

T.C
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI

HEMODİYALİZ HASTALARINDA HEPATİT G VİRUS (HGV-GBV/C)
İNFEKSİYONUNUN cDNA POLİMERAZ ZİNCİR TEPKİMESİ İLE
GÖSTERİLMESİ ve HGV GENOTİPLERİNİN BELİRLENMESİ

Dr. TUNCER TOKLU

MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ
DOÇ. DR. Y. HAKAN ABACIOĞLU

90755

İZMİR
2000

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

TEŐEKKÜR

Bu çalıőmadaki katkıları ve eğitime verdikleri önem nedeniyle danıőmanım, sayın Doç. Dr. Y. Hakan Abacıoğlu ve Anabilim Dalı Baőkanımız sayın Prof. Dr. Nuran Yuluđ' a, yetiőmemde emeiği geçen tım hocalarıma, çalışma ortamını zevkle paylaőtıđım arkadaőlarıma, yardımlarından dolayı İç Hastalıkları Anabilim Dalı Nefroloji Bilim Dalı Baőkanı Prof. Dr. Taner amsarı ve diğer oğretim üyelerine, hemodiyaliz merkezi çalıőanlarına ayrıca desteği ve anlayıőı nedeniyle eőim Meltem Toklu' ya teőekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TABLO LİSTESİ	1
ŞEKİL LİSTESİ	2
RESİM LİSTESİ	3
1 ÖZET	4
2 SUMMARY	5
3 GİRİŞ ve AMAÇ	6
3.1 Giriş	6
3.2 Amaç	7
4 GENEL BİLGİLER	7
4.1 Tarihçe: Virusun keşfi	7
4.2 Hepatit G Virusunun özellikleri, yapısı ve genom organizasyonu	8
4.3 HGV Sınıflandırılması, replikasyonu ve genotipler	11
4.4 HGV İnfeksiyonlarının klinik özellikleri	13
4.4.1 Akut hepatitler	14
4.4.2 Kronik hepatit, siroz ve hepatosellüler karsinom	16
4.5 HGV İnfeksiyonu tanısı ve genotiplendirilmesi	18
4.5.1 Tam	18
4.6 Epidemiyoloji	19
4.6.1 HGV infeksiyonu için riskli gruplar	19
4.7 Sağaltım	21
4.8 Hemodiyaliz hastaları ve viral hepatitler	23
5 GEREÇ ve YÖNTEM	24
5.1 Gereç	24
5.1.1 Çalışma grubu	24
5.1.2 Hemodiyaliz ünitesi çalışanları	24
5.1.3 Kontrol grubu	24
5.1.4 Serum örnekleri	24
5.2 Yöntem	24
5.2.1 HGV-RNA'nın cDNA RT-PCR ile gösterilmesi	25
5.2.2 HGV genotiplendirilmesi	31
6 BULGULAR	35
6.1 Çalışma grubunun demografik özellikleri	35
6.2 Kontrol grubunun demografik özellikleri	35
6.3 Çalışma ve kontrol gruplarında viral hepatit etkenleri	35
6.4 HGV-RNA bulguları	35
6.5 Nükleotid dizi analizi bulguları	36
7 TARTIŞMA	43
8 SONUÇ ve ÖNERİLER	46
9 KAYNAKLAR	47

KISALTMALAR

AMV	: Avian myeloblastosis virus
CHO	: Chinese hamster ovary
DMSO	: Dimetilsülfoksid
DEPC	: Dietilpirocarbonate
E	: Envelope (zarf)
EIA	: Enzyme immuno assay
GSCN	: Guanidium thiocyanate
HGV	: Hepatit G virus
HSK	: Hepatosellüler karsinom
IRES	: Internal ribosome entry site
NCR	: Non coding region (kodlamayan bölge)
NS	: Nonstructural (yapısal olmayan)
ORF	: Open reading frame (açık okuma çerçevesi)
RFLP	: Restriction fragment length polymorphism
RT-PCR	: Revers transcriptase- plymerase chain reaction (ters transkriptaz- polimeraz zincir tepkimesi)
SIA	: Strip immüno assay
Taq	: <i>Thermus aquaticus</i>
Tth	: <i>Thermus thermophilus</i>

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: HGV proteinleri, ORF içerisindeki koordinatları ve olası işlevleri	10
Tablo 2: Akut hepatit olgularında HGV prevalansı	15
Tablo 3: Akut viral hepatitlerde karşılaştırmalı klinik ve biyokimyasal veriler	16
Tablo 4: Kronik hepatit, siroz ve hepatosellüler karsinomada (HSK) HGV-RNA prevalansı	17
Tablo 5: Farklı risk gruplarında HGV-RNA prevalansı	22
Tablo 6: Hemodiyaliz hastalarında hepatit viruslarının görülme sıklığı	23
Tablo 7: PCR da kullanılan primerler	31
Tablo 8: Elektroforez koşulları	34
Tablo 9: Çalışma grubunun özellikleri	38
Tablo 10: HGV olumlu hastaların özellikleri	39
Tablo 11: Hemodiyaliz hastalarının genel özellikleri	39
Tablo 12: HGV 5'-NCR dizilerinin filogenetik uzaklıkları (distance)	43

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: <i>Filaviviridae</i> ailesi içerisinde HGV' nin yeri	8
Şekil 2: HGV ve diğer <i>Flaviviridae</i> ailesi üyelerinin genomik organizasyonu	11
Şekil 3: Bir akut posttransfüzyonal hepatit olgusunun klinik seyri	15
Şekil 4: İzolatların hizalanmış nükleotid dizileri	40
Şekil 5: HGV 5'- NCR dizilerinin filogenetik analizi	41
Şekil 6: 1997 ve 2000 yılında tanımlanan izolatlarla oluşturulmuş ağaçlar	42
Şekil 7: İnsersiyon alanı	46

RESİM LİSTESİ

Resim 1: PCR bant görünümleri

37



1 ÖZET

Hemodiyaliz Hastalarında Hepatit G Virus (HGV-GBV/C) İnfeksiyonunun cDNA Polimeraz Zincir Tepkimesi ile Gösterilmesi ve HGV Genotiplerinin Belirlenmesi

Anahtar Sözcükler: GBV/C-HGV, HGV-RNA, Filogenetik analiz, Genotip, Hemodiyaliz.

HGV, 1995 yılında moleküler klonlama ile tanımlanmış, *Flaviviridae* ailesi içerisinde yer alan bir RNA virusudur. Tüm dünyada yaygın olarak bulunan HGV, temel olarak parenteral yolla bulaşır. Virus nedeni bilinmeyen hepatit olguları, kan aktarımı yapılan hastalar, damar içi uyuşturucu kullananlar ve hemodiyaliz sağaltımı alan hastalarda yüksek sıklıkla saptanmaktadır.

Bu çalışmada, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Hemodiyaliz Ünitesi'nde sağaltım alan 42 hasta, hemodiyaliz ünitesinde görevli 17 sağlık çalışanı ve dermatoloji polikliniğine başvurmuş 158 kontrol olgusunda, HGV-RNA varlığı ters transkriptaz-cDNA polimeraz zincir tepkimesi yöntemi ile araştırıldı. HGV izolatlarının 5'-kodlamayan bölgelerinin DNA dizileri Sanger' in "dideoksinükleotid terminasyon yöntemi" ile belirlendi. Bunların, bilinen diziler ile karşılaştırmalı filogenetik analizleri yapılarak, genotipleri ve aralarındaki filogenetik ilişkiler tanımlandı.

Hemodiyaliz sağaltımı alan 42 hastanın beşinde (%12), 17 sağlık çalışanının birinde (% 5,8) ve 158 kontrol olgusunun ikisinde (%1,2) HGV-RNA saptandı. Kontrol grubuna göre hemodiyaliz hastalarında HGV enfeksiyonu anlamlı olarak yüksek olmasına karşın ($p<0,05$), HGV-RNA olumluluğu ile tanımlanan risk faktörleri arasında istatistiksel bir ilişki belirlenemedi.

Hemodiyaliz hastalarından ve hemodiyaliz hemşiresinden izole edilen genomik dizilerin genotip 2, kontrol grubundan izole edilen bir HGV izolatının ise genotip 4 HGV türlerine ait olduğu saptandı. Hemodiyaliz biriminden üç izolatın ayrı bir küme oluşturduğu belirlendi. Bu izolatlarda, daha önceden belirlenenlerden farklı olarak, -180 ve -177 nükleotid pozisyonları arasında dört nükleotidlik benzer bir insersiyon varlığı saptandı. Bütün bu veriler, söz konusu üç hastada HGV' nin ortak bir kaynaktan köken almış olabileceğini ve HGV' ye bağlı nozokomiyal enfeksiyonların olası olduğunu düşündürmektedir.

2 SUMMARY

Determining the HGV Infection in hemodialysis patients with cDNA polymerase chain reaction and evaluating the HGV genotype

Key words: GBV-C/HGV, HGV-RNA, Phylogenetic analysis, Genotype, Hemodialysis.

HGV is an RNA virus within the *Flaviviridae* family whose presence was determined by molecular cloning techniques in 1995. The virus is common throughout the world and its mainly transmitted by parenteral routes. HGV infections are more frequent in unknown hepatitis cases, blood transfusion recipients, IV drug abusers and in hemodialysis patients.

In this study, the presence of HGV-RNA was sought out in 42 hemodialysis patients, 17 dialysis unit personnel and in 158 dermatological patients as a control group by reverse transcriptase-cDNA PCR. The 5'-NCR sequences of the HGV isolates were determined by Sanger's dideoxynucleotide chain termination method. Phylogenetic analysis of these sequences along with the known HGV 5'-NCR sequences has been utilized to determine the genotypes and phylogenetic relationships.

Five of the 42 dialysis patients (%12), one of the 17 personnel (% 5,8) and two of the 158 dermatological patients (%1,2) have been shown to harbor HGV sequences. Eventhought the rate of HGV infection in hemodialysis patients is significantly higher than the control group ($p<0,05$), no known risk factors could be ascribed to HGV-RNA positivity in these patients. All isolates from the hemodialysis unit were related to HGV sequences, whereas a HGV group 4 sequence was determined in one the positive patients in the latter group. Three of the five HGV sequences isolated from hemodialysis patients clustered closely together, with bootstrap support for all three sequences, indicating a common source of infection. Besides, these sequences contained a similar insertion of 4 nucleotides between position -180 and -177. These data suggest that the viral sequences in these patients may have a common origin and nosocomial transmission of HGV infection in a hemodialysis setting is possible.

3 GİRİŞ ve AMAÇ

3.1 Giriş

Hepatit, karaciğer hücrelerinin inflamasyonudur. Viral, toksik, farmakolojik nedenlerle gelişebilir ve hepatositlerin yıkımı ya da değişik düzeylerde zedelenmesi ile sonuçlanır. Viral hepatitlerin büyük bir kısmı, hepatotropizm gösteren, moleküler yapıları ve klinik özellikleri büyük oranda tanımlanmış, A dan E ye kadar harflerle anılan majör hepatit virusları ile oluşur. Hepatit A virus (HAV) ve Hepatit E virus (HEV) fekal-oral olarak bulaşır, akut hepatite yol açarlar ve kronikleşmezler. Hepatit B virus (HBV) ve Hepatit C virus (HCV) temel olarak parenteral yolla bulaşır ve yüksek kronikleşme oranı sergilerler. Hepatit D virusu (HDV) ise başlangıçta "delta ajanı" olarak adlandırılan ve viral replikasyon için HBV yüzey antijenine ihtiyaç duyan, defektif bir RNA virusudur. Majör hepatotropik virusları saptamaya yönelik oldukça duyarlı testler geliştirilmesine karşın, toplum kökenli hepatitlerin %20' sinin ve parenteral yolla bulaşan hepatitlerin ise %10' unun etyolojisi bilinmemektedir (1). Hepatit G virusu (HGV) nedeni bilinmeyen hepatitlerin (neA-neE hepatitler) etyolojisinde rol alması olası ajanlardan biridir (1-9).

HGV 1995 yılında iki farklı araştırma grubu tarafından eş zamanlı olarak tanımlanmıştır. Simons ve ark., (2) GB virus C (GBV-C), Linnen ve ark., (3) ise hepatit G virus (HGV) olarak adlandırdıkları transfüzyon yoluyla bulaşan iki virus tanımlamışlardır. Bu iki virusun daha sonra aynı türün farklı izolatları olduğu ortaya konulmuştur (7-9). HGV *Flaviviridae* ailesi içerisinde yer alan, pozitif yönelimli (polariteli), tek zincirli bir RNA virusudur, sırası ile GB virus A (GBV-A), GB virus B (GBV-B) ve HCV' ye benzerlik gösterir (1-9). HGV' nin klinik önemi, 1995 yılında keşfinden bu yana yapılmış olan pek çok araştırmaya karşın çok iyi bilinmemektedir.

Günümüzde aktif HGV infeksiyonlarının belirlenmesinde kullanılan tek yöntem virus genomunun "ters transkripsiyon-polimeraz zincir tepkimesi" (RT-PCR) ile gösterilmesidir. HGV zarf glikoproteinine karşı oluşmuş antikorlar (anti-E2) enzim immuno assay (EIA) ya da diğer serolojik yöntemlerle saptanabilmesine karşın bu antikorlar aktif infeksiyonu değil geçirilmiş infeksiyonu gösterir (4). HGV antijenlerini saptayabilen bir test ise henüz geliştirilememiştir.

HGV temel olarak parenteral yolla bulaşır, bu nedenle hemodiyaliz hastaları, kan ve kan ürünleri ile sağaltım alan hastalar, damar içi uyuşturucu kullanıcıları HGV bulaşı açısından yüksek risk taşımaktadırlar (7-9).

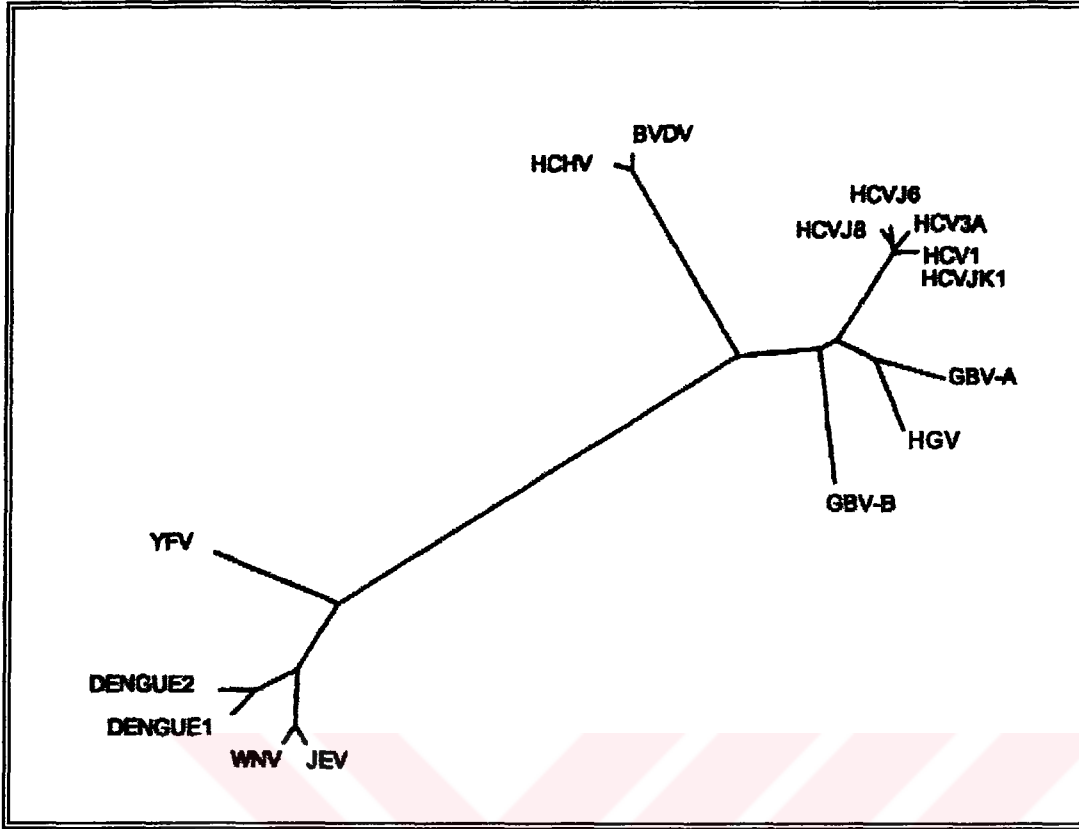
3.2 Amaç

Çalışmamızın amacı, risk grupları içerisinde yer alan hemodiyaliz hastalarında, HGV infeksiyonlarının RT-PCR yöntemi ile saptanması, HGV izolatlarının genotiplerinin ve filogenetik ilişkilerinin belirlenmesidir.

4 GENEL BİLGİLER

4.1 Tarihçe: Virusun keşfi

Deinhart ve ark., 1967 yılında akut hepatitli bir cerrahın aldığı serumu, tamarinlere (*Sanguinus spp.*) inoküle etmişler ve deneklerde hepatit geliştiğini göstermişlerdir (3,6-9). Yaklaşık 28 yıl boyunca, farklı araştırmacılar tarafından tamarin pasajları ve bu sırada yapılan deneyler sonucu, tamarinlerdeki hepatite bir virusun neden olabileceği düşünülmüştür (7-10). Simons ve ark., (6) 1995 yılında moleküler klonlama teknikleri ile tamarin serumlarından iki farklı RNA genomu elde etmişler ve cerrahın isminin baş harflerini kullanarak GBV-A ve GBV-B diye adlandırmışlardır. Ancak cerrahın alınan serum örneği de dahil olmak üzere, insan serumlarında bu iki virusa rastlamamışlardır. Primat kökenli olduğu saptanan bu iki virusun, insanlarda infeksiyonlara neden olmadığı, Flaviviruslara özellikle de HCV'ye benzerlik gösterdiği belirlenmiştir (6,7,10). Aynı çalışma grubu, HCV, GBV-A, GBV-B varsayımsal (putativ) helikaz bölgelerindeki ortak nükleotidleri hedefleyen dejenere primerler ile Batı Afrikalı hastalardan alınan örneklerde, bu viruslardan farklı bir virus tanımlamışlardır. Ne-A, ne-E hepatitlerden sorumlu olabileceği düşünülen bu ajan, GB virus C (GBV-C) olarak adlandırılmış ve tam genom dizisi elde edilmiştir (GenBank no:PNF2161) (2). Linnen ve ark., (3) 1996 yılında biri ALT yükselmesi gösteren fakat hepatit bulguları olmayan, diğeri posttransfüzyonel kronik hepatitli iki hastadan aldıkları serum örneklerinde "Immunoscreening tekniği" ile Flaviviruslara benzerlik gösteren bir RNA virusu tanımlamışlar ve bunu Hepatit G Virusü (HGV) olarak adlandırmışlardır. HGV ile GBV-C arasında nükleotid ve aminoasit benzerlikleri (sırası ile %86 ve %96), iki virusun aynı türün farklı izolatları olduğunu göstermiştir (3). Bu nedenle, virus GBV-C/HGV olarak da tanımlanmaktadır. Bu yazıda, kolaylık açısından HGV tanımı kullanılmıştır.



Şekil 1: *Flaviviridae* ailesi içerisinde HGV nin yeri

4.2 Hepatit G Virusunun Özellikleri, Yapısı ve Genom Organizasyonu

HGV yaklaşık 50 nm çapında, zarflı, tek iplikli, pozitif yönelimli (polariteli) bir RNA virusu olup *Flaviridae* ailesi üyesidir. Virus, genomik organizasyonu ve amino asit dizilimi yönünden özellikle GBV-A ile, daha az oranda da GBV-B ve HCV ile benzerlik gösterir (2-3,7-9,11). Bu virusların *Hepacivirus* genusu içinde sınıflandırılması önerilmektedir (Şekil 1). Henüz genomik lokalizasyonu tam olarak tanımlanamamış olan viral nükleokapsidi lipid bir zarf çevreler (12). Viral zarf yapısında envelope 1 (E1) ve envelope 2 (E2) olmak üzere iki ayrı glikoprotein yer almaktadır (4,13).

HGV genomu, yaklaşık 9400 nükleotid uzunluğunda, tek iplikli bir RNA molekülünden oluşmuştur (2-3). Genom, 2900 amino asitlik poliprotein öncülünü kodlayan, büyük ve tek açık okuma çerçevesi ("*Open Reading Frame*", ORF) içerir (2,3,11) (Şekil 2). Genomun her iki ucunda protein kodlamayan gen bölgeleri (NCR : noncoding region) bulunur ve viral yapı, genomik organizasyon ve nükleotid dizilimi ile diğer flaviviruslara benzerlik gösterir (2,3). HGV ve GBV-A' nın 5'-protein kodlamayan bölgeleri HCV' ye göre daha uzun ve değişkendir. HCV' ye benzer biçimde bir "internal ribosome entry site" (IRES) içerir (14). IRES, kep yapısından bağımsız olarak protein translasyonunu başlatmaktan sorumludur (14,15) (Şekil 2). Yapısal proteinleri kodlayan genler genomun 5' ucuna, yapısal olmayan proteinleri kodlayanlar (nonstructural : NS) ise 3' ucuna yakın bir yerleşim gösterir ve 5' ucundan 3' ucuna doğru sırası ile E1, E2, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A ve NS5B bölgelerini içerir (14) (Şekil 2-Tablo 1).

HGV henüz elektron mikroskobu ile gösterilememiş ve virusun hücre kültür sistemlerinde uzun süreli replikasyonu sağlanamamıştır. Bu nedenle, günümüzde HGV viral yapısının dolaylı yollarla tanımlanması olasıdır. HGV HCV' ye benzer biçimde, infekte bireylerin kanlarında düşük ve yüksek (sırasıyla 1.07 ve 1.17 g/ml) olmak üzere iki farklı dansiteye sahip partiküller biçiminde bulunabilmektedir (12). Düşük dansiteli HCV partiküllerinin infektivite ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Ancak, HGV açısından düşük ve yüksek dansiteli partiküller ile patogenezi arasındaki ilişki bilinmemektedir (16). HGV ve HCV' de kloroform ekstraksiyonu sonrası görülen dansite artışı lipid zarfın parçalanması ile ilişkili olup, infektivite kaybına yol açabilmektedir (12).

HGV proteinlerinin biyolojik fonksiyonları tam olarak aydınlatılamamıştır. Bilinen proteinleri ise HCV ile benzerlik gösterir. Virus genomunda iki varsayımsal zarf proteini (E1, E2), metalloproteaz (NS2), serin proteaz, helikaz, NTPaz (NS3) ve RNA-bağımlı RNA polimeraz (NS5B) kodlayan bölgeler tanımlanmıştır (14-18) (Tablo 1).

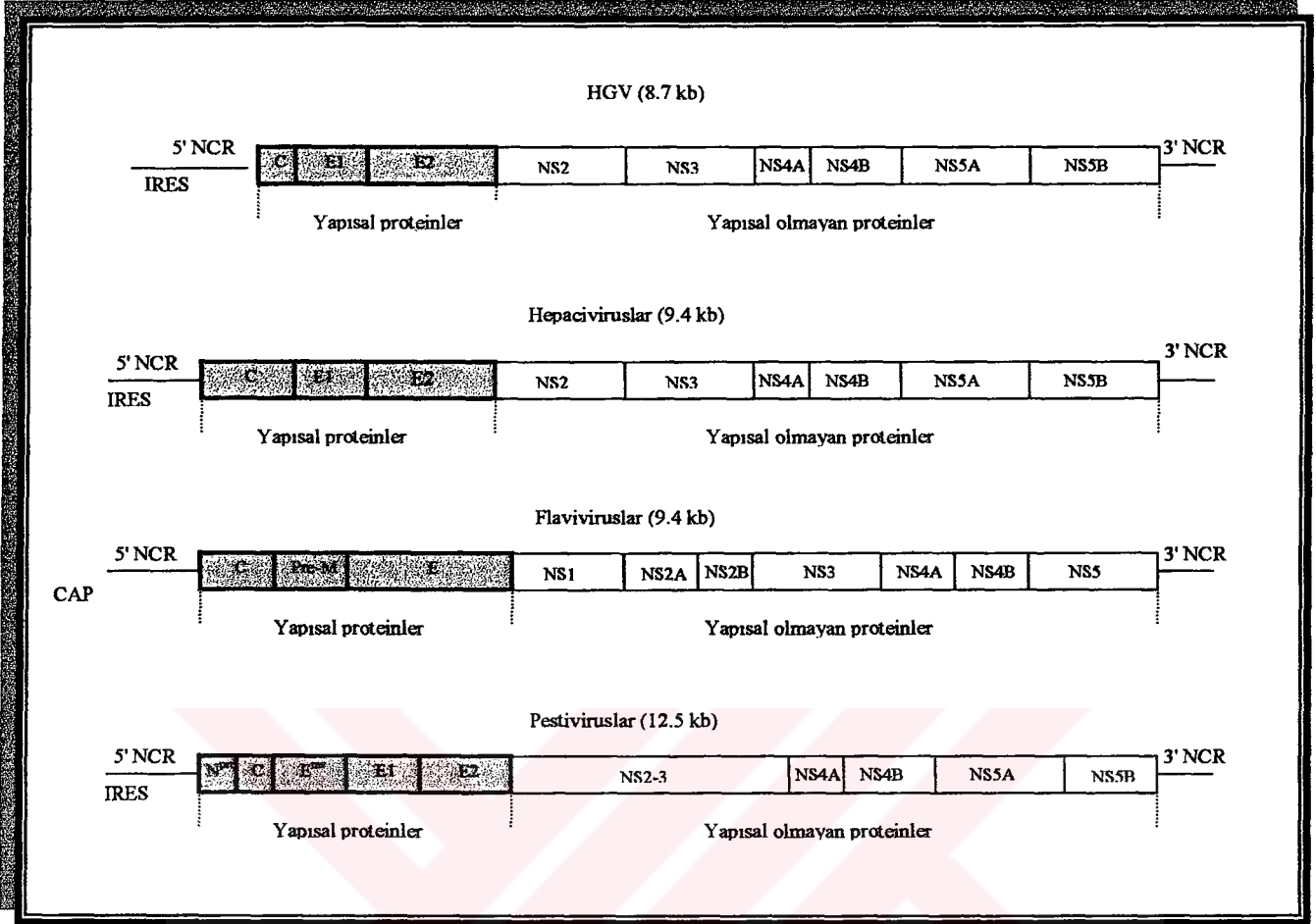
E2 bölgesi viryon yüzeyi ile ilişkili bir glikoproteini kodlamaktadır. E2 yüzey glikoproteinine karşı oluşan antikorlar (anti E2 IgG) farklı yöntemlerle saptanabilmektedir ve daha çok geçirilmiş infeksiyonu tanımlar (4,13).

NS2 tarafından kodlanan metalloproteaz, poliproteinden NS2-NS3 bölgesinin kesilmesini düzenler. NS3' den kodlanan serin proteaz ise NS3-NS4A, NS4A-NS4B, NS4B-NS5A ve NS5A-NS5B bölgelerinin ayrıştırılmasından sorumludur. NS4A bölgesi, serin proteaz enziminin aktivitesi için kofaktör görevi görmektedir. Sonuç olarak, serin proteaz, metalloproteaz ve henüz tam olarak tanımlanmamış olan NS4A proteini, posttranslasyonel proteolitik aktiviteden sorumludur ve poliprotein öncülünden olgun proteinlerin ayrıştırılmasını sağlar (12,17,19).

HGV poliproteininin amino terminal ucu HCV' ye göre daha kısadır ve kor bölgesini kodladığı varsayılan bu bölge izolatlar arasında değişkenlik gösterir. HGV kapsid proteininin, izolatlar arasında 19 ile 91 amino asit uzunluğunda değişen bu bölge tarafından kodlanıp kodlanmadığı tam olarak bilinmemektedir (2,3). Bu konuda bir başka görüş de, NS5A içindeki binişimli (overlapping) bir gen bölgesinin kapsid sentezinden sorumlu olabileceğini düşündürmektedir (19). Diğer yandan, Linnen ve ark. (3) antigenomik iplik üzerinde bulunan ORF' nin infeksiyon sırasında eksprese olabileceğini öne sürmüşlerdir.

Tablo 1: HGV proteinleri, ORF içerisindeki koordinatları ve olası işlevleri

Genomik bölge	Nükleotid pozisyonları	Kodon sayısı	İşlevi
C?	?	?	Kapsid
E1	1-615	205	Zarf glikoproteini
E2	616-1926	437	Zarf glikoproteini
NS2	1927-2682	252	Metalloproteaz
NS3	2683-4650	656	Serin proteaz / helikaz/NTPaz
NS4A	4651-5283	211	Serin proteaz kofaktörü
NS4B	5284-5595	104	Bilinmiyor
NS5A	5596-6840	415	Bilinmiyor
NS5B	681-8496	552	RNA-bağımlı RNA polimeraz



Şekil 1: HGV ve diğer *Flaviviridae* ailesi üyelerinin genomik organizasyonu.

4.3 HGV Sınıflandırılması, replikasyonu ve genotipler

HGV genomik organizasyon ve nükleotid dizi benzerlikleri nedeniyle GBV-A ve GBV-B ile birlikte geçici olarak *Hepacivirus* genusu içerisinde sınıflandırılmaktadır. Bu genüs içerisinde kendisine en yakın tür olan GBV-A ile %48, HCV ile ise %29 amino asit homolojisi gösterir (2). Günümüzde HGV sınıflandırılmasında ve gruplarının belirlenmesinde nükleotid dizilerinin karşılaştırılması ve filogenetik analizi kullanılmaktadır. Genotiplerin belirlenmesinde en güvenilir sonuçlar, karşılaştırmanın genomik dizinin tümü ile yapılması ile elde edilmektedir (20). Buna karşın, tam genom dizilerinin belirlenmesindeki güçlükler nedeni ile farklı subgenomik bölgelerden elde edilen dizilerle de HGV filogenetik analizi gerçekleştirilebilmektedir (20,23).

HGV düşük dereceli amino asit dizi varyasyonları göstermesi ve bu varyasyonların klinik öneminin tam olarak tanımlanamamış olması nedeni ile tip ve subtipten daha çok grup ve subgrup olarak sınıflandırılmaktadır (20). HGV 5'-NCR mutasyon oranı $1,3-2,4 \times 10^{-3}$ sub/nt/yıl olarak hesaplanmıştır (22). Yakın zamanda tanımlanmış ve tam genom dizisi elde edilmiş 33 HGV izolatu ile gerçekleştirilen analizler sonucu, filogenetik olarak dört ana grubun varlığı gösterilmektedir (20). E2 bölgesini içeren daha çok sayıda izolatla yapılan analizlerde ise 5 filogenetik grup belirlenmiştir (grup1-5). Smith ve ark., (20) subgenomik karşılaştırmalar için en uygun bölgenin E2 bölgesi içerisinde, 200-600 nükleotid uzunluğunda bir alan olduğu belirtilmiştir.

HGV filogenetik gruplarının coğrafi dağılımı, tarih öncesi insanların Afrika' dan diğer kıtalara göç yolları ile koşutluklar göstermekte ve virusun infekte ettiği konaklar ile birlikte evrimleştiği sanılmaktadır (20,24,25). Grup 1 ve 5 Afrika kökenlidir. Diğer gruplar üç ana insan göçü ile ilişkili gözükmektedir. Grup 2 Avrupa, grup 3 Kuzey Asya ve grup 4 ise Güney Asya ülkelerindeki infeksiyonlardan izole edilmektedir (20-31). ABD' de grup 2 baskın olmasına karşın, Kuzey ve Güney Amerika yerlilerinde Asya kökenli grup 3' e diğer gruplardan daha sık rastlanmaktadır (20,25-27).

Nükleotid dizi analizi dışında filogenetik grupların belirlenmesi amacıyla, epidemiyolojik çalışmalarda uygulama kolaylığı sağlayan "restriction fragment length polymorphism" (RFLP) yöntemi kullanılmıştır. RFLP sonuçlarının dizi analizlerinde elde edilen gruplar ile (grup 1-3) % 97.3 uyumlu sonuç verdiği bildirilmiştir (32).

HGV filogenetik grupları ile klinik tablo, prognoz, sağaltıma direnç ya da tanı arasında herhangi bir ilişki gösterilememiştir. Ancak, farklı HGV türümsü ya da varyantlarının, farklı klinik özellikler gösterebileceğini ya da bu varyantların doku tropizmiyle ilişkili olabileceğini düşündüren veriler bulunmaktadır (33). Heringlake ve ark., (34) on bir ne-A,ne-E fulminan hepatit olgusunun serumlarından elde ettikleri HGV izolatlarının tümünde, aynı genomik pozisyonda mutasyonlar tanımlamışlar ve fulminan seyir ile ilişkili olabileceğini bildirmişlerdir. Mononükleer hücreleri infekte edebilen HGV varyantlarının 5' protein kodlamayan bölgelerinin ortak predominant bir dizi içermesi, lenfotropizm veya hepatotropizm gösteren varyantların bulunabileceğini, belki de farklı klinik tablolardan sorumlu olabileceğini düşündürmektedir (33,35).

HGV replikasyonu, özellikle *Hepacivirus* ve *Pestivirus*'lere benzemektedir. Bu genusların replikatif döngüsü, 1- adsorbsiyon 2- reseptör aracılı endositoz 3- füzyon 4- kapsid soyulması 5- IRES aracılı translasyon 6- poliprotein sentezi 7- hücrel ve viral proteazlarla proteolitik parçalama 8- membran ilişkili antigenomik (-) ve progeni RNA (+) sentezi 9- nükleokapsidle birleşme (assembly) 10- endoplazmik retikulumdan virusun tomurcuklanması 11- golgi cisimciğine transport ve olgunlaşma 12- vezikül füzyonu ve olgun viral partikülün serbestleşmesi aşamalarından oluşmaktadır (15).

4.4 HGV infeksiyonlarının klinik özellikleri

HGV akut veya kronik hepatit olgularında kontrol gruplarına göre daha yüksek oranda saptanmaktadır (1,3,36) (Tablo 2-4). Fakat HGV' nin akut ya da kronik karaciğer hastalıkları ile ilişkisi belirgin değildir. HGV infeksiyonları genellikle asemptomatik seyreder. Transaminaz seviyeleri yükselmez ya da ılımlı yükselmeler gözlenir. Karaciğerde histopatolojik değişiklikler oluşturmaz (1). Bu nedenle HGV ile karaciğer hastalıkları arasındaki ilişkiyi tanımlayabilmek için yanıtlanması gereken ilk ve en önemli soru, virusun primer olarak karaciğerde replike olup olmadığıdır. HGV' nin özgül organ ya da doku tropizmi gösterip göstermediği konusunda çelişik veriler bulunmaktadır (37-39).

Flaviviridae ailesi negatif iplik (antigenomik iplik) aracılığı ile replikasyon gösterir (15,40). Bu nedenle negatif ipliğin belirli bir doku ya da organda gösterilmesi özgül replikasyon alanının tanımlanmasında kullanılan bir yöntemdir. Diğer bir seçenek, invitro hücre kültür sistemlerinde replikasyonun moleküler ya da serolojik yöntemlerle gösterilmesidir (41,42). Fakat negatif ipliğin özgül amplifikasyonu kendi içerisinde belirli zorluklar taşımaktadır. Yüksek ısılarda cDNA sentezi yapabilen, bu nedenle negatif ipliğe yüksek özgüllük gösteren Tth polimeraz ile HGV antigenomik ipliği araştırılmış, karaciğer, kemik iliği ve dalak gibi dokularda negatif ipliğe rastlanmıştır (39). HGV' nin mononükleer hücrelerde çoğalabildiği gösterilmiştir (41,43).

Viruslar, genel olarak primer replikasyon bölgelerinde serumdan daha yüksek konsantrasyonlarda bulunmalarına karşın, HGV karaciğerde, serum seviyelerinden yaklaşık 10-100 kat düşük miktarlarda saptanmıştır (39,44). Bütün bu veriler ışığında, karaciğerin HGV için primer replikasyon bölgesi olmadığı düşünülmektedir.

4.4.1 Akut hepatitler

HGV akut infeksiyonları genellikle asemptomatiktir, hepatik ya da ekstrahepatik bir bulgu saptanmaz ve olguların bir çoğunda biyokimyasal ve histolojik değişiklikler gözlenmez (Tablo 3). ALT seviyeleri diğer viral hepatit olgularına oranla ılımlı seyrederek (230 IU/ml altında). Fakat normal ya da daha yüksek (3000 IU/ml) ALT seviyeleri de bildirilmiştir (1,45-46). HGV-RNA'nın kaybolması anti-E2 antikorlarının saptanması ile eş zamanlıdır ve bu nedenle anti-E2 antikorlarının viral klirens ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (4,13,47) (Şekil 3). Transfüzyon sonrası 2-11 hafta içerisinde HGV-RNA serumda saptanır seviyelere gelmektedir (1,48). HGV viral yükü ile klinik bulgular arasında bir ilişki gösterilememiştir (1). Olguların % 0-75' inde uzamış viremi gözlenir ve HGV'nin 16 yıla kadar persistan kalabildiği bildirilmiştir (5).

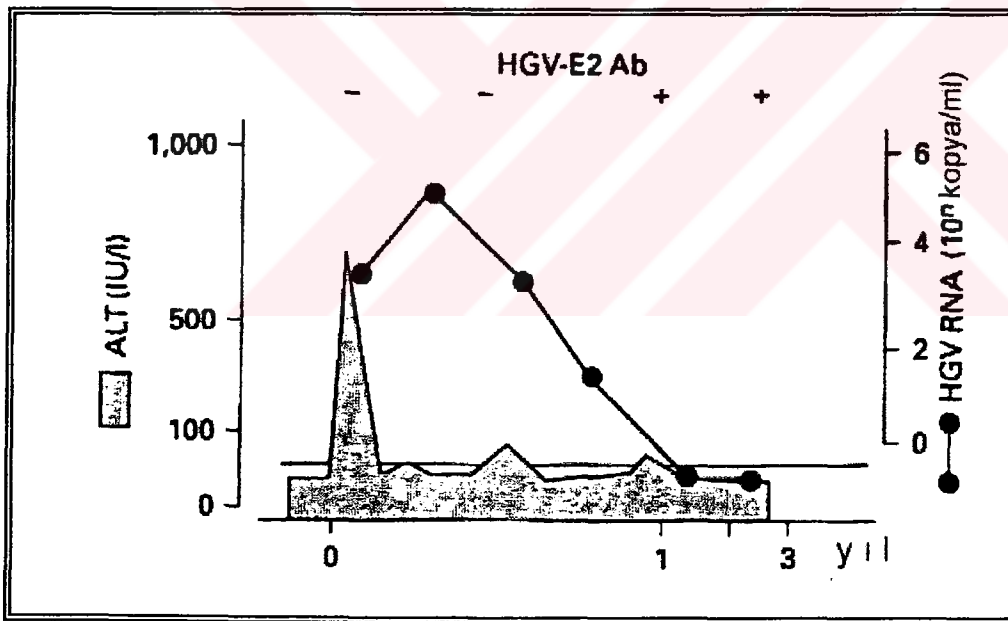
Ne-A ne-E posttransfüzyonal akut hepatit olgularının % 9-40' unda, sporadik olguların ise %0-9' unda HGV-RNA saptanmaktadır (1,3,49-52). Ortak bulaş yolları nedeniyle HCV ve HBV ile koinfeksiyonu sık görülmektedir, fakat HGV hepatit C infeksiyonlarının klinik ve biyokimyasal özellikleri üzerine etkili değildir (37).

HGV ile fulminan hepatitler arasında, olgu sayıları az olmasına karşın anlamlı bir ilişki olabileceğini düşündüren veriler bulunmaktadır (34,53). Buna karşın bu ilişkinin kontamine kan ve kan ürünleri ile sağaltım sonucu oluşabileceği de düşünülmektedir (54). Heringlake ve ark., (34) fulminan seyirli HGV olgularının tümünde NS3 bölgesinde saptadıkları 100. ve 102. nükleotidlerdeki mutasyonların fulminan seyirle ilişkili olabileceğini belirtmişlerdir.

Tüm bu verilere karşın akut ve fulminan hepatit olgularında HGV'nin etyolojik rolünün belirlenebilmesi için daha uzun süreli çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Tablo 2: Akut hepatit olgularında HGV prevalansı

Hepatit türü	Referans	Olgu sayısı (n)	HGV-RNA + (%)
Ne-A ne -C Posttransfüzyonal	Alter ve ark (1)	16	3 (19)
	Linnen ve ark.(3)	13	3 (23)
	Nakatsuji ve ark. (49)	5	1 (20)
	Hwang ve ark. (50)	5	2 (40)
	Fiordalisi ve ark.(36)	31	11(35)
Sporadik	Alter ve ark. (45)	45	4 (9)
	Nakatsuji ve ark. (49)	43	0
Hepatit A	Alter ve ark. (45)	100	25(25)
	Nakatsuji ve ark. (49)	21	0
Hepatit B	Alter ve ark. (45)	21	3(14)
	Nakatsuji ve ark. (49)	100	32(32)
Hepatit C	Alter ve ark (1)	53	7(13)
	Alter ve ark. (45)	63	6(10)
	Nakatsuji ve ark. (49)	116	23(20)
	Hwang ve ark. (50)	52	5(10)



Şekil 3: Bir akut posttransfüzyonal hepatit olgusunun klinik seyri
HGV-RNA kaybı ile eşzamanlı olarak ALT seviyeleri normalleşmekte ve aE2 antikorları saptanmaktadır.

Tablo 3: Akut viral hepatitlerde karşılaştırmalı klinik ve biyokimyasal veriler

Kaynak	HGV	HGV+HCV	HCV	Ne-A, Ne-G
Alter ve ark. (1)				
Sayı	3	6	56	10
Ortalama ALT tepe değeri (IU/ml)	198	724	726	418
Kronikleşme oranı (%)	67	50	48	20
Sarılık	0	33	32	0
T.Bil tepe değeri (mg/dl)*	0.87	3.97	3.14	1.18
Alter ve ark. (45)				
Sayı	4	23	93	41
Ortalama yaş	27	31	34	39
Kadın/erkek	2/2	14/9	36/57	22/19
Ortalama ALT tepe değeri (IU/ml)	1680	1673	1410	335
Kronikleşme oranı (%)	0	14	50	12
T.Bil tepe değeri (mg/dl)	9.6	4.5	4.1	3.6
Hwang ve ark. (50)				
Sayı	2	5	47	
Ortalama yaş	61	57	53	
Kadın/erkek	2/0	3/2	33/14	
Ortalama ALT tepe değeri (IU/ml)	201	887	617	
Kronikleşme oranı (%)	0	80	79	
Sarılık	0	20	19	
Nakatsuji ve ark. (49)				
Sayı	1	7	52	26
Ortalama yaş	45	43.4	44.2	46.2
Kadın/erkek	1/0	4/3	18/34	12/14
Ortalama ALT tepe değeri (IU/ml)	586	640	1113	664
Kronikleşme oranı (%)	0	71	64	12
T.Bil tepe değeri (mg/dl)	1.1	1.9	2.7	5.9

*T.Bil: Total Bilirubin

4.4.2 Kronik hepatit, siroz ve hepatosellüler karsinom

HGV' nin sıklıkla persistan infeksiyonlara yol açmasına karşın (%0-75), kronik hepatit, siroz ve hepatosellüler karsinom (HSK) ile ilişkisi belirgin değildir (49,55,56). Bir çalışmada, HGV-RNA olumlu otuz beş olgudan 32' sinin (%91) altı ay ve izlenen sekiz olgudan 5' inin de 4 yıla kadar persistan kaldığı bildirilmiştir (1). Bir diğer çalışmada ise, HGV-RNA' nın 16 yıla kadar saptanabilir düzeylerde kaldığı gösterilmiştir (5). Etyolojisi belirlenememiş kronik hepatit, siroz ve HSK ile HBV ve HCV ye bağlı olgular arasında HGV prevalansı açısından istatistiksel bir fark bulunmamaktadır (Tablo 4). Kronik hepatit C ve hepatit B hastalarında HGV koinfeksiyonu sıklıkla görülmektedir (56). İzole HCV infeksiyonu ile HGV-HCV koinfeksiyonu saptanan hastalar arasında klinik süreç ya da interferon- α yanıtı arasında bir fark yoktur (42).

Tablo 4: Kronik hepatit, siroz ve hepatosellüler karsinomada (HSK) HGV-RNA prevalansı

Hastalık	Referans	Olgu sayısı (n)	HGV-RNA + (%)
Ne-A Ne- C			
Kronik hepatit	Nakatsuji ve ark.(49)	34	2(6)
	Linnen ve ark. (3)	158	15(10)
	Fiordalisi ve ark.(36)	18	7(35)
Siroz	Handajani ve ark.(29)	14	1(7)
	Nakatsuji ve ark.(49)	10	1(10)
HSK	Nakatsuji ve ark.(49)	6	0
	Kanda ve ark.(52)	8	0
	Brechot ve ark.(56)	14	2(14)
	Handajani ve ark.(29)	15	1(7)
Hepatit B			
Asemptomatik taşıyıcı	Nakatsuji ve ark.(49)	42	4(10)
Kronik hepatit	Handajani ve ark.(29)	5	1(20)
	Nakatsuji ve ark.(49)	36	0
Siroz	Linnen ve ark. (3)	72	7(10)
	Nakatsuji ve ark.(49)	17	3(18)
HSK	Brechot ve ark.(56)	23	0
	Kanda ve ark.(52)	25	1(4)
Hepatit C			
Kronik hepatit	Handajani ve ark.(29)	38	1(3)
	Nakatsuji ve ark.(49)	42	2(5)
	Linnen ve ark. (3)	96	18(19)
	Fiordalisi ve ark.(36)	18	7(39)
	Tanaka ve ark.(55)	189	21(11)
Siroz	Nakatsuji ve ark.(49)	42	5(12)
	Handajani ve ark.(29)	48	4(8)
HSK	Brechot ve ark.(56)	20	2(10)
	Handajani ve ark.(29)	25	2(8)
	Kanda ve ark.(52)	46	5(11)

4.5 HGV enfeksiyonu tanısı ve genotiplendirilmesi

4.5.1 Tanı

4.5.1.1 Serolojik tanı

Serolojik tanı HGV antijenlerine karşı oluşmuş antikorların serumda gösterilmesine dayanmaktadır. Henüz HGV antijenlerini saptayabilen bir test geliştirilememiştir.

A- Enzyme immuno assay (EIA)

HGV zarf glikoproteinine karşı oluşmuş antikorları saptamak amacıyla bir EIA geliştirilmiş ve pek çok araştırma laboratuvarı tarafından tanısal olarak kullanılmaktadır (4,13,57-59). Bu amaçla kullanılan antijen, E2 bölgesini içeren bir cDNA parçasının Chinese hamster ovary (CHO) ya da *Escherichia coli* hücrelerine klonlanarak elde edilmektedir (4,13,58).

Anti-E2 antikorları viral klirensle ilişkili olup HGV-RNA ile genellikle bir arada bulunmaz. Bu nedenle daha çok geçirilmiş enfeksiyonu tanımlar (4,13,47,57-60).

B- Strip immunoblotting assay (SIA)

Feucht ve ark., tarafından geliştirilmiş SIA, dört farklı rekombinant HGV epitopuna (E1, E2, NS3N, NS3-C/NS4) yönelen antikorların ayrı ayrı saptanmasını sağlamaktadır. Yapılan çalışmada, olguların %45' inde tüm bölgelere karşı antikor yanıtı saptanırken, % 28' inde E2-NS3N-NS3-C/NS4, %11' inde E2-NS3-C/NS4, %8' inde E1-E2-NS3-C/NS4, %6' sında E1-E2 ve % 3' ünde NS3-C/NS4' e karşı antikor yanıtı saptanmıştır (61).

4.5.1.2 HGV-RNA' nın gösterilmesi

RT-PCR

Şu an için aktif HGV enfeksiyonlarının tanısı, HGV genomunun RT-PCR yöntemi ile gösterilmesine dayanmaktadır. Bu yöntemde, ilk olarak ekstrakte edilmiş viral RNA' dan, bir ters transkriptaz enzimi (revers transcriptaz, RT) ile komplementer DNA (cDNA) elde edilmekte, ardından polimeraz zincir tepkimesi sonucu amplifikasyon gerçekleştirilmektedir.

PCR yönteminde DNA amplifikasyonu 3 aşamada gerçekleşmektedir,

1- Denatürasyon: Yüksek ısı kullanılarak DNA çift ipliğinin ayrışması sağlanır.

- 2- Annealing (hibridizasyon): Oligonükleotid primerler ile hedef DNA ipliği eşleşir.
- 3- Extensiyon (polimerizasyon): Bir polimeraz enzimi ile primerlerden başlayarak komplementer ipliğinin oluşması sağlanır.

Döngüsel ısı üretebilen bir cihazda (thermocycler), bu üç aşama 30-40 kez tekrarlanarak, her döngü sonucunda hedef DNA'nın iki kat artması sağlanır. Son olarak amplifiye edilmiş DNA farklı yöntemlerle görünür hale getirilmektedir.

RT-PCR, HGV genomunun NS3, NS5 ve 5'-NCR gibi farklı subgenomik bölgelerini hedefleyen primerler ile gerçekleştirilebilir. Bu primerlerin duyarlılıkları arasında belirgin bir fark saptanmamıştır (1-3,62-66).

4.6 Epidemiyoloji

HGV infeksiyonları tüm dünyada yaygın olarak görülmektedir. İnsanlar dışında *Pan troglodytes*, *troglodytes* ve *versus* türü şempanzeleri de doğal yollardan infekte edebildiği gösterilmiştir (64).

HGV, sağlıklı bireylerde % 1-4 arasında yüksek viremi oranı sergiler. HGV-RNA prevalansı ülkeden ülkeye önemli değişiklikler gösterir. İspanya (%3), Vietnam (%5.2), Almanya (%4.7), Güney Afrika (%10.4), Batı Afrika (%14.2) gibi ülkelerde prevalansı, Japonya (%0.6-0.9), Çin (%0.7-2), Norveç (%2,5) ve ABD den (%0,9) daha yüksektir (1,45,67-71). Türkiye' de sağlıklı popülasyonda, %0,5 ve %3,4 görülme sıklığı saptanmıştır (72,73).

HGV parenteral yolla bulaşmaktadır, ayrıca HGV olumlu hastaların sperm ve tükürüklerinde viral RNA saptanmış, vertikal ve seksüel yolla da bulaşabileceği gösterilmiştir (71,74,75).

4.6.1 HGV infeksiyonu için riskli gruplar

Temel olarak iki bulaş yolu bulunmaktadır.

A- Parenteral yolla bulaş ile oluşan infeksiyonlar.

B- Parenteral olmayan bulaş ile oluşan infeksiyonlar.

A- Parenteral bulaş

1- Kan transfüzyonu sonrası HGV infeksiyonu

HGV ile kontamine kan ve kan ürünlerinin transfüzyonu, HGV için en önemli bulaş yollarından biridir (76-79). Genellikle kan transfüzyon sayısı arttıkça HGV ile infeksiyon riski de artmaktadır. Viral inaktivasyon yapılmamış ve oldukça geniş bir serum havuzundan hazırlanan plazma ürünleri de bu konuda önemli bir rol oynamaktadır. On yedi faktör VIII örneğinin 16' sında (%94) ve altı faktör IX örneğinin altısında (%100) HGV-RNA olumlu bulunmuştur (77).

2- Damar içi uyuşturucu kullanıcılarında HGV infeksiyonu

Damar içi uyuşturucu kullanıcılarında HGV prevalansı oldukça yüksektir ve bağımlılık süresi uzadıkça HGV ile karşılaşma riski artmaktadır. Damar içi uyuşturucu kullanıcılarında saptanan yüksek prevalansın ortak enjektör kullanımına bağlı olduğu düşünülmektedir (4,80) (Tablo 5).

3- Hemodiyaliz sağaltımı alan hastalarda HGV infeksiyonu

Hemodiyaliz hastalarında HGV viremi oranı %3 ile %29 arasında değişmektedir (Tablo 5). HGV-RNA olumluluğu ile hemodiyaliz süresi ve kan aktarım miktarı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon bulunmaktadır (5,26,29,82-85). Fakat kan transfüzyonu yapılmamış ve hemodiyaliz süreleri kısa olan hastalarda da HGV infeksiyonlarının saptanması başka olası bulaş yollarını düşündürmektedir (83).

4- Transplantasyon ve HGV infeksiyonu

Böbrek transplant hastalarında HGV prevalansı yüksektir. Bu durum transplantasyon öncesinde hemodiyaliz sağaltımı ya da kan transfüzyonlarına da bağlı olabilir. İki çalışmada, böbrek transplantasyon alıcılarında HGV ile karşılaşma oranı %26 ve %53 olarak bildirilmiştir (Tablo 5) (84,86-88).

B- Parenteral olmayan bulaşma

1- Seksüel bulaşma

HGV infeksiyonlarının cinsel yol ile bulaşabileceği ve bu yolun önemli bulaş yollarından biri olduğu düşünülmektedir. HGV olumlu 12 kan donörünün cinsel partnerleri araştırılmış ve dördünde (%33) HGV-RNA, dördünde ise (%33) HGV'ye karşı antikor yanıtı gösterilmiştir. Donörler ile partnerlerinde saptanan HGV izolatları arasında %99,2 ile %100 arasında nükleotid benzerliklerinin saptanmış olması, HGV' nin cinsel yolla bulaşabileceğini göstermektedir (69). HGV ile infekte bireylerin sperm örneklerinde HGV-RNA gösterilmiştir (74). Homoseksüel bireylerde HGV viremi oranı %10 olarak saptanmıştır (77).

2- Vertikal bulaşma

Yapılan çalışmalar HGV' nin vertikal yolla oldukça yüksek oranlarda bulaşabileceğini düşündürmektedir (89-94). Sezaryen ile yaptırılan doğumların HGV vertikal bulaş riskini azalttığı bildirilmiştir (92). Normalde plasenta, anne kanı ile bebek kanının karışmasını engelleyen bir bariyer görevi görmektedir fakat uterus kontraksiyonları sırasında bu bariyerin bütünlüğünün bozulduğu ve intrauterin bulaşın esas olarak bu yolla meydana geldiği belirtilmektedir (92). HGV viremisi saptanan bebeklerin %92' sinde HGV-RNA' nın bir yıl, % 50' sinde ise üç yıl saptanabilir düzeylerde kaldığı gösterilmiş ve bebeklerin %33' ünde geçici ve ılımlı ALT yükselmeleri (91-115 IU/ml) saptanmıştır (91).

3- Cinsel olmayan yakın ilişki sonucu gelişen bulaşma

HGV' nin aile içi bulaşabileceği ve tükürük gibi vücut sıvılarında bulunabileceği gösterilmiştir (68,75). Sağlıklı popülasyonda yüksek karşılaşma oranlarının saptanması cinsel ilişki olmaksızın yakın sosyal ilişkinin HGV bulaşında rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

4.7 Sağaltım

HGV infeksiyonları genellikle asemptomatik seyreder ve hastalıklarla ilişkisi belirsizdir, bu nedenle, sağaltım gerekli değildir. Fakat, HGV interferon α sağaltımına duyarlıdır. HGV-HCV koinfekte on hastadan 9' unda interferon sağaltımı sonrasında HGV viral yükünde

istatistiksel olarak anlamlı bir azalma kaydedilmiş ve hastaların % 30 unda ise kalıcı yanıt elde edilmiştir (95).

Tablo 5: Farklı risk gruplarında HGV-RNA prevalansı

Risk Grubu	Olgu sayısı (n)	HGV-RNA (%)	aE2*	Toplam
Hemofili				
Handajani ve ark. (29)	66	13 (19)		
Kao ve ark. (30)	10	3 (30)		
Lara ve ark. (77)	17	2 (12)		
Jarvis ve ark. (76)	66	13 (15)		
Aplastik anemi				
Kao ve ark. (30)	20	4 (20)		
Ig sağaltımı alan hastalar				
Morris ve ark.(78)	28	8 (28)		
Lefrère ve ark. (79)	16	2 (12,5)		
Damar içi uyuşturucu bağımlıları				
Tacke ve ark. (4)	99	38 (38)	41 (41)	75 (75)
Dille ve ark. (13)	27	1 (4)	23 (85)	24 (89)
Kao ve ark. (30)	40	6 (15)		
Lara ve ark. (77)	50	12 (24)		
Schlueter (80)	130	43 (33)		
Hemodiyaliz hastaları				
Handajani ve ark. (29)	69	20 (29)		
Kao ve ark. (30)	328	57 (17)		
Masuko ve ark. (5)	519	16 (3)		
Pujol ve ark. (26)	64	6 (9)		
Sampietro ve ark. (82)	100	19 (19)		
Szabo ve ark. (84)	31	3 (10)	4 (13)	7 (23)
Tribl ve ark. (43)	119	16 (13)	24 (20)	38 (32)
Forns ve ark. (83)	96	25 (26)		
Şengül ve ark.(96)	42	3(7)		
Öztürk ve ark.(72)	67	22(31)		
Günaydın ve ark.(73)	78	27(34)		
Renal tx. Alıcıları				
Stark ve ark. (87)	221	31 (14)	89 (40)	118 (53)
Szabo ve ark (84)	92	14 (15)	10 (11)	24 (26)
Erensoy ve ark. (88)	14	6(42)		

*aE2: anti-E2

4.8 Hemodiyaliz hastaları ve viral hepatitler

Kronik diyaliz hastalarının ölüm oranları, yılda ortalama % 10-15'dir. En önemli mortalite ve morbidite nedenleri enfeksiyonlar ve kardiyovasküler nedenlerdir (97). Hemodiyaliz hastaları en az iki nedenden ötürü enfeksiyon hastalıklarından daha çok etkilenirler. Bunlardan ilki, hastaların enfektif ajanlarla karşılaşma risklerinin artmış olması, ikincisi ise hastaların enfeksiyonlara karşı dirençlerinde azalmadır.

Parenteral yol ile bulaşan virusların, hasta ya da sağlık personeline bulaşında en önemli kaynak enfekte kan ve kan ürünleri ya da bu ürünlerle kontamine tıbbi gereçlerdir. HIV, HCV ve HBV sağlam deriden doğrudan penetre olamaz. Fakat iğne batmaları, diğer kesici aletlerle yaralanmalar, deri çatlakları, yanıkları yada yaraları ya da kontamine ürünlerin mukozal yüzeylere direk inokülasyonu bulaşa neden olabilmektedir (98).

Hepatit virusları, hemodiyaliz sağaltımı gören hastalarda sıklıkla enfeksiyonlara yol açar. Hastanemiz hemodiyaliz ünitesinde yapılan araştırmalarda HBV belirleyicileri %6,1, HCV RNA %27 olarak saptanmıştır (99,100).

Tablo 6: Hemodiyaliz hastalarında hepatit viruslarının görülme sıklığı

Kaynak	Olgu sayısı (n)	HbsAg (%)	HCV-RNA (%)
Masuko ve ark. (5)	519	15 (2,9)	107 (20,6)
Sampietro ve ark. (82)	100	12 (12)	24 (24)
Forns ve ark. (83)	96	13 (14)	35 (36)

5 GEREÇ ve YÖNTEM

5.1 Gereç

5.1.1 Çalışma Grubu

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Hemodiyaliz ünitesinde düzenli hemodiyaliz sağaltımı alan 23 erkek, 19 kadın toplam 42 hastanın serum örnekleri HGV-RNA varlığı açısından araştırıldı.

5.1.2 Hemodiyaliz ünitesi çalışanları

Olası bir nozokomiyal bulaşı tanımlayabilmek amacıyla Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Hemodiyaliz Ünitesinde çalışan 9 hemşire, 4 doktor, 2 temizlik elemanı, 1 sekreter ve 1 teknik personel olmak üzere toplam 17 (Erkek: 4, Kadın:13) sağlık çalışanında HGV-RNA araştırıldı.

5.1.3 Kontrol Grubu

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dermatoloji polikliniğine başvurmuş ve tanımlanan risk grupları içerisinde yer almayan 156 kontrolde (Erkek:66, Kadın:90) HGV-RNA araştırıldı.

5.1.4 Serum Örnekleri

Hasta ve kontrollerin serum örnekleri toplanmış, steril eppendorf tüplerde -70°C' de dondurularak çalışmaya kadar saklanmıştır.

5.2 Yöntem

Çalışma grubunda HBV belirleyicileri (HbsAg, aHBC total) ve anti-HCV EIA ile araştırılmıştır. HGV-RNA varlığı RT-PCR ile araştırılmış ve olumlu örnekler nükleotid dizi analizi ile evrimsel yakınlıkları açısından incelenmiştir. Bulguların tanımlayıcı ve analitik istatistik değerlendirmeleri SPSS versiyon 8.0 programında yapılmıştır.

5.2.1 HGV-RNA' nın cDNA RT-PCR ile gösterilmesi

Ayraçlar-Gereçler

1- DEPC-H₂O (diethylpikarbonat) (Sigma D5758)

DEPC	0.05 ml
Deiyonize	1000 ml

Bir gece oda ısısında bırakıldı. 60°C de 2 saat kapağı gevşetilerek tutuldu. Otoklavlandı.

2- Fenol (pH: 4.3) (Sigma P4682)

4- Sodyum sitrat (Sigma C8532)

Sodyum sitrat 5.5 H ₂ O	15.78 g
DEPC-H ₂ O	100 ml'ye tamamlandı.

(pH:7.0) Otoklavlandı. Oda ısısında 6 ay stabildir.

5- Sarcosil %10 (sigma L9150)

Sarcosil	1 g
DEPC-H ₂ O	10 ml'ye tamamlandı.

Otoklavlanmaz. Oda ısısında en az 3 ay stabildir.

6- Guanidium tiyosiyanat (GSCN) (Sigma G9277)

guanidyum thiocyanate	25 g (4M)
0.25 M sodyum sitrat	5 ml (75mM)
%10 sarkosyl	2.5 ml
DEPC-H ₂ O	50 ml' ye tamamlandı.

Oda ısısında en az 3 ay stabildir.

7- 2-mercaptoethanol (14M) (Sigma M7154)

8- Denatürasyon çözeltisi (Sol.D)

4M GSCN	9.9 ml
2-merkaptotanol (14 M)	0.1 ml

Oda ısısında 1 ay stabildir.

9- 4 M NaCl

NaCl	11.68 g
DEPC-H ₂ O	50 ml'ye tamamlandı.

Otoklavlandı.

10- 1 M Tris-Cl (pH: 8.3)

Trizma base (Sigma T8524)	46.5 g
Trizma Hcl	18.3 g
DEPC-H ₂ O	500 ml' ye tamamlandı.

11- %70 Etanol

%95 EtOH	74 ml
Distile su	26 ml

12- Sodyum asetat (Sigma S2889)

	<u>2M</u>	<u>3M</u>
NaOAc (anhidro)	16.4 g	24.61 g
yada NaOAc.3H ₂ O	27.2 g	39.01 g
DEPC-H ₂ O	100 ml'ye tamamlandı.	

(pH:5.2) pH glasiyel asetik asit eklenerek ayarlandı.

Otoklavlandı. Oda ısısında 6 ay stabildir.

13- EDTA (etilendiamintetraasetikasit) (SigmaE5134)

	<u>0.5M</u>	<u>0.2M</u>
Na ₂ EDTA	18.6 g	7.44 g
Distile H ₂ O	100 ml	100 ml

EDTA pH:8.0'da erir. 1-2 g NaOH pelleti ile istenen pH elde edilebilir.

Otoklavlandı.

14- TBE (5X)

Tris base (Sigma T8524)	54 g
Boric asid (Sigma B6768)	27.5 g
0.5M EDTA	20 ml
Distile su	1000 ml' ye tamamlandı.

Otoklavlandı. Oda ısısında 1 ay stabildir.

15- DTT 1M (ditioerithritol) (Sigma D9779)

DTT	1.54 g
0.01 M NaOAc	10 ml

Filtrasyon ile sterilize edildi. 4 °C de saklandı.

16- Jel yükleme tamponu (Tip III, 6X)

%0.25 bromfenol mavisi (%10 stoktan)	0.75 ml
%0.25 xylene siyanol FF(%5 stoktan)	1.5 ml
%30 gliserol (su içindeki karışımı)	9 ml
Distile H ₂ O	18.75 ml

17- Etidium bromid (1000X, 5mg/ml) (Sigma E8751)

Etidyum bromid	0.5g
Distile H ₂ O	100 ml

Işıktan korumak için alüminyum folyo ile kaplandı. 4 °C de saklandı.

18- Glikojen (20 µg/50 µl) (Sigma G1767)

Glikojen	4 mg
DEPC-H ₂ O	10 ml

Alikotlanır, -20 °C de saklandı.

19- Poliadenilikasit (Poly-A) (2mg/ml) (Behringer mannheim 108626)

Poly-A	100 mg
DEPC-H ₂ O	50 ml

20- %10 DMSO (dimetilsülfoksit) (Sigma D 8418)

DMSO	1 ml
DEPC-H ₂ O	10 ml'ye tamamlandı.

21- dNTP karışımı (40µmol her biri) (Promega U1240)

(10 mM/herbiri,toplam 40mM) (2.5 mM/herbiri,toplam 10mM)

dATP (100 mM)	100µl	25µl
dCTP (100 mM)	100µl	25µl
dGTP (100 mM)	100µl	25µl
dTTP (100 mM)	100µl	25µl
DEPC-H ₂ O	600µl	900µl

-20° C da saklandı.

22- Kloroform:isoamilalkol

Kloroform (Sigma C2432)	49 kısım
İsoamilalkol	1 kısım

Her çalışmada taze hazırlandı.

RNA Eldesi:

RNA eldesi modifiye "acid guanidium thiocyanate phenol-chloroform" yöntemi ile gerçekleştirildi (101).

1- Bir eppendorf tüpüne sırası ile,

Plazma	100 µl
Solüsyon D	400 µl
2M Sodyum asetat	50 µl
Fenol	500 µl
Kloroform-isoamil alkol (50/1)	100 µl

2- Vorteks karıştırıcıda 1400 devirde 15 dakika karıştırıldı.

3- Tüpler 10.000 g' de 20 dakika çevrilerek faz ayrışması sağlandı.

4- Üstteki sıvı faz yeni bir tüpe aktarıldı, üzerine eşit hacimde soğuk absolü isopropanol ve 1,25 mg/l konsantrasyonunda olacak şekilde glikojen eklendi .

5- Tüpler bir gece -20 °C' de tutuldu.

6- Tüpler 10.000 g' de 20 dakika çevrildi.

7- Çökelti %70 etanol ile iki kez yıkandı, 37 °C' de kuru ısı bloğu üzerinde kurutuldu.

8- 50 µl DEPC-H₂O ile sulandırıldı. Sulandırılan RNA örnekleri hemen cDNA oluşturmak için kullanıldı.

cDNA Eldesi:

1- Bir eppendorf tüpüne toplam hacim 20 µl olacak biçimde aşağıdakiler konuldu.

AMV RT 5x buffer	4µl
Primer531(70 pmol/µl)	1,5µl (105 pmol/final)
RNAsin (40U/µl)	0,5µl (20 U/final)
AMV RT (25 U/µl)	0,5µl (12,5 U/final)
DNTP (1mM/herbir)	3 µl (150 µM/herbiri)
DMSO	3 µl
DEPC-H ₂ O	2,5 µl

2- Tüpler 42 °C' de 60 dakika inkübe edildi. cDNA örneği bekletilmeden ürün PCR' da kullanıldı.

Birinci PCR

1- Her bir örnek için 0,2 µl eppendorf tüpüne toplam hacim 50 µl olacak şekilde aşağıdakiler konuldu.

10x Taq buffer	5 µl
25mM MgCl ₂	3 µl (1,5 mM/final)
Primer 531 (70 pmol/µl)	0,7 µl
Primer 108 (50 pmol/µl)	1 µl
dNTP (0,75 mM/her biri)	1 µl (60 µM/herbiri)
Taq polimeraz (5 U/µl)	0,3 µl (1,5 U/final)
Steril distile su	34 µl
cDNA	5 µl

2- Thermocycler programı

94 °C' de 2 dakika ön denatürasyon sonrası, 94 °C 1 dakika, 50 °C 1 dakika, 72 °C 2 dakika thermocycler programı ile 30 döngü gerçekleştirildi. Son uzatma (final ekstensiyon) için 72 °C' de örnekler 10 dakika tutuldu.

3- Birinci PCR ürünleri, ikinci PCR gerçekleştirilmesine değin 4 °C' de saklandı.

İkinci PCR

1- Her bir örnek için 0,2 µl eppendorf tüpüne toplam hacim 50µl olacak şekilde aşağıdakiler konuldu.

10x Taq buffer	5 µl
25mM MgCl ₂	3 µl (1,5 mM/final)
Primer 134 (50 pmol/µl)	1 µl
Primer 476(50 pmol/µl)	1 µl
dNTP (0,75 mM/her biri)	1 µl (60 µM/herbiri)
Taq polimeraz (5 U/µl)	0,3 µl (1,5 U/final)
DMSO	2 µl (% 4/final)
Steril distile su	34,7 µl
1. PCR ürünü	2 µl

2- Thermocycler programı

94 °C' de 2 dakika ön denatürasyon sonrası, 94 °C 1 dakika, 55 °C 1 dakika, 72 °C 2 dakika thermocycler programı ile 30 döngü gerçekleştirildi. Son uzatma (final ekstensiyon) için 72 °C' de örnekler 10 dakika tutuldu.

Kullanılan primerler, dizileri ve hedef bölgeleri Tablo 7' de gösterilmiştir.

Tablo 7: PCR da kullanılan primerler

Primer	Polarite	Dizi	Pozisyon	Ürün uzunluğu
Birinci PCR				
G531	Sense	5'-TGC CAC CCG CCC TCA CCC GAA-3'	-445	424 bp
G108	Antisense	5'-AGG TGG TGG ATG GGT GAT-3'	-22	
İkinci PCR				
G476	Sense	5'-GGR GCT GGG TGG CCY CAT GCW T-3'	-419	344 bp
G134	Antisense	5'-TGG TAG GTC GTA AAT CCC GGT-3'	-76	

Sonuçların Değerlendirilmesi:

Bu amaçla, 1x TBE içinde % 2 agaroz jel hazırlandı ve manyetik ısıtıcıda eritildi. 50 ml agaroz içerisine, 5mg/ml etidyum bromid çözeltisinden 5 µl eklendi ve jel kalıba dökülerek kullanıma hazırlandı. Φx174 marker ve örnekler yükleme tamponu eklendikten sonra (5µl jel yükleme buffer + 25 µl amplifiye ürün) jele aktarıldı. Jel 1x TBE içinde 80V uygulanarak 30-45 dakika yürütüldü. Sonuçlar ultraviyole transilluminatörde 280-340 nm dalga boyunda incelendi. Bant büyüklükleri marker ile karşılaştırıldı ve 344 baz büyüklüğündeki bantlar olumlu olarak değerlendirildi.

5.2.2 HGV genotiplendirilmesi

Genotiplendirme, olumlu PCR örneklerinin dizi analizleri ile gerçekleştirildi.

1- Nükleotid dizileri

Nükleotid dizileri GenBank' den elde edildi. Smith ve ark. 'nın (20,23), tanımladıkları Grup 1-4 izolatlarından yararlanıldı. (GenBank no: D87251, D87252, D87253, D87254, U59522, U59526, U59543, U59544, U59546, U91693, AF006964, AF006965, AF006966, AF007977, AF210439, AF210444, AF121950, AB013231, AF070476)

2- Dizileme

HGV dizilerinin belirlenmesi için, polimeraz zincir tepkimesi sonucu elde edilen ve 5'- NCR içerisinde yer alan 344 bazlık (-399 ile -42) bir bölge kullanıldı. Olumlu PCR örnekleri etanol ile saflaştırıldı.

Dizileme reaksiyonları, Sequitherm Excel II DNA Sequencing Kits-LC (Epicentre SE9202LC) ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi.

1- Kit içeriği buz üzerinde çözünmeye bırakıldı. Tüm kit komponentleri vorteksenerek homojen hale getirildi.

2- Premiks olarak işaretlenen bir eppendorfa (0.2 ml) toplam hacim 17 μ l olacak şekilde aşağıdakiler kondu.

3.5x SequiTherm Excel II Sequencing buffer	7.2 μ l
İşaretli primer (IRD800 işaretli G134)	2 μ l*
Kalıp DNA (Pürifiye edilmiş 100-250 fmol/ μ l)	1 μ l **
SequiTherm Excel II DNA polimeraz(5U/ μ l)	1 μ l
Deionize su ile	17 μ l' ye tamamlandı.

* IRD800 işaretli primer ışık görmemelidir, bu nedenle karışımlar fazla ışık görmeyen bir ortamda hazırlandı.

** Kalıp DNA premix içerisine ayrı bir alanda (aktarım odasında) eklendi.

3- Dizilenecek her örnek için 4 adet 0.2 μ l eppendorf tüpü A, T, C, G olarak işaretlendi.

Buz üzerinde

G tüpüne 2 μ l SequiTherm Excel II-LC Termination Mix G

A tüpüne 2 μ l SequiTherm Excel II-LC Termination Mix A

T tüpüne 2 μ l SequiTherm Excel II-LC Termination Mix T

C tüpüne 2 μ l SequiTherm Excel II-LC Termination Mix C ' den eklendi.

4- Buz üzerinde premiks tüpünden her bir "Termination Mix" tüpüne 4 μ l aktarıldı.

5- Mineral yağ eklendi.

6- Santrifüj yapılarak mineral yağın karışımdan ayrışması sağlandı.

7- A, T, C, G tüpleri 5 dakika 95 °C' de ısıtılarak kalıp DNA denatüre edildi.

8- Aşağıdaki ısılarda 30 siktüs gerçekleştirildi.

30 sn 95 °C

15 sn 50 °C

1 dk 70 °C

9- 3 µl Stop/Loading buffer eklendi. Elektroforez için jele yükleninceye kadar -20 °C' de saklandı.

Camların temizlenmesi

Uygun bir jel için camların temizliği çok önemli olduğundan, önce sıcak musluk suyu ile yıkanan camlar daha sonra distile su ile durulandı, cam üzerinde kalan su damlacıkları bir havlu kağıt ile kurulandı. Camların her iki yüzeyi etanol ile silindi. Kulaksız olan arka cam, çentikli tarafı (dış yüzey) aşağı gelecek şekilde banko üzerine yerleştirildikten sonra her iki kenara spacer konuldu. Kulaklı ön cam, çentiksiz tarafı (iç yüzey) alkol ile silinip kurutulduktan sonra çentikli tarafı üste gelecek şekilde, spacerların yerleşimlerini bozmadan yerleştirildi. Cam sıkıştırıcılar dikkatlice takıldı ve sıkıştırıldı. Üste gelecek kısma "casting plate" yerleştirildi.

Jel hazırlığı

- 1- Yüz ml beher içerisine sırası ile, 21 g üre, 30.5 ml bidistile/deionize su, 5.6 ml Rapid-Gel XL %40, 5 ml 10x Long Run TBE ve 500 µl DMSO eklendi.
- 2- Manyetik karıştırıcıda ve oda ısısında tamamen berraklaşınca kadar (yaklaşık 10 dk) karıştırıldı.
- 3- Karışım 50 cc enjektöre çekildi ve bir başka beher içerisine filtre edildi.
- 4- Elli µl TEMED ve 350 µl %10 APS (taze hazırlanmış) eklendi.
- 5- Zaman kaybetmeden temiz 50 cc enjektöre çekildi, enjektör ucu takılıp, bir miktar jel dışarı atılarak enjektör ucu prime edildi.
- 6- İki cam arasına ön camın kulakları arasında kalan köşeden başlayarak jel dolduruldu.

- 7- Camların dip kısmı tamamen jel ile dolduktan sonra doldurma işlemi sonlandırıldı ve camlar hemen horizontal konuma getirildi.
- 8- Tarak (0.25 mm) arka tarafı jel içerisine 0.5 cm girecek şekilde cama paralel olarak jel içerisine yerleştirildi ve polimerizasyon için 2 saat oda ısısında bekletildi.

Örneklerin yüklenmesi

Jel yükleme tamponu eklenmiş ve A, T, C, G olarak işaretlenmiş örnekler 90 °C' de 3 dakika denatüre edildikten sonra buz üzerine alındı ve her bir örnekten 2 µl jele aktarıldı. LI-COR DNA sequencer cihazında aşağıdaki koşullarda elektroforez uygulandı ve yaklaşık sekiz saat sonra bant görüntüleri ve bu bantların semi-otomatik olarak değerlendirilmesi ile DNA diziler elde edildi.

Tablo 8: Elektroforez koşulları

Voltaj	Akım	Güç	Sıcaklık	Tarama hızı	Frame	Pre-run	Buffer
2200V	40 mA	45 W	45 °C	3	35	45 dakika	1x

2- Dizi Analizi

Elde edilen HGVS dizileri Clustal W (1.74) Multiple Sequence Alignments ve DNA-Star 4.01 (©DNASTAR Inc. 1989) programları kullanılarak hizalandı. Hizalanmış diziler MEGA version 1.02 programında (Kumar ve ark., 1993) "Jukes-Cantor distance" ile karşılaştırıldı, "neighbour-joining" yöntemi ile filogenetik ağaç oluşturuldu ve bootstrapping değerleri elde edildi. Ayrıca Phylip version 3.06 (Felsenstein, 1993) DNAdist programı ile diziler arasındaki evrimsel uzaklık değerleri elde edildi.

3- İstatistiksel analiz

Verilerin değerlendirilmesinde, tanımlayıcı ve analitik istatistiksel değerlendirmeler SPSS 8.0 programında yapılmıştır. Elde edilen veriler, Fisher's exact test ile değerlendirilmiş ve dağılımların p için 0.05 düzeyinde farklı olup olmadıkları araştırılmıştır.

6 BULGULAR

6.1 Çalışma grubunun demografik özellikleri

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hemodiyaliz Ünitesinde sağaltım alan hastaların (n:42) yaş aralığı 10-83 yıl (ortalama 55.93 ± 18.17), hemodiyaliz programında buldukları süre 3-152 ay (ortalama 35.26 ± 35.01), kan aktarım sayısı 0-34 ünite (ortalama 2.6 ± 5.81) olarak saptanmıştır. Çalışma grubunun demografik özellikleri Tablo 9' da özetlenmiştir.

6.2 Kontrol grubunun demografik özellikleri

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Dermatoloji polikliniğine başvurmuş, risk grupları içerisinde yer almayan kontrol grubunun (n:158) yaş sınırı 20-77 yıl (ortalama 42.9 ± 12.8) olarak saptanmıştır.

6.3 Çalışma ve kontrol gruplarında viral hepatit etkenleri

Hemodiyaliz hastalarının sekizinde (% 19) anti-HCV, birinde (%2,3) HbsAg, 16' sında (%38) anti-HBc saptanmıştır. Kontrol grubunda ise bir kişide (%0.6) anti-HCV ve 15 kişide de (%9.6) HBsAg saptanmıştır.

6.4 HGV-RNA bulguları

Hemodiyaliz hastalarının beşinde (% 12), hemodiyaliz ünitesi çalışanlarından birinde (%5.8), kontrol grubunun ise ikisinde (%1,2) HGV-RNA olumlu bulunmuştur (Resim 1) (Tablo 10).

Çalışma grubunda, HGV-RNA olumluluğu ile yaş, hemodiyaliz sağaltım süreleri, kan aktarımı, aktarım sayısı ya da operasyon öyküsü arasında anlamlı bir ilişki saptanamamıştır (Tablo 11). İzole HGV enfeksiyonu belirlenen üç hastanın, son bir yıllık ALT değerleri normal düzeylerde saptanmıştır (20-34 IU/ml). ALT yüksekliği (79 IU/ml) gösteren iki hastadan birinde HGV-RNA ile birlikte HBsAg ve anti-HCV, diğerinde ise HGV-RNA ve anti-HCV olumlu bulunmuştur.

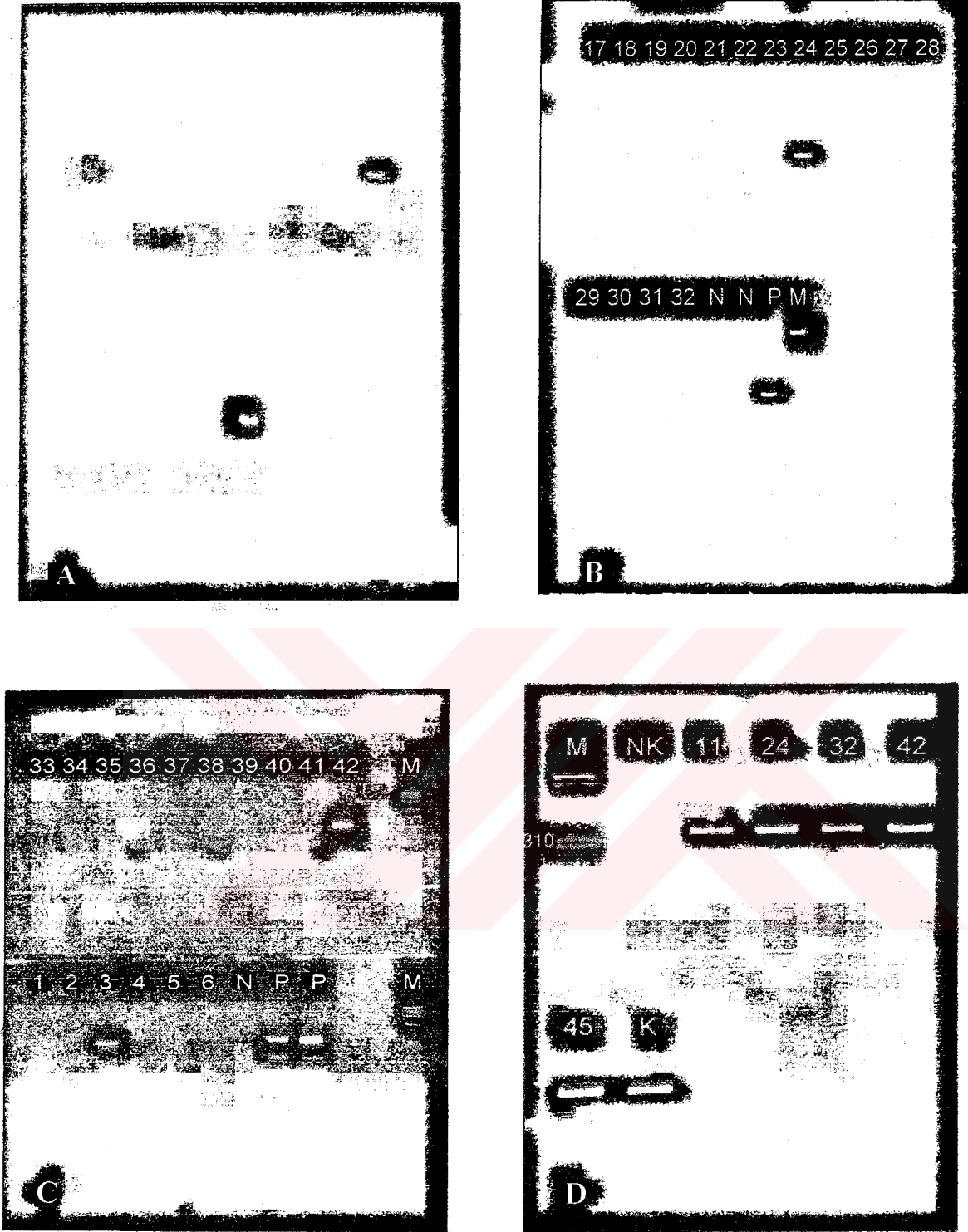
6.5 Nükleotid dizi analizi bulguları

Kontrol grubundan izole edilmiş bir izolat dışında tüm HGV izolatlarının, 5'-NCR içerisinde yer alan 188 baz uzunluğundaki DNA dizileri elde edilmiştir (Şekil 4). Bu dizilerin filogenetik analizi sonucunda, HGV ile infekte beş hasta ve bir hemodiyaliz hemşiresinde HGV grup 2, kontrol grubunda yer alan bir olguda ise HGV grup 4 enfeksiyonu saptanmıştır (Şekil 5).

DEÜ2, DEÜ11 ve DEÜ32 numaralı izolatlarda, 5'-NCR -180 ve -177 nükleotid pozisyonları arasında, bilinen HGV izolatlarında saptanmayan, dört bazlık bir insersiyon alanına rastlanmıştır (Şekil 4).

Filogenetik ağaç güvenilirliğin değerlendirilmesi amacıyla Mega programında "bootstrapping" analiz yapılmıştır. Özellikle HGV grup 2 için bootstrap değerleri oldukça düşük sonuç vermiştir. Smith ve ark., (23) 1997 yılında nükleotid dizi analizleri için en güvenilir sonuçların 5'-NCR içerisinde kalan yaklaşık 200 nükleotid uzunluğunda bir bölgenin incelenmesi ile elde edilebileceğini belirtmişlerdir ve çalışmamızda bu nedenle aynı bölge seçilmiştir. Fakat 33 tam genom HGV dizisi ile gerçekleştirilen, 2000 yılında yapılmış bir araştırma, filogenetik analiz için en uygun subgenomik bölgenin E2 bölgesi olduğunu göstermektedir (20). E2 bölgesi içerisinde yer alan, 200-600 nükleotid uzunluğunda bir alan dışında, diğer subgenomik bölgelerden yapılan analizlerin düşük "bootstrapping" değerlerine neden olabileceği bildirilmiştir (20). HGV' de farklı subgenomik bölgeler arasında karmaşık rekombinasyonların ve beklenmedik nükleotid değişimlerinin "bootstrap" değerlerindeki azalmalardan sorumlu olabileceği belirtilmektedir (20).

Yeni saptanan izolatların, "bootstrap" değerleri üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla, 1997 yılında Smith ve ark.'nın (23) kullandıkları dizilerle ve bu dizilere yeni saptanan izolatlar eklenerek iki farklı ağaç oluşturuldu. Oluşan ağaçlar arasında "bootstrap" değerlerinde, özellikle grup 2 izolatlarında, belirgin farklılıklar gözlemlendi (Şekil 6). Bu nedenle oluşturduğumuz filogenetik ağaçtaki düşük "bootstrap" değerlerinin seçilen subgenomik bölge ile ilişkili olduğunu düşünmekteyiz.



Resim 1: PCR bant görünümleri

A 1-16 no'lu hastalar, B 17-32 no'lu hastalar, C 33-42 no'lu hastalar ve 1-6 numaralı hemodiyaliz personeli, D Dizileme reaksiyonlarına alınan olumlu örneklerin saflaştırma sonrası bant görünümleri [11, 24, 32, 42 no'lu hemodiyaliz hastaları, 45 no'lu örnek (hemşire), K (dermatoloji kontrol olgusu)]. (N: negatif kontrol P: pozitif kontrol M: marker) (Beklenen bant büyüklüğü 344 bp)

Tablo 9: Çalışma grubunun özellikleri

Hasta no	Yaş (yıl)	Cinsiyet	Hemodiyaliz sağaltım nedenleri	Hemodiyaliz süresi (ay)	ALT (IU/ml)	Kan aktarım sayısı (ünite)
1	52	E	Henochschonlein purpurası	56	28	0
2	70	E	Obstrüktif nefropati	21	28	34
3	82	E	Kronik böbrek yetmezliği	16	34	1
4	58	K	Diabetik nefropati	59	23	0
5	68	E	Kronik böbrek yetmezliği	5	20	2
6	61	K	Kronik böbrek yetmezliği	104	34	0
7	50	K	Kronik böbrek yetmezliği (pyelonefrit)	96	22	0
8	62	K	Kronik böbrek yetmezliği (pyelonefrit)	9	40	0
9	61	K	Kronik böbrek yetmezliği	48	33	12
10	53	E	Kronik böbrek yetmezliği	3	32	0
11	80	K	Hipertansif nefropati	15	84	3
12	83	K	Kronik böbrek yetmezliği (pyelonefrit)	10	34	0
13	49	E	Post streptokoksik glomerulonefrit	15	18	0
14	37	E	Membrano proliferatif glomerulonefrit	10	195	0
15	75	K	Kronik böbrek yetmezliği (pyelonefrit)	18	29	7
16	74	K	Kronik böbrek yetmezliği	4	34	3
17	70	E	Membrano proliferatif glomerulonefrit	14	26	2
18	47	E	Polikistik böbrek hastalığı	40	14	0
19	57	E	Diabetik nefropati	11	24	0
20	66	K	Kronik böbrek yetmezliği	26	16	0
21	75	E	Kronik böbrek yetmezliği	17	12	0
22	49	E	Fokal segmental glomeruloskleroz	11	5	0
23	58	E	Kronik böbrek yetmezliği	20	22	0
24	10	E	Kronik böbrek yetmezliği	66	42	0
25	20	E	Ailesel akdeniz ateşi - Amiloidoz	3	13	2
26	29	K	Kronik böbrek yetmezliği	76	28	11
27	22	K	Ailesel akdeniz ateşi - Amiloidoz	94	25	4
28	51	E	Kronik böbrek yetmezliği	152	19	1
29	67	E	Kronik böbrek yetmezliği	16	16	7
30	54	E	IgA nefropatisi	20	12	0
31	28	E	Kronik böbrek yetmezliği	27	21	0
32	53	K	Kronik böbrek yetmezliği	10	25	0
33	61	K	Kronik böbrek yetmezliği	30	23	0
34	48	E	Kronik böbrek yetmezliği	40	23	0
35	76	K	Kronik böbrek yetmezliği	3	25	6
36	66	K	Diabetik nefropati-KBY	28	15	5
37	55	E	Kronik böbrek yetmezliği	10	8	0
38	14	K	Hemolitik üremik sendrom	39	28	0
39	67	K	Hipertansif nefroskleroz	6	20	5
40	51	K	Polikistik böbrek hastalığı	66	41	4
41	75	E	Kronik böbrek yetmezliği	56	15	0
42	65	E	Polikistik böbrek hastalığı	111	20	0

Tablo 10: HGV olumlu hastaların özellikleri

Hasta no	HGV RNA	AHCV	HbsAg	ALT* (IU/ml)	Kan aktarım miktarı (ünite)	Hemodiyaliz süresi (ay)
DEÜ2	+	-	-	25	34	21
DEÜ11	+	+	-	84	3	15
DEÜ24	+	+	+	79	-	66
DEÜ32	+	-	-	34	-	10
DEÜ42	+	-	-	20	-	111

* Son bir yıl içerisindeki ALT tepe değerleri gösterilmektedir.

Tablo 11: Hemodiyaliz hastalarının genel özellikleri

Yaş (yıl)	54 ± 18
Cinsiyet (erkek)	23 (%55)
Hemodiyaliz sağaltım süresi (ay)	35 ± 35
Kan aktarımı alan hasta sayısı (%)	17 (%40)
Kan aktarım miktarı (ünite)	2.6 ± 5.8
Cerrahi operasyon öyküsü	20 (%48)

	-331	-228
U59520	CCGGCACGGTCCACAGGTGTTGGCCCTACCGGTGGGAATAAGGCCCGACGTCAGGCTCGTCTGTTAAACCGAGCCCGTACCACCTGGGCAAAACGACGCCCCA	
DEÜ2-T.....C.....A.....
DEÜ11-T.....C.....A.....
DEÜ24-T.....G.....C.....
DEÜ32-T.....CA.....A.....
DEÜ42TT.....TC.....G.....T.....
HEMŞİRE-G.....G.....
DEÜderTG.....A.-.T.....

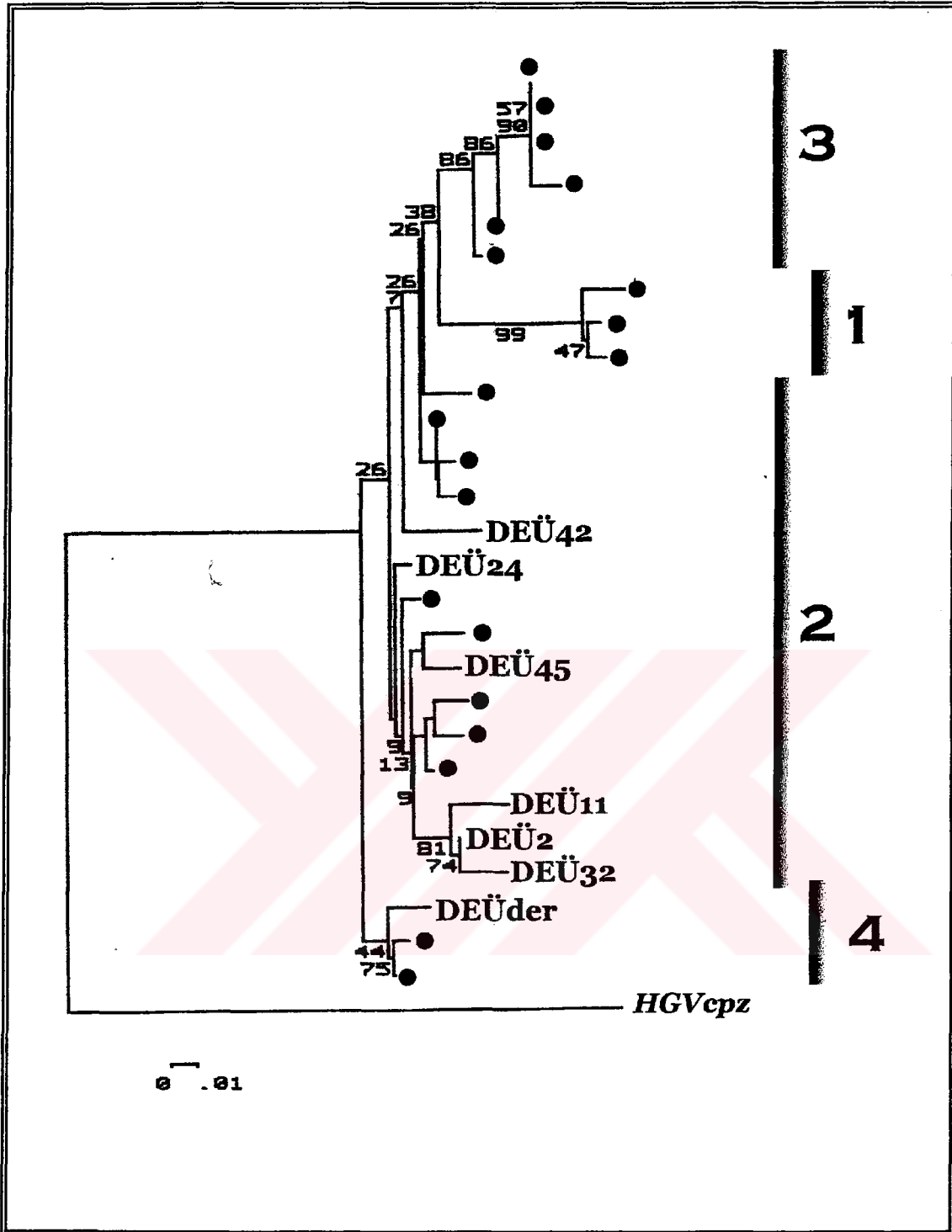
	-227	-128
U59520	CGTATGGTCCACGTCGCCCTTCAATGCCTCTCTTGGCCCAATAGGTTTAT.....	CCGGCGAGTTGACAAGGACCAAGTGGGGGTT-CGGGGAAGGA
DEÜ2C.....GA.TAGTAG.....A.....TT.....
DEÜ11G.....GA.TAGTAG.....A.....T..C
DEÜ24A.-.T.-.T.-.T.....G.....G.....A.A.....
DEÜ32GA..AGTAG.....G..T.....T.....AA.....TT.....
DEÜ42T.....A.....G.A.CA.....GAT.....
HEMŞİREAT.....G.T.....GT.....CA.A.....G..A
DEÜderA.-.-.TT.....A.....CA.A.....T.A.

Şekil 4: İzolatların hizalanmış nükleotid dizileri.

Numaralandırma, HGV-C ORF başlangıç kodonuna göre yapılmış ve 5'-NCR bölgesi negatif sayılarla tanımlanmıştır (23).

Koyu alan DEÜ2, DEÜ11 VE DEÜ32 numaralı izolatlarında saptanan insersiyon bölgesini göstermektedir.

U59520, HGV grup2 izolatıdır (23).



Şekil 5: HGV 5'- NCR dizilerinin filogenetik analizi

Bootstrap değerleri MEGA version 1.02 ile elde edilmiştir. Ağaçtaki sayılar bootstrap değerlerini göstermektedir (örnekleme sayısı 500). Dallar üzerindeki içi dolu daireler GenBank' den alınmış ve daha önce filogenetik grupları belirlenmiş olan izolatları göstermektedir.

Tablo 12: HGV 5'-NCR dizilerinin filogenetik uzaklıkları (distance)*

	DEÜ 2	DEÜ 11	DEÜ 24	DEÜ 32	DEÜ 42	Hemşire	DEÜ der	U59546 Grup 1	U59522 Grup 2
DEÜ2	-	0.0352	0.0511	0.0403	0.1202	0.0798	0.1197	0.1491	0.0575
DEÜ 11	-	-	0.0784	0.0730	0.1379	0.0796	0.1372	0.1552	0.0857
DEÜ 24	-	-	-	0.0848	0.0961	0.0464	0.0792	0.1289	0.0408
DEÜ 32	-	-	-	-	0.1396	0.1160	0.1449	0.1767	0.0914
DEÜ 42	-	-	-	-	-	0.1203	0.1141	0.1358	0.0737
Hemşire	-	-	-	-	-	-	0.0857	0.1488	0.0628
Kontrol	-	-	-	-	-	-	-	0.1365	0.0734
U59546(1)	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1046
U59522 (2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*Değerler Phylip DNAdist programı ile elde edilmiştir. Yakın izolatların evrimsel uzaklık değerleri koyu yazılmıştır.

7 TARTIŞMA

HGV tüm dünyada yaygın infeksiyonlara neden olan bir virustur. Sağlıklı bireylerde HGV-RNA görülme sıklığı % 1-4 arasında değişmektedir (1). Ülkemizde sağlıklı bireylerde yapılan çalışmalarda, Öztürk ve ark., % 0,5 (72), Günaydın ve ark., ise %3,4 (73) HGV-RNA oranları bildirmişlerdir. Çalışmamızda yer alan 158 kişilik kontrol grubunda %1,2 HGV-RNA saptanmıştır. Bu oran daha önceki çalışmalarda elde edilen sonuçlarla benzeşmektedir.

Hemodiyaliz hastaları, HGV infeksiyonları açısından sağlıklı popülasyona göre daha yüksek risk taşımaktadırlar. Hemodiyaliz hastalarında HGV-RNA saptanma oranları ülkeden ülkeye değişmektedir, bu oran %3-29 arasında bildirilmiştir (5,26,29,30,43,83,84). Ülkemizde, 67 KBY olgusunda %31,3 (72), 14 renal transplant alıcısında %42 (88), 42 hemodiyaliz hastasında %7,1 (96) ve 78 hemodiyaliz hastasında %34,6 oranında HGV-RNA saptanmıştır (73). Yaptığımız çalışmada hemodiyaliz sağaltımı alan 42 hastanın %12' sinde HGV-RNA saptanmıştır. Hemodiyaliz üniteleri arasında %7,1 ile %34,6 gibi oldukça farklı viremi oranları, evrensel infeksiyon kontrol kurallarına uyulup uyulmaması ile ilişkili olabileceği gibi PCR duyarlılıklarıyla da ilişkili olabilir.

Sağlık personelinde, parenteral yolla bulaşan infeksiyonlara sağlıklı popülasyona göre daha yüksek oranlarda rastlanmaktadır (98). Hemodiyaliz ünitesinde görevli 17 sağlık çalışanından birinde (%5,8) HGV-RNA saptanmıştır.

HGV 5'-NCR dizilerinin filogenetik analizi sonucunda hemodiyaliz hastalarından elde edilen izolatlarının tümü HGV grup 2 içerisinde yer almıştır. Grup 2, özellikle Avrupa ve ABD' de saptanmaktadır. Daha önce Erensoy ve ark., (88) tarafından Ege Üniversitesi' nde, transplant olgularında yapılan bir çalışmada, tüm HGV izolatları grup 2 olarak bulunmuştur. Erensoy ve ark.' nın çalışmaları ile çalışmamız birbirlerini desteklemektedir. Bu iki çalışmada da, tüm olgularda HGV grup 2 infeksiyonlarının saptanmış olması, ülkemizde baskın genotipin HGV grup 2 olabileceğini düşündürmektedir.

Hemodiyaliz hastalarından elde edilen DEÜ2, DEÜ11 ve DEÜ32 no'lu izolatlar grup iki içerisinde özel bir kümeleşme göstermiştir. Bu bulgu hastaların ortak bir kaynaktan infeksiyonu alabileceklerini ve infeksiyonların nozokomiyal olabileceğini düşündürmektedir.

Kontamine kan ve kan ürünlerinin aktarımı HGV açısından en önemli bulaş yollarından biridir (76-79). Fakat, HGV DEÜ32' ye hiç kan aktarımı yapılmamış, DEÜ2 ve DEÜ11 ise farklı kan grubu antijenleri taşıdıkları için aynı kaynaktan ortak kan almamışlardır. Bu nedenle, kan aktarımına bağlı bir bulaş söz konusu değildir. Hastalarda, heparin ya da pıhtılaşma faktörleri kullanımı gibi bulaşa neden olabilecek başka bir neden de saptanmamıştır.

Yetersiz dezenfeksiyon nedeni ile hemodiyaliz cihazlarının nozokomiyal HCV bulaşında rol oynayabileceği belirtilmiştir (102). DEÜ11 ile DEÜ2 ve DEÜ11 ile DEÜ32 aynı seansta ve bitişik hemodiyaliz cihazlarında sağaltım almış fakat DEÜ2 ve DEÜ32 aynı seansta hemodiyaliz almamıştır. Buna karşın, üç hasta da aynı cihazda ardışık seanslarda sağaltım almışlardır. Hemodiyaliz cihazları, her gece dezenfekte edilmektedir fakat sabah ve öğle seansları arasında dezenfeksiyon yapılamamaktadır. Bu nedenle birbirleri ile filogenetik olarak ilişkili bu üç izolatın bulaşında, hemodiyaliz cihazlarının rol oynayabileceğini düşünmekteyiz. Abacıoğlu ve ark.' nın (100) hemodiyaliz hastalarında yaptıkları çalışmada, HCV nozokomiyal bulaş moleküler olarak gösterilmiştir. Evrensel infeksiyon kontrol kurallarının tam olarak uygulanmaması, iki seans arasında dekontaminasyon yapılmaması gibi nedenlerin bulaştan sorumlu olabileceği belirtilmiştir.

Her üç izolatta da -180, -177 nükleotid pozisyonlarında diğer izolatlarda pek rastlanmayan dört bazlık bir insersiyon alanına rastlanmıştır (Şekil 4,7). 5'-NCR -182. -174. pozisyonlar arasında kalan alanın bir çok izolatta farklı olması, bu alanın değişken ve bu bölgedeki mutasyonların ise HGV için tolere edilebilir olduğunu düşündürmektedir.

PCR' daki en önemli sorunlardan biri hatalı olumlu sonuçlardır (103). Bunlar sıklıkla PCR uygulamaları sırasında oluşan kontaminasyonlara bağlıdır. Dolayısıyla bu üç hastanın örnekleri arasında çapraz kontaminasyon olabileceği düşünülebilir. Ancak, DEÜ32' nin DEÜ2 ve DEÜ11' den farklı günlerde çalışılmış olması, PCR reaksiyonlarında kullanılan çift negatif kontrolün sürekli negatif olması, negatif bulunan çok sayıda örneğin bulunması, diziler arasında en az 0.0352 kadar farklılık olması, farklı zamanlarda sonuçların yinelenerek kontrol edilmesi ve kontaminasyonu engellemek için tanımlanmış olan kurallara uyulması nedeni ile alınan sonuçların kontaminasyona bağlı olmadığını düşünmekteyiz (103).

HGV 5'-NCR -328 nükleotid pozisyonu 1997 yılında saptanmış, tüm grup 2 izolatlarında sitozin, grup 1 ve grup 3 izolatlarında ise genellikle adenin ya da nadiren guanin olarak gözlemlenmiştir ve bu nükleotid pozisyonunun, izolatların çoğunda grup tanımlayıcı bir özellik gösterdiği söylenebilir. Buna karşın yeni saptanan izolatlarda özellikle grup 4 içerisinde de aynı nükleotid pozisyonunda sitozin saptanabilmektedir. Benzer değişimler nedeni ile daha önce yüksek duyarlılıkla grup saptayabilen RFLP uygulamalarının yeniden gözden geçirilmesinin gerekli olduğunu düşünmekteyiz.

	207-	-159
U59538-3	AATGTCTCTCTTGACCAATAGGCTTTG----	CCGGCGAGTTGACAAGGA
D87253-3	AATGTCTCTCTTGACCAATAGGTTTTG----	CCGGCGAGTTGACAAGGA
U59539-3	AATGTCTCTCTTGACCAATAGGCTTTG----	CCGGCGAGTTGACAAGGA
U59546-1	AATGTCTCTCTTGACCAATAGGCTATG----	CCGGCGAGTTGACAAGGG
U59544-1	AATGTCTCTCTTGACCAATAGGCAATG----	CCGGCGAGTTGACAAGGG
U59543-1	AATGTCTCTCTTGACCAATAGGCAATG----	CCGGCGAGTTGACAAGGG
DEÜ24	AATGCCTCTCTTGCCAATAGGATTTT---	TCCGGCGAGTTGACAAGGA
Hemşire	AATGCCTCTCTTGCCAATAGGGTTTT--C-	CCGGCGAGTTGGCAAGGA
DEÜ2	AATGCCTCTCTTGCCAATAGGGATTAGTAC	CCGGCGAGTTGACAAGGA
DEÜ32	AATGCCTCTCTTGCCAATAGGGATAAGTAC	CCGGGGATTGACAAGGA
DEÜ11	AGTGCCTCTCTTGCCAATAGGGATTAGTAC	CCGGCGAGTTGGCAAGGG
U59522-2	AATGCCTCTCTTGCCAATAGGTTTAT----	CCGGCGAGTTGACAAGGA
DEÜ42	AATGTCTCTCTTGACCAATAGGGTAAC--A-	CCGGCGAGTTGGCAAGGA
DEÜderm	AATATCTCTCTTGATCAATAGGATTTT----	CCGGCGAGTTGACAAGGA

Şekil 7: İnsersiyon alanı

DEÜ2, DEÜ11, DEÜ32 no'lu izolatlarda 5'-NCR -180, -177 nükleotid pozisyonlarında saptanan olası insersiyon alanı (koyu harflerle gösterilmiştir).

8 SONUÇ ve ÖNERİLER

- 1- 5'- NCR filogenetik gruplandırmalar için uygun değildir, ancak bu çalışmada görüldüğü gibi moleküler epidemiyoloji açısından yararlı bilgiler sağlayabilir.
- 2- Hemodiyaliz hastaları HGV enfeksiyonları için riskli bir gruptur.
- 3- HGV ve benzer yolla bulaşabilecek tüm enfeksiyonlardan korunma amacıyla hemodiyaliz merkezinde evrensel enfeksiyon kontrol kurallarının daha iyi uygulanması sağlanmalıdır.

9 KAYNAKLAR

1. Alter H. J., Nakatsuji Y., Melpolder J., Wages J., Wesley R., Shih W. K., Kim J. P. The incidence of transfusion associated hepatitis G virus infection and its relation to liver disease. *New England Journal of Medicine* 1997;336:747-54
2. Simons J. N., Leary T. P., Dawson G. J., Pilot matias T. J., Muerhoff A. S., Schlauder G. G., Desai S. M., Mushahwar K. I. Isolation of novel virus-like sequences associated with human hepatitis. *Nature Medicine* 1995;1:564-9
3. Linnen J., Wages J., Zhang-Keck Z.Y., Fry K. E., Krawczynski K. Z., Alter H., Koonin E., Gallagher M., Alter M., Hadziyannis S., Karayiannis P., Fung K., Nakatsuji Y., Shih J. W-K., Young L., Piatak M., Hoover C., Fernandez J., Chen S., Zou J-C., Morris T., Hyams K. C., Ismay S., Lifson J. D., Hess G., Fuong S. K. H., Thomas H., Bradley D., Margolis H., Kim J. P. Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: a transfusion-transmissible agent. *Science* 1996;271:505-8.
4. Tacke M., Kiyosawa K., Stark K., Schlueter V., Ofenloch-Haehnle B., Hess G., Engel A. M. Detection of antibodies to a putative hepatitis G virus envelope protein. *Lancet* 1997;349:318-20
5. Masuko K., Mitsui T., Iwano K., Yamazaki C., Okuda K., Meguro T., Murayama N., Inoue T., Tsuda F., Okamoto H., Miyakawa Y., Mayumi M. Infection with hepatitis GB virus C in patients on maintenance hemodialysis. *New England Journal of Medicine* 1996;23:1485-90
6. Simons J.N., Pilot-Matias T.J., Leary T.P., Dawson G. J., Desai S. M., Schlauder G. G., Muerhoff A. S., Erker J. C., Buijk S. L., Chalmers M. L., Van Sant C. L., Mushahwar I. H. Identification of two flavivirus-like genomes in the GB hepatitis agent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995;92:3401-5.
7. Zuckerman A. J. The new GB hepatitis viruses. *Lancet* 1995;345:1453-4

8. Zuckerman A. J. Alphabet of hepatitis viruses. *Lancet* 1996;347:558-559
9. Badur S. Yeni viral hepatit etkenleri: GB virusları ve HGV. *Aktüel Tıp Dergisi* 1997;3:186-7
10. Schlauder G. G., Dawson G. J., Simons J. N., Pilot-Matias T. J., Gutierrez R. A., Heynen C. A., Knigge M. F., Kurpiewski G. S., Buijk S. D., Leary T. P., Muerhoff A. S., Desai S. M., Mushahwar I. K. Molecular and serologic analysis in the transmission of the GB hepatitis agents. *Journal of Medical Virology* 1995;46:81-90
11. Muerhoff A. S., Leary T. P., Simons J. N., Pilot-Matias T. J., Dawson G. J., Erker J. C., Chalmers M. L., Schlauder G. G., Desai S. M., Mushahwar I. K. Genomic organization of GB viruses A and B: two new members of the flaviviridae associated with GB agent hepatitis. *Journal of Virology* 1995;69:5621:30
12. Xiang J., Klinzman D., Mc Linden J., Schmidt W. N., LaBrecque D. R., Gish R., Stapleton J.T. Characterization of Hepatitis G Virus (GB-C Virus) particles: evidence for a nucleocapsid and expression of sequences upstream of the E1 protein. *Journal of Virology* 1998;72:2738-44
13. Dille B. J., Surowy T. K., Gutierrez R. A., Coleman P. F., Knigge M. F., Carrick R. J., Aach R. D., Hollinger F. B., Stevens C. E., Barbosa L. H., Nemo G. J., Mosley J. W., Dawson G. J., Mushahwar I. K. An elisa for detection of antibodies to the E2 protein of GB Virus C. *Journal of Infectious Diseases*. 1997;175:458-61
14. Simons J. N., Desai S. M., Schultz D. E., Lemon S. M., Mushahwar I. K. Translation initiation in GB viruses A and C: evidence for internal ribosome entry and implications for genome organisation. *Journal of Virology* 1996;80:6126-35
15. Leyssen P., Clerco E. D., Neyts J. Perspectives for the treatment of infections with *Flaviviridae*. *Clinical Microbiology Reviews* 2000;13:67-82
16. Hijikata M., Shimizu Y. K., Kato H., Iwamoto A., Shih J. W., Alter H. J., Purcell R. H., Yoshikura H. Equilibrium centrifugation studies of hepatitis C virus: evidence for circulating immune complexes. *Journal of Virology* 1993;67:1953-58

17. Belyaev A. S., Chong S., Novikov A., Kongpachith A., Masiarz F. R., Lim M., Kim J.P. Hepatitis G Virus encodes protease activities which can effect processing of the virus putative nonstructural proteins. *Journal of Virology* 1998;72:868-72
18. Gwack Y., Yoo H., Song I., Choe J., Han J. H. RNA-stimulated ATPase and RNA helicase activities and RNA binding domain of hepatitis G virus nonstructural protein 3. *Journal of Virology* 1999;73:2909-15
19. Pavesi A. Detection of signature sequences in overlapping genes and prediction of a novel overlapping gene in hepatitis G virus. *Journal of Molecular Evolution* 2000;50:284-95
20. Smith D. B., Basaras M., Frost S., Haydon D., Cuceanu N., Prescott L., Kamenka C., Millband D., Sathar M. A., Simmonds P. Phylogenetic analysis of GBV-C/ hepatitis G virus. *Journal of General Virology* 2000;81:2329-35
21. Khudyakov Y. E., Cong M., Bonafonte M. T., Abdulmalek S., Nicholas B. L., Lambert S., Alter M. J., Fields H. A. Sequence variation within a nonstructural region of the hepatitis G virus genome. *Journal of Virology* 1997;71: 6875-80
22. Giménez-Barcons M., Ibáñez A., Tajahuerce A., Sánchez-Tapias J-M., Rodés J., Martinez M-A., Saiz J-C. Genetic evolution of hepatitis G virus in chronically infected individual patients. *Journal of General Virology* 1998;79:2623-9
23. Smith D. B., Cuceanu N., Davidson F., Jarvis L. M., Mokili J., Hamid S., Ludlam C., Simmonds P. Discrimination of hepatitis G virus / GBV-C geographical variants by analysis of the 5'-non-coding region. *Journal of General Virology* 1997;78:321-8
24. Charrel R. N., DeMicco P., Lamballerie X., Phylogenetic analysis of GB viruses A and C: evidence for cospeciation between virus isolates and their primate hosts. *Journal of General Virology*. 1999;80:2329-35
25. Simmonds P., Smith D. B. Structural constraints on RNA virus evolution. *Journal of Virology* 1999;73:5787-94
26. Pujol F. H., Khudyakov Y. E., Devesa M., Cong M-E., Loureiro C. L., Blitz L., Capriles F., Beker S., Liprandi F., Fields H. A. Hepatitis G virus infection in Amerindians and other Venezuelan high-risk groups. *Journal of Clinical Microbiology* 1998;36:470-4

27. Konomi N., Miyoshi C., Zerain C. L. F., Li T-C., Arakawa Y., Abe K. Epidemiology of hepatitis B, C, E, and G virus infections and molecular analysis of hepatitis G virus isolates in Bolivia. *Journal of Clinical Microbiology* 1999;37:3291-5
28. Muerhoff A. S., Smith D. B., Leary T. P., Erker J. C., Desai S. M., Mushahwar I. K. Identification of GB virus C variants by phylogenetic analysis of 5'-untranslated and coding region sequences. *Journal of Virology* 1997;71:6501-8
29. Handajani R., Soetjipto., Lusida M. I., Suryohudoyo P., Adi P., Setiawan P. B., Nidom C. A., Soemarto R., Katayama Y., Fujii M., Hotta H. Prevalence of GB virus C/hepatitis G virus infection among various populations in Surabaya, Indonesia, and identification of novel groups of sequence variants. *Journal of Clinical Microbiology* 2000;38:662-8
30. Kao H. J., Chan P-J., Hsiang S. J., Chan W., Chan D. S. Phylogenetic analysis of GB virus C: comparison of isolates from Africa, North America and Taiwan. *Journal of Infectious Diseases* 1996;174:410-3
31. Naito H., Win K. M., Abe K. Identification of a novel genotype of hepatitis G virus in southeast Asia. *Journal of Clinical Microbiology* 1999;37:1217-20
32. Quarleri J. F., Mathet V. L., Feld M., Ferrario D., Della Latta M. P., Verdun R., Sanchez D. O., Oubina J. R. GB virus C/hepatitis G virus groups and subgroups: classification by a restriction fragment length polymorphism method based on phylogenetic analysis of the 5'-untranslated region. *Journal of Clinical Microbiology* 1999;37:1340-7
33. Fogeda M., Lopez-Alcorocho J. M., Bartolome J., Arocena C., Martin M. A., Carreno V. Existence of distinct GB virus C/hepatitis G virus variants with different tropism. *Journal of Virology* 2000;74:7936-42
34. Heringlake S., Osterkamp S., Trautwein C., Tillmann H. L., Böker K., Muerhoff S., Mushahwar I. K., Hunsmann G., Manns M. P. Association between fulminant hepatic failure and a strain of GBV Virus C. *Lancet* 1996;348:1626-9
35. Fogeda M., Navas S., Martin J., Casqueiro M., Rodriguez E., Arocena C., Carreno V. In vitro infection of human peripheral blood mononuclear cells by GB Virus C/ hepatitis G virus. *Journal of Virology* 1999;73:4052-61

36. Fiordalisi G., Zanella I., Mantero G., Bettinardi A., Stellini R., Paraninfo G., Cadeo G., Primi D. High prevalence of GB virus C infection in a group of Italian patients with hepatitis of unknown etiology. *Journal of Infectious Diseases* 1996;174:181-3
37. Laskus T., Radkowski M., Wang L. F., Vargas H., Rakela J. Lack of evidence for hepatitis G virus replication in livers of patients coinfecting with hepatitis C and G viruses. *Journal of Virology* 1997;71:7804-6
38. Laskus T., Wang L. F., Radkowski M., Jang S. J., Vargas H., Dodson F., Fung J., Rakela J. Hepatitis G Virus infection in American patients with cryptogenic cirrhosis: no evidence for liver replication. *Journal of Infectious Diseases* 1997;176:1491-5
39. Laskus T., Radkowski M., Wang L. F., Vargas H., Rakela J. Detection of hepatitis G virus replication sites by using highly strand-specific Tth-based reverse transcriptase PCR. *Journal of Virology* 1998;72:3072-75
40. Hsieh S., Yang P., Chen H., Liaw Y. Cloning and characterization of the extreme 5'-terminal sequences of the RNA genomes of GB Virus C/hepatitis G virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997;94:3206-10
41. Xiang J., Wünschmann S., Schmidt W., Shao J., Stapleton J. Full-length GB virus C (hepatitis G virus) RNA transcripts are infectious in primary CD4-positive T cells. *Journal of Virology* 2000;74:9125-33
42. Shimizu Y. K., Hijikata M., Kiyohara T., Kitamura Y., Yoshikura H. Replication of GB virus C (hepatitis G virus) in interferon-resistant daudi cells. *Journal of Virology* 1999;73:8411-4
43. Tribl B., Oesterreicher C., Pohanka E., Sunder-Plassmann G., Petermann D., Müller C. GBV-C/HGV in hemodialysis patients: anti-E2 antibodies and GBV-C/HGV-RNA in serum and peripheral blood mononuclear cells. *Kidney International*. 1998;53:212-6
44. Pessoa M. G., Terrault N. A., Detmer J., Kolberg J., Collins M., Hassobal H. M., Wright T. L. Quantitation of hepatitis G and C viruses in the liver: evidence that hepatitis G virus is not hepatotropic. *Hepatology* 1998;27:877-80

45. Alter M. J., Gallagher M., Morris T. T., Moyer L. A., Meeks E. L., Krawczynski K., Kim J. P., Margolis H. S. Acute non A-E hepatitis in the United States and the role of hepatitis G virus infection. *New England Journal of Medicine* 1997;11:741-6
46. Alter H. J. The Cloning and clinical implications of HGV and HGBV-C . *New England Journal of Medicine* 1996;23:1536-7
47. Thomas D., Vlahov D., Alter H. J., Hunt J. C., Marshall R., Astemborski J., Nelson K. E. Association of antibody to GB Virus C (Hepatitis G Virus) with viral clearance and protection from reinfection. *Journal of Infectious Diseases* 1998;177:539-42
48. Bukh J., Kim J. P., Govindarajan S., Apgar C. L., Fong S. K. H., Wages J., Yun A. J., Shapiro M., Emerson S. U., Purcell R. H. Experimental infection of chimpanzees with hepatitis G virus and genetic analysis of the virus. *Journal of Infectious Diseases* 1998;177:855-62
49. Nakatsuji Y., Shih J. W. K., Tanaka E., Kiyosawa K., Wages J. R., Kim J. P., Alter H. J. Prevalence and disease association of hepatitis G virus infection in Japan. *Journal of Viral Hepatitis* 1996;3:307-16
50. Hwang S. J., Lu R. H., Chan C. Y., Wang Y. J., Wu J. C., Lee S. D. The role of hepatitis G virus infection in patients with acute posttransfusion hepatitis in Taiwan. *Gastroenterology* 1997;112:1260-4
51. Kao J. H., Chen P.-J., Lai M. Y., Chen W., Liu D. P., Wang J. T., Shen M. C., Chen D. S. GB virus C / hepatitis G virus infection in an area endemic for viral hepatitis chronic liver disease, and liver cancer. *Gastroenterology* 1997;112:1265-70
52. Kanda T., Yokosuka O., Imazeki F., Tagawa M., Ehata T., Saisho H., Omata M. GB virus-C RNA in Japanese patients with hepatocellular carcinoma and cirrhosis. *Journal of Hepatology* 1997;27:464-69
53. Yoshida M., Okamoto H., Mishiro S. Detection of the GBV-C hepatitis virus genome in serum from patients with fulminant hepatitis of unknown aetiology. *Lancet* 1995;346:1131-1132

54. Halasz R., Barkholt L., Lara C., Hultgren C., Ando Y., Broomé U., Fischler B., Nemeth A., Ericzon B-G., Sönneborg A., Sällberg M. Relation between GB virus C / hepatitis G virus and fulmiant hepatic failure may be secondary to treatment with contaminated blood and / or blood products. *Gut* 1999;44:274-8
55. Tanaka E., Tacke M., Kobayashi M., Nakatsuji Y., Kiyosawa K., Schmolke S., Engel A. M., Hess G., Alter H. J. Past and present hepatitis G virus infections in areas where Hepatitis C is highly endemic and those where it is not endemic. *Journal of Clinical Microbiology* 1998;36:110-4
56. Brechot C., Jafedo F., Lagorce D., Gerken G., Meyer zum Buschenfelde K., Papakonstantinou A., Hadzyannis S., Romeo R., Colombo M., Rodes J., Bruix J., Williams R., Naumov N. Impact of HBV, HCV, GBV-C, on hepatocellular carcinomas in Europe: results of European concerted action. *Journal of Hepatology* 1998;29:173-83
57. Tan D., Matsumoto A., Conry-Centillena C., Melpolder J. C., Shih J. W. K., Leuther M., Hess G., Gibble J. W., Ness P. M., Alter H. J. Analysis of hepatitis G virus RNA, antibody to HGV envelope protein, and risk factors for blood donors coinfectd with HGV and hepatitis C virus. *Journal of Infectious Diseases* 1999;179:1055-61
58. Surowy T., Leary T. P., Carrick R. J., Knigge M. F., Pilot-Matias T. J., Heynen C., Gutierrez R. A., Desai S. M., Dawson G. J., Mushahwar I. K. GB virus C E2 glycoprotein: expression in CHO cells, purification and characterization. *Journal of General Virology* 1997;78:1851-9
59. Toniutto P., Fabris C., Barbone F., Tisminetzky S. G., Liani D., Galai T., Barillari C., Biffoni F., Gasparini V., Pirisi M. Immunoreactivity to putative B-cell epitopes of hepatitis G virus polyprotein in viremic and nonviremic subjects. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 1999;6:573-6
60. Schmolke S., Tacke M., Schmitt U., Engel A. M., Haehnle B. O. Identification of hepatitis G virus particles in human serum by E2-specific monoclonal antibodies generated by DNA immunization. *Journal of Virology* 1998;72:4541-5

61. Feucht H-H., Zöllner B., Polywka S., Knödler B., Schröter M., Nolte H., Laufs R. Prevalence of hepatitis G viremia among healthy subjects, individuals with liver disease, and persons at risk for parenteral transmission. *Journal of Clinical Microbiology* 1997;35:767-8
62. Andonov A., Sauder C., Jacobsen H., Chaudhary R. Comparison of six sets of PCR primers from two different genomic regions for amplification of GB Virus C / hepatitis G virus RNA. *Journal of Clinical Microbiology* 1998;36:286-9
63. Forns X., Tan D., Alter H. J., Purcell R. H., Bukh J. Evaluation commercially available and in-house reverse transcription-PCR assays for detection of hepatitis G virus or GB virus C. *Journal of Clinical Microbiology* 1997;35:2698-702
64. Adams N. J., Prescott L. E., Jarvis L. M., Lewis J. C. M., McClure M. O., Smith D. B., and Simmonds P. Detection in chimpanzees of novel flavivirus related to GB Virus-C/ Hepatitis G Virus. *Journal of General Virology* 1998;79:1871-7
65. Thomas D., Nakatsuji Y., Shih J. W., Alter H.J., Nelson K. E, Astemborski J. A. Lyles C. M., Vlahov D. Persistence and clinical significance of hepatitis G virus infections in injecting drug users. *Journal of Infectious Diseases* 1997;176:586-92
66. Bhardwaj B., Qian K., Detmer J., Mizokami M., Kolberg J. A., Urdea M. S., Schlauder G., Linnen J. M., Kim J. P., Davis G. L., Lau J. Y. N. Detection of GB virus-C/ hepatitis G virus RNA in serum by reverse transcription polymerase chain reaction. *Journal of Medical Virology* 1997;52:92-6
67. Chu C-M., Yeh C-T., Liaw Y-F. Viral superinfection in previously unrecognized chronic carriers of hepatitis B virus with superimposed acute fulminant versus nonfulminant hepatitis. *Journal of Clinical Microbiology* 1999;37:235-7
68. Chen M., Fischler B., Hultgren C., Halasz R., Nemeth A., Sällberg M. Analysis of GB virus C markers in families over three generations. *Journal of Clinical Microbiology* 1999;37:4153-5
69. Nordbø S. A., Krokstad S., Winge P., Skjeldestad F. E., Dalen A. B. Prevalence of GB virus C (also called hepatitis G virus) markers in Norwegian blood donors. *Journal of Clinical Microbiology* 2000;38:2584-90

70. Brown K. E., Wong S., Buu M., Binh T. V., Be T. V., Young N. H. High prevalence of GB virus C/hepatitis G virus in healthy persons in Hoi Chi Min City, Vietnam. *Journal of Infectious Diseases* 1997;175:450-3
71. Feucht H-H., Schröter M., Zöllner B., Polywka S., Laufs R. Age-dependent acquisition of hepatitis G virus/GB virus C in a nonrisk population: detection of the virus by antibodies. *Journal of Clinical Microbiology* 1999;37:1294-7
72. Öztürk N., Mistik R., Dilek K., Heper Y., Yurtkuran M., Töre O. Sağlıklı kişilerde ve kronik böbrek yetmezlikli hastalarda HGV-RNA prevalansı. Birinci Ulusal ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, 2000 Kapadokya. Özet Kitabı 33 (A15)
73. Gunaydin M., Bedir A., Akpolat T., Kuku I., Pekbay A., Esen S., Özyılkan E., Arik N., Cengiz K. Prevalance of serum HGV-RNA among hemodialysis patients in Turkey. *Infection* 1997;25:5-7
74. Semprini A. E., Persico T., Thiers V., Oneta M., Tuveri R., Serafini P., Boschini A., Guintelli S., Pardi G., Brechot C. Absence of hepatitis C virus and detection of hepatitis G virus / GB virus C RNA sequences in the semen of infected men. *Journal of Infectious Diseases* 1998;177:848-54
75. Chen M., Sönnernborg A., Johansson B., Sällberg M. Detection of hepatitis G virus (GB virus C) RNA in human saliva. *Journal of Clinical Microbiology* 1997;35:973-5
76. Jarvis L. M., Davidson F., Hanley J. P., Yap P. L., Ludlam C. A., Simmonds P. Infection with hepatitis G virus among recipients of plasma products. *Lancet* 1996;348:1352-5
77. Lara C., Halasz R., Sönnernborg A., Sällberg M. Detection of hepatitis G virus RNA in persons with and without known risk factors for blood-borne viral infections in Sweden and Honduras. *Journal of Clinical Microbiology* 1998;36:255-7
78. Morris A., Webster A.D.B., Brown D., Harrison T. J., Dusheiko G. GB virus C infection in patients with primary antibody deficiency. *Journal of Infectious Diseases* 1998;177:1719-22
79. Lefrère J. J., Ravera N., Corbi C., Mariotti M., Loiseau P. Infection with hepatitis G virus in immunoglobulin recipients. *Lancet* 1997;349:206

80. Schlueter V., Schmolke S., Stark K., Hess G., Offenloch-Haehnle B., Engel A. M. Reverse transcription-PCR detection of Hepatitis G Virus. *Journal of Clinical Microbiology* 1996;34:2660-4
81. Kao J. H., Huang C. H., Chen V., Tsai T. J., Lee S. H., Hung K. Y., Chen D. S. GB virus C infection in hemodialysis patients: molecular evidence for nosocomial transmission. *Journal of Infectious Diseases* 1999;180:191-4
82. Sampietro M., Badalamenti S., Graziani G., Como G., Buccianti G., Corbetta N., Ticozzi A., Archenti A., Lunghi G., Penso D., Pizzuti A., Fiorelli G., Ponticelli C. Hepatitis G virus infection in hemodialysis patients. *Kidney International* 1997;51:348-52.
83. Forns X., Llama P.F., Costa J., Lopez-Labrador F. X., Ampurdanes S., Olmedo E., Saiz J. C., Guilera M., Lopez-Pedret J., Sanchez-Tapias J. M., Darnell A., Jimenez de Anta M. T., Ordinas A., Rodes J. Hepatitis G virus infection in haemodialysis unit: prevalence and clinical implications. *Nephrology, Dialysis, Transplantation* 1997;12:956-60
84. Szabo A., Viazov S., Heemann U., Kribben A., Philipp T., Roggendorf M. GBV-C /HGV infection in renal dialysis and transplant patients. *Nephrology, Dialysis, Transplantation* 1997 ;12:2380-4.
85. deLamballerie X., Charrel R. N., Dussol B. Hepatitis GB virus C in patients on hemodialysis. *New England Journal of Medicine* 1996;334:1549
86. Dussol B., Charrel R., Lamballerie X., Berthezene P., Brunet P., De Micco P., Raoult D., Berrland Y. Prevalence of hepatitis G virus infection in kidney transplant recipients. *Transplantation* 1997; 64:537-9.
87. Stark K., Meyer C. G., Tacke M., Schwarz A., Braun C., Huzly D., Angel A. M., May J., Bienzle U. Hepatitis G virus RNA and hepatitis G virus antibodies in renal transplant recipients. *Transplantation* 1997;64:608-12.
88. Erensoy S., Zeytinoglu A., Goksel S., Ozacar T., Ozkahya M., Turkoğlu S., Bilgiç A. Renal transplant olgularında hepatit G virus infeksiyonu ve genotipleri. Birinci Ulusal ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, 2000 Kapadokya. Özet Kitabı 31 (A13)

89. Fishler B., Lara C., Chen M., Sönnerborg A., Nemeth A., Sällberg M. Genetic evidence for mother-to-infant transmission of hepatitis G virus. *Journal of Infectious Diseases* 1997;176:281-5
90. Lin H. H., Kao J. H., Yeh K. Y., Liu D. P., Chang M. H., Chen P. J., Chen D. S. Mother-to-infant transmission of GB virus C / hepatitis G virus: the role of high-titered maternal viremia and mode of delivery. *Journal of Infectious Diseases* 1998;177:1202-6
91. Zuin G., Sacconi B., Giacomo S. D., Tanzi E. Zanetti A. R., Principi N. Outcome of mother to infant acquired GBV-C / HGV infection. *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition* 1999;80:72-3
92. Lin H. H., Kao J. H., Chen P. J., Chen D. S. Mechanism of vertical transmission of hepatitis G. *Lancet* 1996;347:1116
93. Menéndez C., Sanchez-Tapias J-M., Alonso P., Barcons M. G., Kahigwa E., Aponte J-J., Mshinda H., Navia M-M., Jimenez deAnta M-T., Rodés and Saiz J-C. Molecular evidence of mother-to-infant transmission of hepatitis G virus among women without known risk factors for parenteral infections. *Journal of Clinical Microbiology* 1999;37:2333-36
94. Feucht H-H., Zöllner B., Polywka S. Vertical transmission of hepatitis G. *Lancet* 1996;347:615
95. Tanaka E., Alter H. J., Nakatsuji Y., Shih J. W. K., Kim J. P., Matsumoto A., Kobayashi M., Kiyosawa K. Effect of hepatitis G virus infection on chronic hepatitis C. *Annals of Internal Medicine* 1996;125:740-3
96. Şengül A., Uyanık U., İnal A., Orkunoglu F. E. Hemodiyaliz hastalarında HGV sıklığının "reverse transcriptase polimerase chain reaction" (RT-PCR) yöntemi ile araştırılması. Birinci Ulusal ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, 2000 Kapadokya. Özet Kitabı 32 (A14)
97. Andreoli T., Carpenter C. C. J., Plum F., Smith L. H. Kronik böbrek yetmezliği. "Cecil Essentials of Medicine" Sayfa 315, 2. Baskı, Yüce Yayınları, İstanbul-1990
98. Beltrami E. M., Williams I. T., Shapiro C. N., Chamberland M. E. Risk and management of blood-borne infections in health care workers. *Clinical Microbiology Reviews* 2000;13:385-407

99. Fatma Bacaksız. Hmeodiyaliz hastalarında hepatit C virus (HCV) infeksiyonunun cDNA polimeraz zincir tepkimesi ile gösterilmesi ve HCV genotiplerinin belirlenmesi. 1998, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Uzmanlık Tezi
100. Abacıoğlu Y. H., Bacaksız F., Bahar İ. H., Simmonds P. Molecular evidence of nosocomial transmission of hepatitis C virus in haemodialysis unit. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2000;19:182-6
101. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 1987;162:156-9
102. Pujol F. H., Ponce J. G., Lema M. G., Capriles F., Devesa M., Sirit F., Salazar M., Vasquez G., Monsalve F., Blitz-Dorfman L. High incidence of hepatitis C virus infection in hemodialysis patients in unit with high prevalence. *Journal of Clinical Microbiology* 1996;34:1633-36
103. Kwok S., Higoshi R. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 1989;339:237-8