.* **33**(1):15-29.
- KÖKSAL I, AYDIN K, KARDEŞ B, TURGUT H, MURT F (1994). The role of hepatitis E virus in acute sporadic non-A, non-B hepatitis. *Infection*, **22**(6):407-10.
- KRAIN LJ, NELSON KE, LABRIQUEA AB (2014). Host Immune Status and Response to Hepatitis E Virus Infection. *Clin Microbiol Rev.* **27**(1):139-65.
- LEE GH, TAN BH, TEO EC, LIM SG, DAN YY, WEE A, AW PP, ZHU Y, HIBBERD ML, TAN CK, PURDY MA, TEO CG (2016). Chronic Infection With Camelid Hepatitis E Virus in a Liver Transplant Recipient Who Regularly Consumes Camel Meat and Milk. *Gastroenterology* **150**(2):355-357
- LEWIS HC, WICHMANN O, DUIZER E. (2010) Transmission routes and risk factors for autochthonous hepatitis E virus infection in Europe: a systematic review. *Epidemiol Infect.* 2010;**138**(2):145-66.
- LOZANO R, NAGHAVI M, FOREMAN K, LIM S, SHIBUYA K, ABOYANS V, ABRAHAM J (2012). Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet* **380**:2095-2128.
- MA MH (2010). Varying Abilities of Recombinant Polypeptides From Different Regions of Hepatitis E Virus ORF2 and ORF3 to Detect Anti-Hev Immunoglobulin. *J Med Virol* **81** (6), 1052-1061. 6.
- MANSUY JM, BENDALL R, LEGRAND-ABRAVANEL F, SAUNE K, MIEDOUGE M, ELLIS V, RECH H, DESTRUDEL F, KAMAR N, DALTON HR, IZOPET J (2011). Hepatitis E virüs antibodies in blood donors, France. *Emerg Infect Dis.*, **17**:2309-12.
- MANSUY JM, LEGRAND-ABRAVANEL F, CALOT JP, PERON JM, ALRIC L, AGUDO S, RECH H, DESTRUDEL F, IZOPET J (2008). High Prevalence of Anti-Hepatitis E Virus Antibodies in Blood Donors From South West France. *Journal of Medical Virology*, **80**:289–293.

- OKAMOTO H (2007). Genetic variability and evolution of hepatitis E virus. *Virus Res.*, **127**(2):216-28.
- OLCAY D, EYİGÜN CP, ÖZGÜVEN ŞV, AVCI İY, BEŞİRRBELLİOĞLU AB, TOSUN SY, PAHSA A (2003). Anti-Hev Antibody Prevalence in Three Distinct Regions of Turkey and its Relationship with Age, Gender, Education and Abortions. *Turk J Med Sci*, **33**(1):33-8.
- OTLU B, DURMAZ R. Malatya’da hepatit E virüs seropozitifliği. *İnfeksiyon Derg.* 2001; 15: 273-6.
- PANDA SK (2013). Hepatitis E: Molecular Virology and Pathogenesis. *Journal of clinical and experimental hepatology*, **3**(2): 114–124.
- PARK HK, JEONG SH, KIM JW, WOO BH, LEE DH, KIM HY, AHN S (2012). Seroprevalence of anti-hepatitis E virus (HEV) in a Korean population: comparison of two commercial anti-HEV assays. *BMC InfectDis.*, **12**:142.
- PARK HK, JEONG SK, KIM JW, WOO BH, LEE DH, KIM HY, AHN S. Seroprevalence of anti-hepatitis E virus (HEV) in a Korean population: comparison of two commercial anti-HEV assays. *BMC InfectiousDiseases*, **12**:142.
- PISCHKE S, BEHRENDT P, BOCK CT, JILG W, MANN S MP, WEDEMEVER H. (2014) Hepatitis E in Germany--an under-reported infectious disease. *Dtsch Arztebl Int.* 2014; 111(35-36):577-83.
- REIN DB, STEVENS GA, THEAKER J, WITTENBORN JS, WIERSMA ST (2012). The Global Burden of Hepatitis E Virus Genotypes 1 and 2 in 2005. *Hepatology*, Vol. 55, No. 4, 2012: 988-997.
- REYES GR, PURDY MA, KIM JP, LUK KC, YOUNG LM, FRY KE, BRADLEY DW (1990). Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Science*. **247**(4948):1335-9.
- RICCOA G, BONINO F, LANZAC M, SCATENAC F, ALFEIERI CM, MESSA P MARCHISIOE E, MASCOLOE F, ROMANOF L, GALLIF C, LI TC (2016). New immuno assays for total, IgA and IgM antibodies against hepatitis E virus: Prevalence in Italian blood donors and patients with chronic liver or kidney diseases. *Dig Liver Dis.* **48**(5):536-41.
- RUGGERI FM, DI BARTOLO I, PONTERIO E, ANGELONI G, TREVISANI M, OSTANELLO F.(2013) Zoonotic transmission of hepatitis E virus in industrialized countries. *New Microbiol.* 2013; 36(4):331-44.

- SAULEDA S ONG E, BES M JANSSEN A, CORY R, BABIZKI M, SHIN T, LINDGQUIST A, HOANG A, VANG L, PIRON M, CASAMITJAN N, KOPPELMAN M, DANZIG L, LINNEN JM. Seroprevalence of hepatitis E virus (HEV) and detection of HEV RNA with a transcription-mediated amplification assay in blood donors from Catalonia (Spain). *Transfusion*. **55**:972-9.
- SONG YJ (2010). Studies of hepatitis E virus genotypes. *Indian J Med Res.*, **132**(5): 487–488.
- SÖNMEZ E., KAYA A., YILMAZ Ş., ALADAĞ M., YOLOĞLU S., ÇETİN C (1995). Malatya Bölgesinde Hepatit E Virusu Seroprevalansı. *Viral Hepat J* 1: 81-83.
- TAM AW, SMITH MM, GUERRA ME, HUANG CC, BRADLEY DW, FRY KE, REYES GR. Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology*, **185**(1):120-31.
- TAŞYARAN MA, AKDAĞ R, AKYUZ M, KAYA A, CEVİZ N, YILMAZ Ş. Erzurum bölgesi çocuklarında parenteral bulaşan hepatit virüslerinin seroprevalansı. *Klimik Derg.* **7**: 76-8.
- TEO CG (2012). Fatal outbreaks of jaundice in pregnancy and the epidemic history of hepatitis E. *Epidemiol Infect.*, **140**: 767–787.
- TESHALE EH, HU DJ, HOLMBERG SD (2011). The two faces of hepatitis E virus. *Clin Infect Dis.*, **51** (3): 328-334.
- THOMAS DL, MAHLEY RW, BADUR S, PALAOGLU KE, QUINN TC (1993). Epidemiology of hepatitis E virus infection in Turkey. *Lancet*, **341**(8860):1561-2.
- TONG HV, HOAN NX, WANG B, WEDEMEYER H, BOCK CT, VELAVAN TP (2016). Hepatitis E Virus Mutations: Functional and Clinical Relevance. *Ebiomedicine.*, **11**:31-42.
- VISWANATHAN R (1957). Infectious hepatitis in Delhi (1955-56): a critical study epidemiology. *Natl Med J India*. **26**:362-77.
- WEDEMEYER H. PISCHKE S, MANNS M.P (2012). Pathogenesis and treatment of hepatitis E virus infection. *Gastroenterology*, **142**: 1388–1397.
- YAZGI H, KADANALI A, ERTEK M, GÜLEN A. Gebelerde Hepatit E Seroprevalansı. *Viral Hepatit Derg.*, **8**: 40-2.
- YAZICI S (2014). Hepatit E Virusü.
Erişim adresi [\[http://www.klimik.org.tr/wp-content/uploads/2014/01/23.01.2014%C4%B1-Saadet-Yaz%C4%B1c%C4%B1-Hepatit-E-virus.pdf\]](http://www.klimik.org.tr/wp-content/uploads/2014/01/23.01.2014%C4%B1-Saadet-Yaz%C4%B1c%C4%B1-Hepatit-E-virus.pdf). Erişim tarihi: 15/01/2017.

YÜCE A, HASÇELİK G (1999). Absence of antibody to hepatitis E virus in Turkish children. *Eur J Pediatr.*, 158(8):685-6.

ZHANG J, GE SX, HUANG GY, LI SW, HE ZQ, WANG YB, ZHENG YJ, GU Y, NG MH, XIA NS: Evaluation of antibody-based and nucleic acid-based assays for diagnosis of hepatitis E virus infection in a rhesus monkey model. *J Med Virol.*,**71**:518-26.



ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı Soyadı : Osman YAŞAR
Doğum yeri ve tarihi : Karaman 1981
Uyruğu : TC
Medeni durumu : Evli
Askerlik durumu : Yaptı
İletişim adresi ve telefonu : Gazi Mh ALkut Sk 4/3 Y.Mahalle - ANKARA

II- Eğitimi

Ortadoğu Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümü (İngilizce)
Hacettepe Üniversitesi SHMYO Tıbbi Lab
Yenişehir SML Laboratuvar Teknisyenliği
Yabancı dili : İngilizce (B)

III- Ünvanları

Uzman Biyolog
Sağlık Teknikeri
Laborant

IV- Mesleki Deneyimi

(2000-Devam Ediyor) Ankara Gazi Mustafa Kemal Devlet Hastanesi
(2011-2012) Helsinki Üniversitesi Veteriner Fakültesi Araştırma Laboratuvarı

VI- Bilimsel İlgi Alanları Yayınları:

Sözlü Sunum – Hepatit E virüs enfeksiyonu serolojik tanısında en yaygın kullanılan iki ticari anti-HEV ELISA kitinin karşılaştırılması ve Türkiye’de hepatit E virüs seroprevalansının yeniden değerlendirilmesi

11.ULUSAL HEPATOLOJİ KONGRESİ 17-21 MAYIS 2017, ANTALYA