

T.C.
ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SAĞLIKLI KAN DONÖRLERİNDE
TRANSFÜZYONLA GEÇEN VİRÜS (TT VİRÜS)
SIKLIĞININ ARAŞTIRILMASI

Bio. Şeyda ÖZSOY

MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BOLU
2012

T.C.
ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SAĞLIKLI KAN DONÖRLERİNDE
TRANSFÜZYONLA GEÇEN VİRÜS (TT VİRÜS)
SIKLIĞININ ARAŞTIRILMASI

Bio. Şeyda ÖZSOY

MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Esra KOÇOĞLU

Bu çalışma Abant İzzet Baysal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Birimi tarafından desteklenmiştir |Proje numarası: 2011.08.01.404 |.

BOLU
2012

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ONAY SAYFASI

Abant İzzet Baysal Üniversitesi,
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne,

Şeyda ÖZSOY tarafından hazırlanan ve 18.01.2012 tarihinde savunulan “**Sağlıklı Kan Donörlerinde Transfüzyonla Geçen Virüs (TT Virüs) Sıklığının Araştırılması**” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından Mikrobiyoloji Programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

| | | |
|---------------|---------------------------------------|--------|
| Tez Danışmanı | Doç. Dr. Esra KOÇOĞLU (AİBÜ) | (imza) |
| Üye | Prof. Dr. Erol AYAZ (AİBÜ) | (imza) |
| Üye | Yrd. Doç. Dr. Mehmet ÖZTÜRK (AİBÜ) | (imza) |

ONAY:

Bu tez, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Yönetim Kurulu'nun kararıyla kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Esra KOÇOĞLU
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda yapmış olduğum yüksek lisans eğitimim süresince tez konumun belirlenmesi, şekillenmesi, yürütülmesi ve tez sürecinin organizasyonunda beni bilimsel çalışmaya yönlendiren mesleğimi, mikrobiyolojiyi bir kez daha sevdiğim tıpkı bölümün adında olduğu gibi en küçük ayrıntıları bile benimseten, mesleki kariyerimde örnek aldığım ve almaya devam edeceğim, ailemden uzakta geçirdiğim eğitim dönemim boyunca ailevi desteğini de her zaman yanımda hissettiğim danışman hocam Doç.Dr.Esra KOÇOĞLU'na ve eşi Prof. Dr. Hasan KOÇOĞLU'na,

Sabretmenin erdemini, mütevazî olmayı, çalışma azminin gerekliliklerini bunun yanında hayatın ertelenmeyecek kadar kısa olduğunu bir kez daha öğreten, hatırlatan hocam Prof.Dr. Erol AYAZ'a,

Sorduğu öğretici sorularıyla beni sürekli çalışmaya teşvik eden, aklımın bir köşesinde kalsın diyerek edindiği deneyimlerini her daim paylaşan, tebessümü yüzünden eksik olmayan hocam Yrd. Doç. Dr.Tekin TAŞ'a,

Tezimin istatistiksel analizlerinde yardımını esirgemeyen, sürekli kapısını çaldığım hocam Yrd. Doç. Dr. Aysu KIYAN'a,

Tezimin biyokimyasal çalışmalarında gerek kaynak gerekse tecrübeleriyle yanımda olan başaracağıma benden çok inanan güler yüzlü hocam Doç.Dr.Güler BUĞDAYCI'ya,

Yaklaşık 6 yıldır tanıdığım ama master döneminde Bolu'daki yaşantımı renkli kılan, maddî manevî desteğini esirgemeyen abim Uzm. Dr. Murat DIRAMALI'ya,

Aynı gün başladığımız eğitim dönemini acı tatlı anılarla aynı gün sonlandırdığım, tezimin çalışma aşamalarında da yardımını esirgemeyen, bunaldığım anlarda imdat diyebildiğim arkadaşım Bio. Ali Osman ARSLAN'a,

Departmandaki 4 aylık yalnızlığımı sonlandıran birlikte daha nice çalışmalar yapacağım, Tekin Hocamın deyimiyle partnerim, ekürim Dr.Özlem BUCAK'a,

Tezimin basımı ve yürütülmesi aşamasında beni destekleyen Abant İzzet Baysal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi'ne,

Çalışmalarım boyunca beni maddî manevî her konuda destekleyen, sabrını esirgemeyen, eğitimim konusunda hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan benim yegane

varlığım her şeyim canım anneme, keşke şimdide yanımda olsaydı dediğim pamuğum anneanneme, teyzeme, aileme ve buraya isimlerini tek tek yazamadığım ama her daim yanımda olduklarını bildiğim dostlarım ve arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bio. Şeyda ÖZSOY
BOLU-2012

ÖZET

TT virüs (TTV) 1997'nin sonunda, Japonya'da etiyolojisi bilinmeyen akut posttransfüzyon hepatitli bir hastanın serumundan izole edilmiştir. Farklı coğrafi bölgelerde değişik oranlarda görülen bu virüsün parenteral geçişinin yanı sıra farklı yollardan bulaşabildiği de gösterilmiştir. Bu virüsün karaciğer hastalıklarındaki rolü henüz belirlenebilmiş değildir. Bu çalışmada sağlıklı kan donörlerinde TTV sıklığı ve bunun karaciğer fonksiyonları üzerine etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır.

Bu amaçla 500 sağlıklı kan donörü ile HBV DNA'sı pozitif 100 hasta ve HCV RNA'sı pozitif 85 hastanın kan örnekleri alındı. TTV DNA pozitifliği Real Time PCR ile saptandı. İstatistiksel analiz için ki-kare testi kullanıldı ve $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edildi.

Sağlıklı kan donörlerinde TTV DNA pozitiflik oranı %79,8 (n=399) iken, HBV DNA pozitif örneklerde %96 (n=96), HCV RNA pozitif örneklerde ise %83,5 (n=71) olarak bulundu. TTV DNA'sı pozitif olan Hepatit B ve C hasta grupları ile sağlıklı kan donörleri, ALT ve AST pozitifliği açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı.

TTV'nin tek başına karaciğer hasarı yapmadığı ve TTV pozitifliğinin HBV grubunda daha fazla bulunmasının HBV'nin, TTV replikasyonunda katkısının olabileceği kanaatine varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Transfüzyonla geçen virus, TTV, Sağlıklı kan donörleri.

ABSTRACT

TT virus (TTV) is a recently discovered DNA virus that is associated with acute posttransfusion hepatitis of unknown etiology in Japan in late 1997. Parenteral transmission of the virus in different proportions in different geographical regions, as well as infected are shown in different ways. The role of this virus diseases of the liver is not a factor identified yet. In this study, we investigated the prevalence of TTV in healthy blood donors and detected a relationship between prevalence of TTV and liver functions.

For this purpose, 500 healthy blood donors, 100 patients with positive HBV DNA and 85 patients with HCV RNA positive blood samples were obtained. TTV DNA was detected by RT-PCR. Chi-square test was used for statistical analysis and $p < 0.05$ was considered significant.

TTV DNA were found positive in %79,8 of healthy blood donors, %96 of HBV DNA positive samples and %83,5 of HCV RNA positive samples. TTV DNA positive patients with Hepatitis B and C positive group and the healthy blood group in terms of ALT and AST compared with a positive statistically significant difference were found.

TTV positivity didn't do damage in liver alone and the presence of TTV in HBV group more, can be concluded that the contribution of TTV replication.

Keywords: Transfusion-transmitted virus, TTV, Healthy blood donors

İÇİNDEKİLER

| | |
|---------------------------------|------|
| • ONAY SAYFASI | iii |
| • TEŞEKKÜR | iv |
| • ÖZET | vi |
| • ABSTRACT | vii |
| • İÇİNDEKİLER | viii |
| • SİMGELER ve KISALTMALAR | x |
| • ŞEKİLLER | xii |
| • TABLOLAR | xiii |
| • GRAFİKLER | xiv |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 3 |
| 2.1. TT Virüs | 3 |
| 2.1.1.1.Tarihçe ve İsimlendirme | 3 |
| 2.1.1.2.Genel Özellikleri | 3 |
| 2.1.1.3.Genetik Çeşitlilik | 6 |
| 2.1.1.4.TT Virüs-Konak İlişkisi | 6 |
| 2.1.1.5.Patogenez ve Patoloji | 8 |
| 2.1.1.6.Klinik | 9 |
| 2.1.1.7.Laboratuvar Tanı | 11 |
| 2.1.1.8.Epidemiyoloji | 12 |
| 2.1.1.9.İmmun Yanıt | 13 |
| 2.2. Hepatit B Virüsü | 14 |
| 2.2.1.1.Bulaş | 14 |
| 2.2.1.2.Klinik | 15 |
| 2.2.1.3.Tanı | 15 |
| 2.2.1.4.Patogenez | 16 |
| 2.3. Hepatit C Virüsü | 16 |
| 2.3.1.1.Epidemiyoloji ve Bulaş | 17 |
| 2.3.1.2.Klinik | 18 |

| | |
|---|-----------|
| 2.3.1.3.Tanı | 19 |
| 2.4. Alanin Aminotransferaz ve Aspartat Aminotransferaz | 19 |
| 2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) | 21 |
| 2.5.1.1.PZR İşleminin Uygulama Aşamaları ve Prensipleri | 21 |
| 2.5.1.2.DNA'nın Denatürasyonu Aşaması | 22 |
| 2.5.1.3.Primerlerin Bağlanması Aşaması | 22 |
| 2.5.1.4. Primerlerin Uzatılması Aşaması | 23 |
| 2.5.1.5. Gerçek Zamanlı PZR (Real-time PCR) | 24 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM | 27 |
| 3.1. Hastalar | 27 |
| 3.2. Serolojik Testler | 27 |
| 3.3. DNA İzolasyonu | 28 |
| 3.4. Amplifikasyon | 29 |
| 3.5. İstatistiksel Analiz | 29 |
| 4. BULGULAR | 33 |
| 5. TARTIŞMA | 37 |
| 6. SONUÇ ve ÖNERİLER | 40 |
| 7. KAYNAKLAR | 41 |
| 8. EKLER | 58 |

SİMGELER VE KISALTMALAR

| | |
|---------------|--|
| A: | Adenin |
| ALP: | Alkalen fosfataz |
| ALT: | Alanin aminotransferaz |
| AST: | Aspartat aminotransferaz |
| AIDS: | Edinilmiş Bağışıklık Eksikliği Sendromu |
| bp: | Baz çifti |
| C: | Sitozin |
| °C: | Derece santigrat |
| CMV: | Sitomegalovirüs |
| CTL: | Sitotoksik T lenfosit |
| dk: | Dakika |
| DNA: | Deoksiribonükleik asit |
| dsDNA: | Çift iplikli DNA |
| DSÖ: | Dünya Sağlık Örgütü |
| EBV: | Epstein–Barr virüs |
| ELISA: | Enzim Linked Immuno Sorbent Assay |
| G: | Guanin |
| GGT: | Gama-glutamil transferaz |
| HBsAg: | Hepatit B yüzey antijeni |
| HBV: | Hepatit B virüsü |
| HCC: | Hepatoselüler kanser |
| HCV: | Hepatit C virüsü |
| HGV: | Hepatit G virüsü |
| HHV 8: | İnsan Herpes Virüs 8 |
| HIV: | İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü |
| HPV: | İnsan Papilloma Virüsü |
| HTLV: | İnsan T hücre Lenfotropik Virüsü |
| ICTV: | Virus Taknominasi Uluslararası Komitesi |
| IFCC: | Laboratuvar Tıbbı ve Klinik Kimya Uluslararası Federasyonu |
| IIM: | İdiopatik inflamatuvar miyopati |

| | |
|-------------------|---|
| kb: | Kilobaz |
| KC: | Karaciğer |
| LDH: | Laktat dehidrogenaz |
| mRNA: | Mesajcı RNA |
| µl: | Mikrolitre |
| ml: | Mililitre |
| MS: | Multipl skleroz |
| MSRV: | Multipl Skleroz İlişkili Virüs |
| ORF: | Açık Okuma Çerçevesi |
| PCR (PZR): | Polimeraz Zincir Reaksiyonu |
| PT: | Protombin zamanı |
| PTT: | Parsiyel tromboplastin zamanı |
| RA: | Romatoid artrit |
| RNA: | Ribonükleik asit |
| rpm: | Dakikada devir sayısı |
| RT-PCR: | Real-time PCR (Gerçek Zamanlı PZR) |
| SGOT: | Serum glutamat oksaloasetat transaminaz |
| SGPT: | Serum glutamat piruvat transaminaz |
| SKD: | Sağlıklı Kan Donörü |
| SLE: | Sistemik Lupus Eritematozus |
| sn: | saniye |
| T: | Timin |
| TLMV: | TTV benzeri mini virüs |
| TTMV: | Torque teno mini virus |
| TTV: | Transfusion Transmitted Virus (Transfüzyonla Geçen Virüs) |
| UTR: | Kodlanmayan bölge |

ŞEKİLLER

- Şekil 2.1.2.1:** TTV'nin elektron mikroskopundaki görünümü.
- Şekil 2.1.2.2:** TTV genom organizasyonu.
- Şekil 2.1.3.1:** TTV'nin filogenetik ağacı.
- Şekil 2.5.1.1:** Polimeraz zincir reaksiyonu.
- Şekil 2.5.2.1:** SyBr Green boyasının çift iplikli DNA'ya bağlanması.
- Şekil 3.4.1:** TTV DNA pozitif olan serum örneklerine ait erime eğrisi.
- Şekil 3.4.2:** TTV DNA negatif olan serum örneklerine ait erime eğrisi.
- Şekil 3.4.3:** TTV DNA'sı pozitif olan serum örneklerine ait amplifikasyon eğrisi.
- Şekil 3.4.4:** TTV DNA negatif olan serum örneklerine ait amplifikasyon eğrisi.

TABLolar

Tablo 2.4.1: Seruma göre ünitede olarak insan dokularında transaminaz aktiviteleri.

Tablo 3.4.1: Yapılan Real-time PCR işlemindede kullanılan reaksiyon karışımının içeriği.

Tablo 3.4.2: Gerçek zamanlı PZR döngüsü

Tablo 4.1: Çalışmaya dahil edilen hastaların cinsiyete göre dağılımı.

Tablo 4.2: HBV, HCV ve SKD'de TTV DNA prevalansı.

Tablo 4.3: TTV DNA pozitif ve negatif olan gruplardaki ALT ve AST pozitif hasta sayıları.

GRAFİKLER

- Grafik 4.1:** Hastaların cinsiyete göre dağılımı.
- Grafik 4.2:** HBV, HCV ve SKD'de TTV DNA prevalansı.
- Grafik 4.3:** TTV DNA pozitif ve negatif olan gruplardaki ALT ve AST pozitif hasta sayıları.

1.GİRİŞ

Kan transfüzyonu kan veya bir kan ürününün doğrudan bireyin dolaşım sistemine verilmesidir (1). Akut veya kronik bir şekilde gelişebilen kan ve/veya komponentlerinin kaybı durumunda veya çeşitli hastalıkların tedavisi için günümüzde kan transfüzyonları yoğun olarak kullanılmaktadır (2). İnsandan insana kan transfüzyonunu ilk uygulayanlardan biri olan James Blundel'den günümüze kadar kan ve kan ürünleri transfüzyonu ile ilişkili çalışmalar birçok evrelerden geçmiştir. Bu süreçte temel amaç her zaman güvenli kan olmuştur. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) güvenli kanın tanımını; verildiği kişide herhangi bir tehlike yada hastalık oluşturmayan, infeksiyon etkenlerini veya zararlı yabancı maddeleri içermeyen kan olarak yapmaktadır. Her ne kadar güvenli kanın en önemli parametrelerinden biri olarak non-infeksiyöz özellikte olması kabul edilse bile, infeksiyöz etkenlerin bulaş oranını bugün için sıfırlamak mümkün gözükmemekte, ancak minimum düzeylere düşürülmeye çalışılmaktadır (3). Transfüzyonla virüs infeksiyonlarının bulaşabilmesine ilişkin ilk veriler 1940'lı yıllara kadar uzanmaktadır. Bu yolla bulaşabilen viral etkenlerin sayısı her geçen gün artmakla birlikte transfüzyon tıbbında başta İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü (HIV), Hepatit B Virüsü (HBV) ve Hepatit C Virüsü (HCV) olmak üzere bazı virüsler transfüzyon güvenliği açısından önem kazanmıştır (4). Günümüzde de kan komponentleri, bu etkenlere ek olarak *Treponema pallidum* açısından taramaktadır. İnfekte donörün belirlenmesi amacıyla burada bahsi geçen etkenlerin haricindekilerin tanımlanması için herhangi bir test yapılmamaktadır (5, 6).

Virüsler, kan ve kan ürünleri ile bulaşan ve en çok hastalık oluşturan mikroorganizmalardır. Transfüzyonla bulaşan viral etkenlerden HBV, HCV ve Edinilmiş İmmün Yetmezlik Sendromu (AIDS) etkeni HIV 1-2)başlıcalarıdır. Bunlardan başka Sitomegalovirüs (CMV), Epstein-Barr Virüs (EBV), Parvovirüs B19, İnsan T hücre Lenfotropik Virüs 1-2 (HTLV 1-2) de transfüzyonla geçebilir. Ayrıca günümüze kadar yapılan birçok çalışmada Hepatit G Virüs (HGV), Transfüzyonla Geçen Virüs (TTV), İnsan Herpes Virüs tip-8 (HHV-8), Multiple Sklerosis İlişkili Virüs (MSRV) ve Sen-V virüslerinin de tranfüzyonla geçtiği raporlanmıştır (7-14).

Yeni moleküler yöntemlerin gelişmesiyle 1997 yılında transfüzyona bağlı hepatiti olan bir hastanın serumundan izole edilen ve hastanın isminin baş harfleriyle (TT) adlandırılan ve daha sonra transfüzyonla geçen virüs (transfusion transmitted virüs) anlamında da kullanılan TT virüs (TTV) önceleri yeni bir hepatit virüsü adayı iken, ilerleyen yıllarda sağlıklı kişilerde de çeşitli vücut sıvılarında virüsün varlığının gösterilmesiyle tartışmalar yeni bir boyut kazanmıştır (15, 16). Hastalardaki ısrarcı TTV enfeksiyonlarının karaciğer bozukluklarına katkıda bulunduğunu gösteren çalışmalar yanında, TTV'nin karaciğer hücrelerine herhangi bir zarar verip vermediğini tam olarak gösteremeyen çalışmalar da vardır (17, 18). Jeon ve ark. çalışmalarında TTV pozitifliğinin karaciğer fonksiyonları üzerine etkisinin olmadığını raporlamışlardır (19).

Bu çalışmada transfüzyon merkezine başvuran sağlıklı kan donörleri ile hepatit B ve hepatit C hastalarında TTV sıklığının araştırılması ve TTV yönünden pozitif bulunanlar arasında Alanin aminotransferaz (ALT) ve Aspartat aminotransferaz (AST) düzeylerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. TT Virüs

2.1.1. Tarihçe ve İsimlendirme

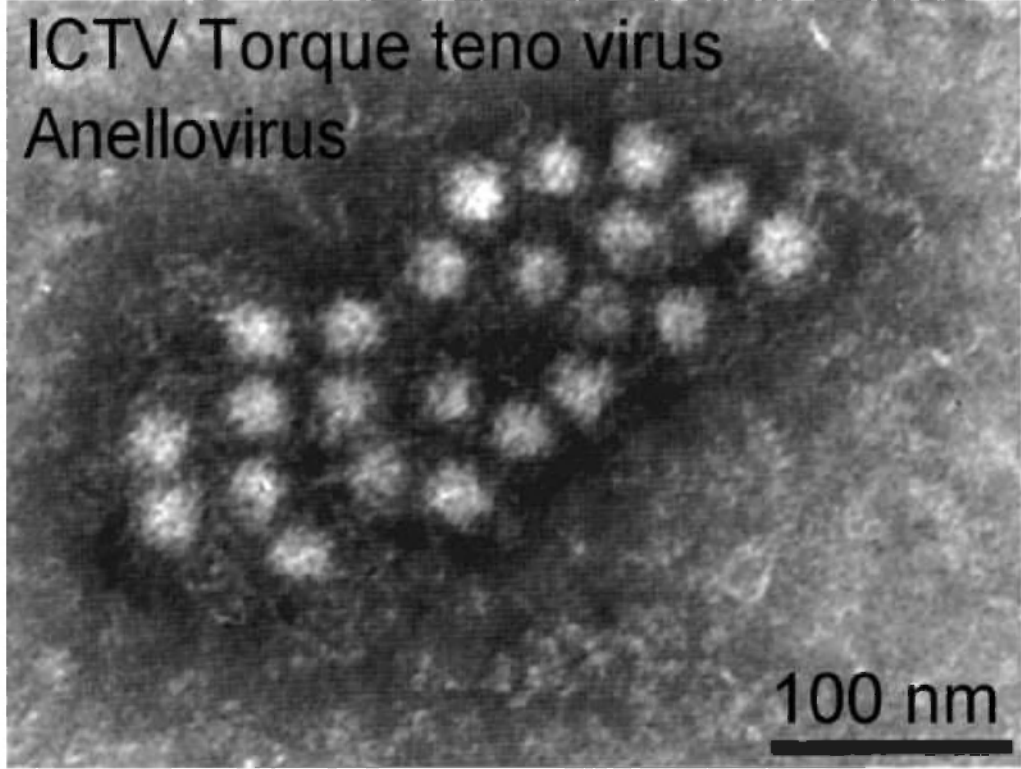
TT virüs (TTV) 1997'nin sonunda, Japonya'da etiyojisi bilinmeyen akut posttransfüzyon hepatitli bir hastanın serumundan izole edilmiştir. Önceleri transfüzyon sonrası gelişen hepatitten sorumlu olduğu düşünölmüş, bu kısaltmayı transfüzyonla bulaşan ("transfusion transmitted") virüs anlamında kullananlar olmuştur. Nishizawa ve ark. buldukları bu yeni virüsü adlandırırken saptadıkları hastanın isminin baş harflerini kullandıklarını ifade etmişlerdir (10). Daha sonraları TTV, Torque teno virüs (Latince "torques",kolye ; "tenuis",ince) olarak da kullanılmıştır (20).

2.1.2. Genel Özellikleri

TTV'nin ilk tanımlandığı orijinal 500 baz uzunluğundaki DNA klonu N22 olarak isimlendirilmiştir. Bu klondan elde edilen primerler kullanılarak, ALT düzeyi yüksek bir kan donörünün plazmasından bir TTV izolatu (TA278) bulunmuştur. Okamoto 1998 yılında virüs genomunun 3739 nükleotidli, tek sarmallı DNA olduğunu tanımlamıştır (21). Önce iki açık okuma çerçevesi (ORF1 ve ORF2) bulunduğu; ardından üç ORF olduğu gösterilmiştir (21, 22). Batı Afrika'dan başka bir grup nükleotid dizisini verdikleri bir TTV izolatuının genomunun dairesel, negatif polariteli, 3852 nükleotidli olduğunu bildirmiştir (22).

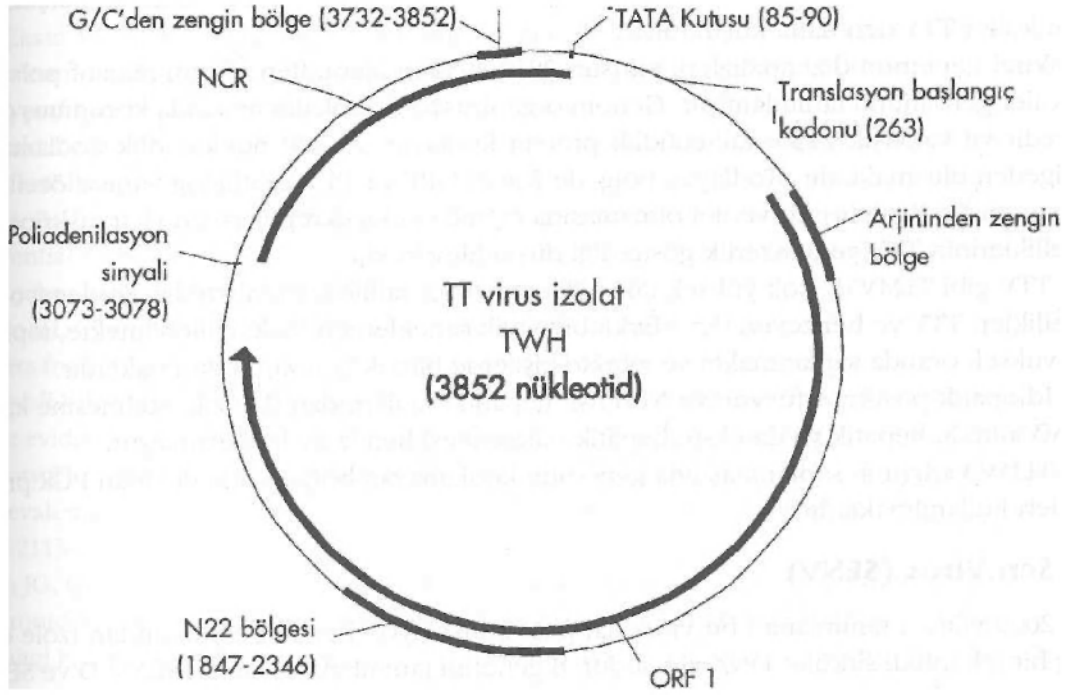
TTV'nin dizi analizi nedeniyle önce Parvoviridae ailesi ile ilişkili olduğu düşünölmüş daha sonra sirköler DNA'dan oluşan genomu ve genomik özelliklerinin benzerliğinden Circoviridae ailesi içinde incelenmesi önerilmiştir (23).

TT Virüs, Virüs Taknomisi Enternasyonal Komitesi (ICTV) tarafından resmi olarak sınıflamaya alınmamış ancak en son hazırlanan 2009 sınıflamasına göre Anelloviridae ailesi içinde yer almıştır (24).



Şekil 2.1.2.1: TTV'nin elektron mikroskopundaki görünümü (24).

Anellovirüsler, vertebralıları infekte eden tek iplikli sirküler DNA'ya sahip, konak çeşitlerine göre 9 farklı cins olarak sınıflandırılırlar. Yapılan filtrasyon çalışmalarıyla virüsün 30-50 nm çapında olduğu tahmin edilmektedir (Şekil 2.1.2.1) (22). Alphatorquevirüs 3,8 kilobaz (kb) uzunluğuna sahip genomuyla 29 torque teno virüs türü içerir (25, 26). Genom yaklaşık 2.6 kb lik kodlanan bir bölgeyi ve kalan 1.2 kb'lık kısım ise kodlanmayan bir bölgeyi (non-coding region) (UTR) içermektedir (23). Kodlanmayan bölgeyi oluşturan yaklaşık 110 nükleotidlik kısım Guanin (G) ve Sitozince (C) zengindir ve bu bölgenin dairesel DNA'yı tamamladığı gösterilmiştir (Şekil 2.1.2.2) (22).



Şekil 2.1.2.2: TTV Genom organizasyonu (23).

Kodlanan bölgede uzunlukları farklı olan iki ORF bölgesi bulunmaktadır. ORF1 770 aminoasitlik bir kodlama kapasitesine sahiptir ve bu bölgenin virüsün kapsid proteinini kodladığı düşünülmektedir. ORF2 bölgesi ise 120 aminoasitlik bir bölgeyi kodlama kapasitesine sahiptir ve bu bölgenin viral replikasyonda rol alan yapısal olmayan proteini kodladığı kabul edilmektedir (27). Hücre kültürlerinde yapılan transfeksiyon çalışmalarında virüsa ait 2.9, 1.2 ve 1 kilobazlık (kbp) 3 çeşit mesajcı RNA (mRNA) saptanmıştır. Bu bulgu, ORF1 ve 2'nin yanı sıra 260 aminoasitlik ORF3 ve 250 aminoasitlik ORF4 varlığını ve viral mRNA'ların oluşumunda kompleks bağlanma mekanizmalarının kullanıldığını göstermektedir (23).

2.1.3. Genetik Çeşitlilik

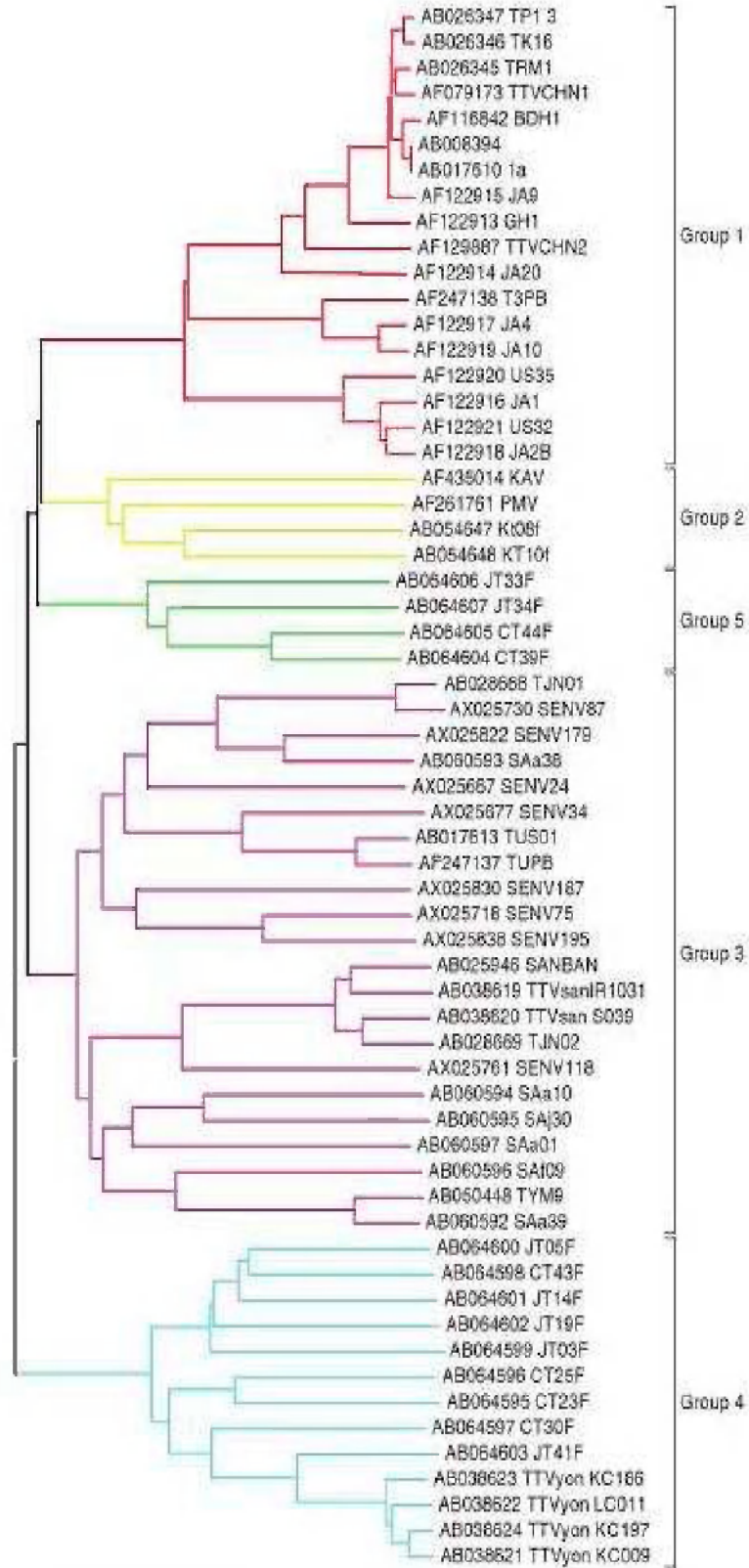
Tanımlanan diğer tek iplikli DNA virüsleri içinde Anellovirüsler oldukça fazla genetik çeşitlilik göstermektedir (Şekil 2.1.3.1). Virüsün iki farklı genomik DNA dizisi arasında %50'den fazla farklılık saptanabilmektedir. Virüsün coğrafi dağılımı ile ilişkili görünmeyen 25'in üzerinde viral genotip tanımlanmıştır. Ayrıca genotipler arasında, birbirlerine filogenetik olarak uzak izolatlar da dahil olmak üzere, rekombinasyon olaylarının sıklıkla meydana geldiği bilinmektedir. Viral genomdaki rekombinasyonlar daha çok kodlanmayan bölgede izlenmektedir.

Genotipler arasındaki homoloji %60-72; alt tipler arasındaki %85-89; aynı alt tipteki izolatlar arasındaki homoloji ise %93-100 olarak bildirilmiştir (21, 28, 29). Bir hastanın serumunda 3-5 farklı TTV genotipinin olabileceği gösterilmiştir (22, 28, 30). Genetik değişkenliğin bu kadar yüksek olması homolog rekombinasyonla ilişkilendirilmektedir (31).

TTV benzeri mini virüs (TLMV) olarak 1999 yılında Japonya'da bir araştırma sırasında gösterilen virüs, TTV'ye benzerliği nedeniyle TLMV adını almıştır. Ancak yaklaşık 100 nükleotidlik korunmuş bölge ve GC'den zengin bölüm dışında TTV ile belirgin bir homoloji göstermediği görülmüştür. Şöyle ki TLMV, TTV ile benzer yoğunluğa sahip olmasına karşın viral partikül açısından TLMV daha küçük olduğu bulunmuştur (23, 27).

2.1.4. TT Virüs-Konak İlişkisi

TTV enfeksiyonu konakçıdan zamanla temizlenmektedir. Hangi mekanizmayla temizlendiği bilinmemektedir. Konakçı veya virüsle ilgili özellikler veya ikisinin kombinasyonu etkili olabilir. Çalışmalarda TTV DNA negatif hastalarda vireminin tekrar ortaya çıkması gözlenmemiştir. Deneysel olarak infekte edilen şempanzelerin virüs taşıyıcılığı aylar sonra ortadan kalkmıştır. Okamoto ve ark. diğer tek zincirli DNA virüslerinde olduğu gibi TTV DNA'sının epizom gibi davranabileceğini ve konakçının DNA'sına entegre olabileceğini düşünmüşler ancak yapılan çalışmalarda hepatoselüler ve hematopoetik malignansili hastalarda TTV'nin entegre olmadığını görmüşlerdir (32, 33).



Şekil 2.1.3.1: TTV'nin filogenetik ağacı (27).

2.1.5. Patogenez ve Patoloji

TTV'nin vücuda girdikten sonra primer çoğalmasını gerçekleştirdiği doku ve organlar, ayrıca virüsün hedef dokuları henüz kesin olarak tanımlanmamıştır. Viral infeksiyon patogenezinin incelenebileceği uygun bir deney hayvanı ya da hücre kültürü modeli de bulunmamaktadır. TT virüse ait DNA, serum ve plazma örnekleri, periferik kan mononükleer hücreleri, karaciğer, dalak, böbrek, akciğer dokularında, merkezi sinir sisteminde, gastrik ve intestinal mukozada gösterilmiştir. Ancak bu organların hepsinde replikasyon olup olmadığı açık değildir. Ayrıca tükürük, gaita, saç, deri kazıntıları, nazofaringeal sekresyonlar, gözyaşı, semen, anne sütü ve kord kanında da virüse ait nükleik asitler saptanmıştır (23).

TTV DNA, farklı non-A-G hepatit hasta populasyonlarında yüksek oranlarda bulunmaktadır. Transfüzyon öncesi TTV olumsuz olup, akut posttransfüzyon hepatit gelişen olgularda serumda TTV DNA'nın saptanması nedeniyle etken olabileceği öne sürülse de ispatlanamamıştır. TTV'nin akut ve persistan infeksiyonlarla ilişkisini gösteren çalışmalar olmakla birlikte klinik önemi açıklanamamıştır (34). Son çalışmalarda TTV olumlu kişilerin çoğunluğunda anlamlı bir karaciğer hasarını gösteren biyokimyasal veya histolojik bulgu yoktur. TTV DNA olumlu olgular ile olumsuz olgular arasında karaciğerdeki histolojik aktivite veya ALT düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır (21, 35-42). Prospektif olarak izlenen hastalarda akut hepatit gelişenlerle gelişmeyenlerdeki yeni TTV infeksiyonlarının oranı da benzer bulunmuştur (43, 44). Bu veriler TTV infeksiyonunun yalnız başına belirgin bir karaciğer hasarına neden olmadığı, başka bir hepatit etkeninin yanında olabileceği görüşünü desteklemektedir. HBV veya HCV infeksiyonlarında TTV olumlular ile olumsuzlar arasında hastalığın ağırlığı yönünden bir fark olmadığı için karaciğer hasarını arttırmada da bir etkisi olmadığına inanılmaktadır. Infekte kişilerin karaciğer dokularında TTV DNA'sı (serum örneklerine göre 10-100 kat daha fazla) ve replikasyon göstergesi olabilecek çift sarmallı DNA saptanması nedeniyle virüsün hepatotrop özelliği kabul edilmektedir (45, 46). Ancak hepatositlerde morfolojik değişikliklerin olmaması TTV'nin karaciğer patogenezinde önemli bir rolü olmadığını göstermektedir. Ayrıca hepatitte veya

karaciğer hasarını alevlendirmedeki rolü kanıtlanamamıştır (45). İki şempanzeye TTV olumlu serum inokülasyonundan sonra, akut TTV enfeksiyonu saptanmış; inokülattaki TTV DNA nükleik asit dizileri ile şempanzelerdeki diziler aynı bulunmuştur. Ancak her iki şempanzede de histolojik veya biyokimyasal olarak hepatit kanıtına rastlanmamıştır (22).

Çeşitli ülkelerden sağlıklı kan donörlerinde yüksek oranlarda (%1–93) TTV DNA olumluğu bildirilmektedir (28, 34, 36, 40, 47). Bu veriler asemptomatik TTV taşıyıcılığının olabileceğini göstermektedir.

Genotiplerin karaciğer hastalığı ile ilişkisi de araştırılmaktadır, ancak henüz anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Itoh ve ark. N22 primerleri ile yapılan Polimeraz Zincir Reaksiyonun'da (PZR) saptanan TTV olumlu kişilerde, UTR primerleri ile saptananlara göre ALT düzeylerinin daha yüksek olduğunu bildirerek bu genotiplerin (1–6) karaciğer hasarı ile ilişkili olabileceğini ileri sürmüştür (48).

2.1.6. Klinik

Karaciğer hastalıkları ile ilişkisi: TTV'nin kriptogenik kronik karaciğer hastalığı, transfüzyonla ilişkili hepatit, karaciğer sirozu, fulminan hepatit, hepatoselüler karsinom (HCC) ve alkolle ilişkili karaciğer hastalıkları gibi karaciğer hastalıklarıyla ilişkili olabileceği belirtilmektedir. Yapılan çalışmalarda değişik hepatik bozukluklarla TTV sıklığı ve/veya TTV'nin viral yükü arasında ilişki olabileceği vurgulanmıştır. (10, 39, 42, 49-51). Bunun yanı sıra hastalardaki ısrarcı TTV enfeksiyonlarının karaciğer bozukluklarına katkıda bulunduğu gösterilmiştir (17). Literatürde hepatitli hastaların TTV viremi seviyesinin yüksek olabileceği vurgulanmış ve bunun sebebi olarak virüsün hepatitli hasta grubundaki prevelansının yüksek olması sorumlu tutulmuştur (52). TTV replikasyonun karaciğer hasarının sebebi ya da sonucu olduğu tam olarak açıklanamamaktadır (53).

TTV'nin diğer hepatit virüs (esas olarak HBV ve HCV) ko-infeksiyonu ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. HCV ile ilişkili kronik karaciğer hastalığı ile HCC varlığının yüksek TTV yükü ile ilişkisi olmasına rağmen TTV'nin hastalığın bir kofaktörü mü yoksa hastalığın sebebi mi olup olmadığı açıklanamamaktadır (54). Yapılan farklı çalışmalarda TTV'nin ko-infeksiyonunun HBV veya HCV'den dolayı

ciddi hepatit veya diğer hepatik hasara herhangi bir katkısının olmadığı vurgulanmıştır (34, 55-60).

Sonuçta, TTV'nin karaciğer hücrelerine herhangi bir zarar verip vermediği tam olarak gösterilememiştir (18). Yapılan birçok çalışmada karaciğer hastaları arasında TTV sıklığı, yükü, genotipik dağılımı veya ko-infeksiyonu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (57, 58, 61-73).

Solunum yolu bozuklukları ile ilişkisi: TTV infeksiyonunun aktif ya da fırsatçı olarak çocuklarda akut solunum yolu hastalıklarında rol aldığı gösterilmiştir (74). Buna ek olarak çocuklarda yüksek TTV yükünün astım patogenezinde katkıda bulunduğu gösterilmiştir (75). İlginç olarak TTV replikasyonunun akciğer dokularında da meydana geldiği ve yüksek TTV yükünün ciddi bronşektazi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (76, 77).

Diğer patojenler ile ko-infeksiyonu: TTV'nin İnsan Papilloma Virüs (HPV) ile ko-infeksiyonu gösterilmiştir (78). Yüksek TTV yükünün gastritli hastaların gastrik dokularında da bulunduğu ve *Helicobacter pylorinin* de TTV infeksiyonunda rol aldığı öne sürülmüştür (79).

İmmün suprese hastalıklar hastalarla ilişkisi: TTV'nin bazı genotipleri HIV ile infekte hastalarda sağlıklı bireylerden daha yaygın bulunmuştur (80).

Kanser ile ilişkisi: TTV DNA'nın farklı lenfoma çeşitlerinde (Hodgkin hastalığı) bulunduğu ve non-neoplastik hücrelere lokalize olduğu gösterilmiştir (81). Zur Hausen ve ark. çalışmalarında TTV infeksiyonunun çocukluk çağı lösemi ve lenfomasının gelişmesini etkilediğini göstermişlerdir (82). HPV ve TTV genotip 1'in ko-infeksiyonunun gırtlak kanseri ile ilişkili olduğu ancak TTV'nin kanserin ilerlemesine herhangi bir etkisinin olup olmadığı bilinmemektedir (83). TTV varlığının kolorektal kanser oluşumunda rol oynadığı, ancak aynı TTV izolatının kanserli olmayan dokularda da bulunduğu belirtilmiştir (84). TTV DNA klasik Kaposi sarkomu olan hastaların serumunda da bulunmuştur. İmmün suprese durumlarda TTV'nin, HHV8'in patogenezinin etkilediği öne sürülmüştür (85).

Otoimmün hastalıklar ile ilişkisi: TTV'nin Sistemik lupus eritematozus (SLE), Multipl skleroz (MS), Romatoid artrit (RA), İdiopatik inflamatuvar miyopati (IIM) gibi otoimmün hastalıklarda da rol aldığı belirtilmiştir (86-89). Sospedra ve ark. çalışmalarında MS hastalarından elde edilen T hücrelerinin, arjinince zengin

TTV ve TTMV'nin ORF1 N terminaline benzeyen peptidlere karşı reaksiyon verdiğini göstermişlerdir. Bu tip otoimmün hastalıkların gelişiminde, TTV enfeksiyonlarının tekrarının T hücre uyarımına yol açması ve bazı genetik ve/veya mikrobiyal predizpoze faktörlerin rolü olabileceğini ileri sürmüşlerdir (87). TTV'nin otoantikor üretiminde bir rolü olup olmadığı veya immünolojik fonksiyon bozukluğuna neden olup olmadığı açıklanamamıştır. Otoimmün hastalığı olanların TTV enfeksiyonlarına daha yatkın olduklarının mümkün olabileceği belirtilmiştir (86). Buna ilaveten araştırmacılar TTV replikasyonu ve artrit arasında bir ilişkinin olabileceğini ileri sürmektedirler. Fakat bahsedilen diğer rahatsızlıklar da göz önüne alındığında bunların nedenleri halen bilinmemektedir (90).

Hematolojik hastalıklarla ilişkisi: TTV'nin aplastik anemi ile ilişkisi olduğu farklı çalışmalarda gösterilmekle birlikte post-hepatit aplastik anemi ile ilişkisi olmadığını belirten çalışmalar da bulunmaktadır (91-93).

2.1.7. Laboratuvar Tanı

TTV izolasyonunda kullanılacak doku kültür sistemlerinin olmaması, viremi durumunda plazmada viral antijenleri saptayan bir metodun bulunmaması ve virüse karşı immün yanıtın tam olarak bilinmemesi gibi nedenlerle TTV enfeksiyonunun laboratuvar tanısında bazı güçlükler vardır (94). TTV enfeksiyonunun laboratuvar tanısında halen PZR yöntemiyle TTV-DNA'nın saptanması tercih edilmektedir (28). TTV DNA, serum dışında karaciğer, kemik iliği, akciğer, dalak, pankreas, böbrek, lenf nodu, iskelet kası ve tiroid bezinde bulunurken, tükürük, gözyaşı, dışkı, safra, balgam, anne sütü ve semende de saptanabilmektedir (95).

Serum örneklerinde TTV DNA, nükleik asit amplifikasyon yöntemleri ile aranmaktadır. İlk çalışmaların çoğunluğu Okamoto ve ark.'ın TTV genomunun protein kodlayan bölgelerinden biri olan ORF1'i hedefleyen primerlerin (NG059, NG061, NG063) kullanıldığı polimeraz zincir reaksiyonu ("semi-nested PZR") ile yapılmıştır (21). Ancak Okamoto'nun daha sonraki çalışmasında 5' veya 3' NCR (non-coding region = kodlanmayan bölge) ucuna yakın bölgelerini hedefleyen primerlerin kullanıldığı sistemlerin daha duyarlı olduğu bildirilmektedir (28). Bu çalışmalarda sağlıklı populasyonda TTV DNA olumluluğu ilk primerlerle %47 saptanırken, yeni primerlerle %93'e yükselmektedir. Başka bir çalışmada da kan

donörlerindeki oran %12,8'den %39,6'ya yükselmektedir (96). ORF1'i hedefleyen N22 primerlerinin TTV genotip 1-6'yı saptayabildiği bildirilmektedir (28). TTV'nin yüksek düzeydeki değişkenliği ve konaktaki viral popülasyonun karmaşıklığı nedeniyle seçilen primerlere bağlı olarak TTV DNA olumluluk oranları da değişebilmektedir.

2.1.8. Epidemiyoloji

1997'de etiyojisi bilinmeyen hepatitli bir hastanın kanında TTV DNA bulunmasından sonra yapılan epidemiyolojik çalışmalar, sadece parenteral risk sergileyen virüs popülasyonlarında değil; damar içi ilaç kullanıcıları, hemofili hastaları, HIV ile infekte hastalar ve kanıtlanmış patolojisi bulunmayan kan donörlerinde de TTV DNA varlığını göstermiştir (27). TTV kırsal ve kentsel yerleşim bölgeleri arasında fark olmaksızın tüm dünyada saptanmaktadır. Duyarlı saptama sistemleri bazı bölgelerdeki prevalansın %90-95 gibi çok yüksek oranlarda olduğunu göstermektedir. Viral genotiplerin dağılımı açısından da belirli bir coğrafi dağılım farklılığı izlenmemektedir. En fazla suçlanan bulaş yolunun kan ve kan ürünlerinin transfüzyonu olduğu düşünülmüş olsa da, virüsün toplumda yüksek oranlarda izlenmesi ve tükürük, gözyaşı, gaita, nazofaringeal ve genital sekresyonlarda varlığının gösterilmesi ayrıca transplasental, fekal-oral, damlacık infeksiyonu ve seksüel yolla da bulaştığına dair bilgiler vardır (97-102).

Sağlıklı kan donörlerindeki TTV DNA seroprevalansı ülkelere göre farklılık arz etmektedir. Yapılan çalışmalarda Fransa'da %2, Almanya'da %7, İspanya'da %14, ABD'de %13 gibi oranlar bildirilmiştir (37, 40, 46, 47). Kullanılan yöntem ve primerlerin de sonuçları etkilediğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (28, 96). Gambiya'da kırsal kesimde sağlıklı popülasyonda %83 TTV DNA seroprevalansı bildirilmiştir (103). Türkiye'de sağlıklı kan donörlerinde yapılan çalışmalarda TTV DNA pozitifliği %0,5-31 oranında bildirilmiştir (104-107).

Ülkemizde, çeşitli hastalıklarla ve bulaşma yolları ile TTV infeksiyonunun ilişkisini araştırmak amacıyla farklı hasta gruplarında TTV DNA'sı araştırılmıştır. İzmir'de hemodiyaliz hastalarında %75, fulminan hepatit hastalarında %80; Antalya'da talasemililerde %61, İstanbul'da kronik B hepatitli olgularda %13,6,

kronik C hepatitlilerde %7,2, kriptojenik kronik aktif hepatitlilerde %38,4, kriptojenik karaciğer sirozunda %20,5, MS hastalarında %19,5, talasemililerde %79,6 oranında TTV DNA olumluluğu saptanmıştır. İzmir ve İstanbul'da HIV olumlu olgularda %50, Ankara'da hemodiyaliz olgularında %8,4 ve %5, Bursa'da hemodiyaliz olgularında %40,7, glomerulopati olgularda %14,8, renal transplantasyon olgularında %51,7, fulminan hepatitli çocuklarda %44 oranında bulunurken, Ankara'da HBV olumlularda %23, HCV olumlularda %40 oranları bulunmuştur (64, 99,106, 108-110).

Farklı ülkelerden bildirilen verilerdeki ortak sonuç da etiyolojisi belli olmayan karaciğer hastalığı olan hastalarla, etiyolojisi tanımlanmış karaciğer hastalığı olanlardaki TTV DNA seroprevalansı arasında anlamlı fark olmadığıdır. Japonya'da akut hepatitlilerde TTV infeksiyonunun araştırıldığı bir çalışmadan elde edilen veriler ışığında non A-E hepatitlerindeki oranla, akut A, B, C hepatitlerindeki ve normal karaciğer fonksiyon testlerine sahip kontrol grubundaki oranın benzer olduğunu bildirmiştir (42). Fransa'da yapılan bir çalışmada kriptojenik kronik karaciğer hastalığı olanlarda TTV DNA pozitifliği %11,8, kronik B hepatit olanlarda %23,8 olarak bildirilmiştir (34).

2.1.9. İmmün Yanıt

Akut ve kronik infeksiyonlarda virüsün kendiliğinden temizlenebileceği bilindiğine göre, TTV ile karşılaşma oranını verebilmek için antikor testlerine gerek vardır. Ancak henüz güvenilir TTV antikor testleri geliştirilmemiştir. Tsuda ve ark. immünopresipitasyon yöntemi ile tanımladıkları anti-TTV antikorlarının TTV olumlu ve olumsuz olgularda bulunabildiğini bildirmiştir (111). Bazı olgularda antikor gelişmesiyle TTV DNA'nın kaybolduğu gösterilmiştir. Ancak bu antikorların anlamı ve özellikleri hakkında henüz yeterli bilgi bulunmamaktadır. Ayrıca TTV'deki genetik ve aminoasit düzeyindeki yüksek değişkenlik immün yanıtta kaçma mekanizmalarını oluşturabilir. Böylece tekrarlayan infeksiyonlardan korumayabilir. TTV infeksiyonun patogenezinde immün komplekslerin, hücresel immün yanıtın rolü de bilinmemektedir (112).

2.2. Hepatit B Virüsü

Hepatit B virüs (HBV), Hepadnaviridae ailesinden bir DNA virüsüdür. Ait oldukları Hepadnaviridae ailesinin diğer üyeleri gibi konakları sınırlıdır ve yerleştikleri konakta akut enfeksiyon, persistan enfeksiyon, fulminan hepatit, siroz ve HCC gibi ölümcül hastalıklara neden olurlar (113).

HBV, Hepadnaviridae ailesinin orthohepadnavirüs cinsinde yer alan hepatotropik, zarflı ve kısmen çift sarmallı DNA virüsüdür. 3200 nükleotidden oluşan genomik yapısı ile bilinen tüm hayvan DNA virüsleri içinde en küçük olanıdır. Hepadnaviridae ailesinin üyeleri içinde insanlarda enfeksiyon oluşturan tek türdür. İnfekte hücrelerde birden fazla sayıda partikül tipi oluşumuna yol açması nedeniyle diğer hayvan virüslerinden farklı bir yere sahip olan HBV'nin, kısmen saflaştırılmış preparasyonları elektron mikroskopunda incelendiğinde büyüklük, yapı ve miktar gibi değişik özellikleri bakımından birbirine benzemeyen üç tip partiküle rastlanır. Bunlar; 42-47 nm çapında infektif özellikte, küresel hepatit B viriyonu (Dane partikülü), 20 nm çapında içinde nükleik asitler bulunmayan, non infektif, küresel partiküller ve 20 nm çapında fakat değişik uzunluklarda nükleik asit ihtiva etmeyen, non infektif tübüler partiküllerdir (114-119).

2.2.1. Bulaş

HBV, halk arasında sarılık olarak bilinen Hepatite neden olan bir virüstür. parenteral yol ve cinsel yolla bulaşır. En sık kan yoluyla bulaşır. Kan yoluyla bulaşıcılığı, AIDS etkeni olan HIV'den 100 kat daha fazladır. Virüs vücuda çeşitli yollardan girebilir ve karaciğerde hücreler içine yerleşir (120).

HBV enfeksiyonu dünyada en sık görülen bulaşıcı hastalıklardan biridir. Virüsün tek doğal konakçısı insandır. HBV enfeksiyonunun geçiş yolları; vertikal geçiş, seksüel aktivite, intravenöz ilaç kullanımı ve diğer enfekte vücut sıvıları ile fiziksel temas ile olmaktadır. HBV, aerosol, dışkı, kontamine yiyecek su veya böceklerle bulaşmaz. Virüs vücut dışında çevre koşullarında uzun süre canlılığını koruyabilir (121).

2.2.2. Klinik

Hepatit B, değişik klinik özelliklere sahip karaciğerin viral bir infeksiyonudur. Hastalık tablosu akut ya da kronik infeksiyon şeklinde oluşabilir. En az 6 ay HBsAg pozitif olan hastaların; kronik HBV infeksiyonu olduğu kabul edilir (122). Semptomlar hafif ve geçici formdan, şiddetli ve uzamış forma kadar değişkenlik gösterebilir. HBV infeksiyon süreleri farklı 4 evreye ayrılır (123). Birinci evre; herhangi bir immün cevabın oluşmadığı akut viral replikasyon dönemidir. İkinci evre; virüse karşı oluşan immün cevabın inflamasyon ve hepatik doku hasarına neden olduğu dönemdir ve bu dönemde klinik bulgular ortaya çıkar. Üçüncü evre sırasında virüsle infekte hücreler temizlenir ve HBeAg saptanamaz hale gelir. Dördüncü evrede HBV'ye karşı tam bağışıklık gelişir ve HBsAg temizlenir. Evre 1 ve 2'nin ileri dönemine geçemeyen infekte hastalar kronik HBV taşıyıcısı olurlar ve siroz ve/veya HCC gelişimi açısından yüksek risk taşırlar (124).

Akut HBV infeksiyonunun inkübasyon zamanı 6 hafta ile 6 ay arasında değişmektedir. Bu dönem hastalığın 1. evresine karşılık gelmektedir. İnkübasyon zamanı; hastanın yüksek viral inokülumla karşılaştığında veya perkütan yolla infekte olduğunda kısalır. Temastan sonra HBsAg için spesifik yüksek titreli antikor uygulaması (HBIG); inkübasyon zamanını uzatır ve infeksiyonu engelleyebilir. Akut HBV infeksiyonunun klinik bulguları yüksek oranda yaşa bağlıdır. İnfekte yeni doğanların hemen hemen tamamı asemptomatiktir. 1-5 yaş arası çocukların yalnızca %5-10'unda klinik bulgu vardır. Daha ileri yaştaki çocuk ve erişkinlerin yaklaşık %10-30'u semptomatik hale gelir (122, 125-128). Akut HBV infeksiyonunun klinik semptomları gribe benzemektedir. Bazı hastalar sarılık, koyu renkli idrar, camcı macunu gibi gaita ve hepatomegali gibi bulgulardan yakınmaktadır (129).

2.2.3. Tanı

Akut Hepatit B'nin klinik tanısı, karaciğer enzimlerinin artması ve viral antijen, antikor ve nükleik asit saptanmasıyla konur. Akut viral hepatitin tanısında en önemli bulgulardan birisi serum transaminaz aktivitesindeki hızlı yükseliştir. Transaminazların yükselmesi semptomlar başlamadan önce başlar ve genellikle semptomların birinci haftasında pik yapar. Serum pik düzeyi genellikle 1000

U/ml'nin üzerindedir ve ALT, AST'dan daha fazla yüksektir. Pik seviyeleri karaciğer hastalığı ile doğru orantılıdır, ancak prognostik faktör değildir (130).

2.2.4. Patogenez

Hem akut hem de kronik HBV enfeksiyonu inflamatuvar ve rejeneratif cevapla birlikte hepatoselüler nekrozla seyreder. Bazı veriler HBV'nin hepatositlere direk olarak sitopatik olmayabileceğini ve enfekte hücrelere konağın sellüler immün cevabının hastalığın şiddeti ile orantılı olduğunu göstermektedir (131). Akut HBV enfeksiyonlu birçok hastada iyileşme; pre-S ve S antijenlerine karşı antikor oluşumuna yol açan B lenfosit cevabına bağlıdır. Böyle hastalarda HBV zarf, nükleokapsid ve polimeraz proteinlerindeki birçok epitopa karşı etkin güçlü sitotoksik T lenfosit (CTL) cevabı vardır (132). HBV'ye bağlı karaciğer hasarı, HBV ile enfekte hepatositlere yönelmiş bu CTL yanıtına bağlıdır (128).

2.3. Hepatit C Virüsü:

Dünyada 1988 yılında Choo ve ark.larınca genetik klonlama yöntemiyle bulunan ilk virüs Hepatit C virüsüdür (133). HCV, Flaviviridae ailesinden Hepacivirüs cinsine ait 30-60 nm çapında zarflı, tek iplikli pozitif polariteli, 1.08g/ml yoğunluğunda bir RNA virüsüdür (134, 135). Genomik yapısı yaklaşık 9600 nükleotid içerir (136). Kodlama yapmayan 5' bölgesi genomik yapının en iyi korunan bölgesidir. Bu nedenle tanısal amaçlı kullanılan HCV RNA amplifiye edici primerler bu bölgeden seçilmektedir. Bu bölge kapsid ve zarf proteinleri gibi yapısal birimleri kodlar. 3' bölgesi ise yapısal olmayan yani enzimatik proteinlerin kodlandığı kısımdır. Bunlar içinde NS2(p23), NS3(p72), NS4 (p10 ve p27) gibi metalloproteaz, serin proteaz aktivitelerine sahip proteinler sayılabilir. Virüs kendi polimeraz enziminin neden olduğu transkripsiyon hataları nedeniyle yüksek düzeyde bir genetik değişkenliğe sahiptir ve mutasyon sayısı yaklaşık olarak yılda 10^3 baz değişim düzeyindedir. Dolayısıyla henüz etkin bir tedavi ve aşının üretilebilmesi mümkün olmamıştır (137).

HCV esasen insanları enfekte eder ve insan enfeksiyonlarının büyük çoğunluğu diğer insanlardan genellikle kan teması yoluyla bulaşır. HCV, HBV'ye

benzer şekilde parenteral, perinatal, seksüel ve horizontal yollarla geçtiği bildirilmesine rağmen temel olarak parenteral yolla bulaşmaktadır (138).

2.3.1. Epidemiyoloji ve Bulaş

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün verilerine göre her yıl 3-4 milyon kişi hastalıkla (Hepatit C) ile tanışmaktadır. 130-170 milyon arasında bulunan kronik hastalar ise siroz, karaciğer kanseri gibi hastalıklara yakalanma riski ile yaşamaktadır. Kronik hastaların 350 bini, her yıl hepatit C'ye bağlı karaciğer rahatsızlıkları nedeniyle ölmektedir. Kronik enfeksiyonda DSÖ verilerine göre ilk sırada %22 ile Mısır, % 4,8 ile Pakistan, %3,2 ile Çin gelmektedir (139).

Ülkemizde kronik hepatitlerin etiyolojisinde HCV'nin rolü son yıllarda giderek artmaktadır. Ökten'in yaptığı çalışmaya göre HBV enfeksiyonunun etiyolojide hala önemini korumasına karşılık son 10 yılda HCV'nin katkısının %23'ten %38,1'e çıktığı gözlenmiştir. Benzer şekilde sirozların etiyolojisinde HBV %56,6'dan %45,9'a inerken, HCV'nin katkısı %25,2'den %45,9'a yükselmiştir (140, 141).

Dünyada HCV enfeksiyonu prevalansının yaklaşık %2,2-3 arasında olduğu tahmin edilmektedir. Bu da dünyada yaklaşık 130 ila 170 milyon kişinin HCV pozitif olduğunu göstermektedir (142). Tahmini prevalansın en düşük olduğu Kuzey Avrupa'da HCV prevalansı %1'den düşüktür, prevalansın yüksek olduğu ülkeler ise Asya ve Afrika'da yer alır. En düşük prevalans İngiltere ve İskandinav ülkelerinden (%1'in altında), en yüksek prevalans ise Mısır'dan (%15-20) bildirilmiştir (143, 144). Düşük prevalansı olan ancak nüfusu büyük gelişmiş ülkelerde örneğin Almanya'da prevalans %0,6, Kanada'da %0,8, Hindistan'da %0,9, Fransa'da %1,1, Avustralya'da %1,1'dir. Düşük, fakat biraz daha yüksek prevalans oranları Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nden (%1,8), Japonya'dan (%1,5-2,3) ve İtalya'dan (%2,2) bildirilmiştir. Ülkemiz dünya haritasında prevalansı %1-1,9 arasında olan ülkeler içinde yer almaktadır (145).

Ülkemizde 2000-2006 yılları arasında farklı merkezlerdeki donör taramalarından elde edilen anti-HCV pozitiflik oranı ortalama %0,54'tür. Bu verilere bakıldığında donörlerde anti-HCV pozitiflik oranı %1'in üzerinde olan iller Afyon, Düzce, Erzurum, Manisa ve Samsun'dur. 90'lı yılların verisiyle 2000'li yıllarda elde

edilen veriler karşılaştırıldığında donörlerdeki prevalans oranında anlamlı bir değişiklik olmadığı görülmektedir. Ülkemizde genel popülasyonda yapılan çalışmalarda ise anti-HCV pozitiflik oranı daha yüksek çıkmaktadır. Erişkinlerde 2000 yılından sonra yapılmış çalışmalara bakıldığında toplam 16.160 kişideki anti-HCV pozitifliği %1,15'tir. Erişkinlerdeki bu prevalans oranlarının yüksek olduğu illere baktığımızda Afyon'da %1,03-1,75 arasında, Erzurum'da %1,2, İzmir'de %1,3 ve Tokat'ta %2,1 olduğu görülmektedir (146, 147).

HCV çoğunlukla kontamine kanın perkutan yolla teması sonucu bulaşmaktadır. Damar içi uyuşturucu kullanımı en sık bulaş yolu olup tüm enfeksiyonların %55 ile %65'ini oluşturur (148). İnfekte kan ürünlerinin ya da organların alınması 1992'den önce HCV enfeksiyonlarının en önemli nedenleri arasındayken, HCV taramalarının başlamasıyla bu yol önemini yitirmiştir. Yeni nesil antikor tarama testleri ile kan nakli yoluyla HCV bulaş riski 103.000 de 1'e, kan örneklerinin havuzlanarak nükleik asit tabanlı testlerle taranması ile de 2 milyonda 1'e düşmüştür (149). HIV ve HBV'nin aksine HCV cinsel ilişki yoluyla kolay bulaşmamaktadır (150). Burun içi kokain kullanımı, kontamine tıbbi ekipmana maruz kalma, iğne batmaları ve vertikal bulaş HCV enfeksiyonunun yayılımına katkıda bulunmaktadır. HCV tükürükte saptanabilse de gündelik temaslarla bulaşın çok ender olduğu düşünülmektedir (151).

2.3.2. Klinik

HCV enfeksiyonu Birleşik Devletlerdeki en sık kan yoluyla bulaşan enfeksiyon olsa da, hastaların çoğunda hastalığın doğal seyri hafiftir (136). HCV'ye maruz kalan hastaların %15 ile %40'ı akut evrede enfeksiyonu temizler (152, 153). HCV ile infekte hastaların yaklaşık %20'sinde, ortalama 20 yıl süren bir sürecin sonunda siroz gelişir. Eş zamanlı yoğun alkol kullanımında, HIV enfeksiyonu varlığında, erkeklerde ve 40 yaşından sonra infekte olanlarda siroza ilerleme hızlanır (154, 155). Sonraki süreçte sirozlu hastalarda son evre karaciğer hastalığı ve HCC ortaya çıkma riski vardır (156).

2.3.3. Tamı

Bir bireyde ELISA (Enzim Linked Immuno Sorbent Assay) pozitifliği, ALT düzeyi yüksekliği ve parenteral bir risk faktörü, aksi kanıtlanmadıkça aktif HCV enfeksiyonu göstergesidir. Böyle kişilere bir sonraki aşamada (yönlendirme ve tedavi gibi) serum HCV RNA testi yapılması önerilmektedir. Özellikle düşük derecede HCV enfeksiyonu riski olan kan donörlerinde, yanlış pozitifliğe sık rastlanıldığı için, antikor özgüllüğünün doğrulanması gerekmekte ve ek testlere başvurulmaktadır (157).

2.4. Alanin Aminotransferaz ve Aspartat Aminotransferaz

Karaciğer, sentez ve detoksifikasyon görevinden dolayı vücuttaki en önemli organlardan biridir. Birçok hastalıkta karaciğer dokusu direkt veya dolaylı olarak etkilenir. Hepatobiliyer sistemin işlev ve hasar durumunu değerlendiren testler; alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST), laktik dehidrogenaz (LDH), gamaglutamil transferaz (GGT), alkalin fosfataz (ALP), albumin, bilirubin, protombin zamanı (PT) ve parsiyel tromboplastin zamanı (PTT)'dir. Bu testler içinde en önemli ve en sık kullanılan testler ALT ve AST ölçümüdür ve bu iki enzim en fazla hepatoselüler hasarda artar (158-160).

Serumda her iki aminotransferaz da normalde düşük konsantrasyonlarda bulunur (30-40 IU/l). Bunun tam kaynağı bilinmese de, normal hücre "turnover"ına ve rejenerasyona bağlı olduğu düşünülmektedir. Hepatosit yıkımının artması ile artan permeabilite sonucu bu enzimler hücre zarı dışına çıkar ve serum düzeyleri yükselir. ALT ve AST'nin organizmada bulunduğu dokular ve hücre içinde bulunduğu kompartmanlar arasında bazı farklar vardır.

Transaminazlar vücutta yaygın olarak bulunmaktadır. ALT hücrede sadece sitoplâzma da bulunurken, AST hem sitoplâzma da hem de mitokondride bulunur. AST (eski adıyla SGOT=Serum glutamat oksaloasetat transaminaz), primer olarak kalpte, karaciğerde, iskelet kasında ve böbrekte bulunurken; ALT (eski adıyla SGPT= Serum glutamat piruvat transaminaz) primer/öncelikli olarak karaciğer ve böbrekte, daha az miktarda ise kalp ve iskelet kasında bulunur (Tablo 2.4.1). Bu nedenle ALT yüksekliği hepatosellüler yıkımı, AST'ye göre daha spesifik yansıtmaktadır. AST yüksekliklerinin artışın KC kökenli olup olmadığına

karar vermek için birlikte ALT düzeylerine bakılmalıdır. ALT düzeyindeki artış, artmış AST'nin KC kökenli olduğunu desteklemektedir (161).

Karaciğer hastalığı serumdaki transaminaz aktivitesini artıran en önemli nedenlerden biridir. Birçok farklı karaciğer hastalığında (Alkolik hepatit, hepatik siroz ve karaciğer neoplazisi hariç) ALT aktivitesi AST'den daha yüksektir.

Akut hepatik nekrozla ilişkili viral hepatitler ve diğer karaciğer hastalıklarında hastalığın belirti ve bulguları ortaya çıkmadan önce (sarılık gibi) serum ALT ve AST konsantrasyonları yükselir.

Karaciğer bütünlüğünün bozulduğu durumlarda ALT ve AST'nin her ikisinin de serum aktiviteleri artmasına rağmen ALT, AST'den daha fazla karaciğere spesifik bir enzimdir. Parenkimal karaciğer hastalığı dışındaki durumlarda ALT serum aktivitesinin artışı nadir görülür. Dahası ALT aktivitesinin yüksekliği AST'ninkinden daha uzun sürelidir.

Yeni International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) methodları kullanıldığı zaman, AST'nin üst değeri bayanlarda 31 U/L, erkeklerde 35 U/L iken; ALT'nin üst değeri bayanlarda 34 U/L, erkeklerde 45 U/L dir (162).

Tablo 2.4.1: Seruma göre ünite olarak insan dokularında transaminaz aktiviteleri (162).

| | AST | ALT |
|--------------|------------|------------|
| Kalp | 7800 | 450 |
| Karaciğer | 7100 | 2850 |
| İskelet kası | 5000 | 300 |
| Böbrekler | 4500 | 1200 |
| Pankreas | 1400 | 130 |
| Dalak | 700 | 80 |
| Akciğerler | 500 | 45 |
| Eritrositler | 15 | 7 |
| Serum | 1 | 1 |

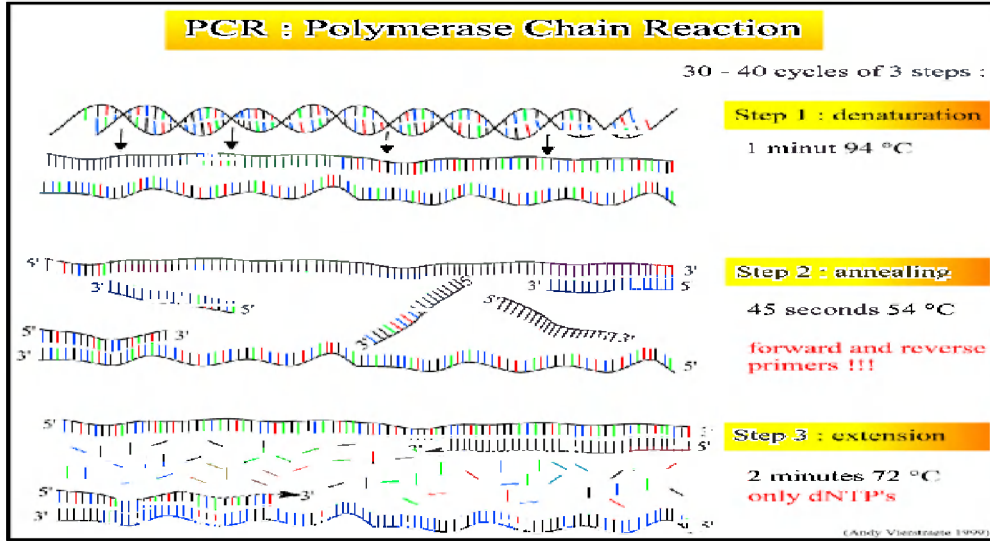
2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

1985 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde bulunan Cetus şirketine bağlı olarak çalışan Henry A. Erlich, Kary Mullis ve Randall K. Saiki tarafından geliştirilen yöntem, nükleik asitlerin, uygun invitro koşullar altında çoğaltılmasına dayanmaktadır. Hem bilimsel araştırmalar hem de klinik laboratuvar tanısındaki uygulama alanlarıyla büyük öneme sahip olan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)'nun geliştirilmesindeki çalışmaları nedeniyle Kary Mullis, 1993 yılı Nobel Kimya Ödülü'nü almaya hak kazanmıştır. PZR bir çeşit in vitro klonlamadır (163).

2.5.1. PZR İşleminin Uygulama Aşamaları ve Prensipleri

PZR reaksiyonu; DNA'nın iki zincirinin yüksek sıcaklıkla birbirinden ayrılmasını (denatürasyon), sonra sırasıyla sentetik oligonükleotidlerin hedef DNA'ya bağlanmasını (hibridizasyon), zincirin uzamasını (polimerizasyon, çift iplikçikli DNA'ların sentezi), ve tüm bu siklusların belirli sayıda tekrarlanmasını kapsamaktadır (Şekil 2.5.1.1). PZR tekniğinin otomasyonu, her bir siklus esnasındaki ısıtma ve soğutma işlemlerini yazılım programları doğrultusunda gerçekleştiren thermocycler adı verilen PZR cihazları yardımıyla sağlanmaktadır.

Günümüzde farklı firmalar tarafından sıcaklık, inkübasyon süresi ve siklus sayısının programlanabildiği thermocycler cihazları ticari olarak sunulmaktadır. Thermocycler cihazlarına değişik hacim ve sayıdaki eppendorf tüpleri yerleştirilebilmektedir. Bu cihazlarda sıcaklık 4 ile 100°C'ler arasında programlanabilmekte ve reaksiyon işlemlerinin sona ermesiyle 4 °C' ye ayarlanarak eppendorf tüpleri uzun süre bu sıcaklıkta tutulabilmektedir (164, 165).



Şekil 2.5.1.1: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (<http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>)

2.5.1.1. DNA'nın Denatürasyonu Aşaması

Bu aşamada çift zincirli hedef DNA'nın birbirinden ayrılması sağlanmaktadır. Çift sarmallı DNA, hidrojen bağlarının kopmasıyla tek sarmal haline getirilmektedir. Denatürasyon aşamasında, yüksek sıcaklık dereceleri G-C yönünden zengin olan hedef zincirler için daha uygun olsa da, sık kullanılan denatürasyon sıcaklıkları 95°C'de 30 sn veya 97°C'de 15 sn'dir. Thermocycler cihazlarında, bu sıcaklıkların uygulanmasıyla DNA'nın denatürasyonu gerçekleştirilmektedir. Bunun yanı sıra denatürasyon sıcaklığının çok yüksek veya süresinin uzun olması enzim aktivitesinin olumsuz etkilenmesine neden olmaktadır (166).

2.5.1.2. Primerlerin Bağlanması Aşaması

PZR işlemlerinin bu aşamasında, primer olarak adlandırılan ve çoğaltılması istenen DNA için spesifik olan oligonükleotidler, denatürasyon aşamasında elde edilen DNA tek sarmalı üzerinde kendisine komplementer olan diziyeye bağlanmaktadır. Ortamda bulunan iki tür primerin her birinin komplementeri olduğu tek iplikçikli hedef DNA üzerindeki spesifik bölgelere bağlanması için, programlanan thermocycler sıcaklığı 37-65 °C'ye indirmektedir. Primerlerden birinin kendine ait olan 5' ucu, hedef DNA' lardan birinin 3' ucuyla,

diğer primer de ikinci tek iplikçik DNA'nın anti paralel olan diğer ucunda bulunan 3' ucuna DNA polimerazın çalışma yönüne uygun olarak (5' → 3') bağlanırlar. Bu işlemlerin tamamlanması yaklaşık 0.5-1 dakika sürmektedir. Primerlerin bağlanması aşamasında gerekli olan sıcaklık ve sürenin uzunluğu; primerlerin nükleotid yapısına, uzunluğuna ve PZR solüsyonundaki konsantrasyonlarına bağlıdır. Bağlanma sıcaklığı, genellikle primerlerin erime sıcaklıklarının 5 °C altında olup 55-65 °C' lerde en iyi sonucu vermektedir. Optimal bağlanma sıcaklığı; G-C, A (Adenin)-T (Timin) bazlarının miktarı ve baz sayısı ile hesaplanır. G ve C bazları arasında üç hidrojen bağı bulunurken, A ve T bazları arasında iki hidrojen bağı bulunmaktadır. Her bir G-C bazları arasındaki bağlanma sıcaklığı 4 °C, A-T bazları arasındaki bağlanma sıcaklıkları da 2 °C olarak hesaplanır. Örneğin; 20 bazdan oluşmuş bir primer yapısında, 11 G-C, 9 A-T bulunduğu kabul edilirse optimal bağlanma sıcaklığı şu şekilde hesaplanmaktadır: $11 \times 4 + 9 \times 2 = 62$ °C. Hesaplanan 62 °C' den 5 °C güven payı çıkarılarak optimal bağlanma sıcaklığı elde edilir (165, 167).

2.5.1.3. Primerlerin Uzatılması Aşaması

Primerlerin uzatılması aşaması genellikle 72 °C' de gerçekleştirilir. Primerlerin bağlanması aşaması tamamlandıktan sonra, primerlerin hibritleştiği tek sarmalların karşılığı DNA polimeraz tarafından sentezlenir. PZR işlemlerinde, genellikle her bir siklus için iki dakikalık bir uzatılma süresi yeterli olmakla birlikte, bu süre amplifiye edilecek DNA bölgesinin uzun olması halinde arttırılabilmektedir. Daha uzun DNA fragmanlarının çoğaltılabilmesi için ortalama her kb için bir dakika eklenmesi önerilmektedir. Bu aşamada Taq polimeraz enzimi 5' → 3' yönünde aktivite göstererek, primerlerin 3' uçlarından başlamak üzere ortamdaki nükleotidleri kullanarak hedef DNA dizisinin kopyasını yapmaktadır. Reaksiyon sıcaklığı tekrar arttırılarak son uzama sıcaklığı 72 °C' ye yükseltilmektedir. Böylece PZR' nin üç aşamadan oluşan ve yaklaşık olarak 10-15 dk kadar devam eden birinci amplifikasyon aşaması, tekrar sıcaklığın 95 °C' ye yükseltilmesi ve aynı aşamaların 25-30 kez tekrarlanmasıyla sonlandırılır. Böylece tek bir hedef DNA segmenti, 2ⁿ formülüne göre yaklaşık 33.6 milyon çoğaltılmış olur. Bir PZR işleminde, 20 PZR siklusundan sonra aranan DNA' nın

eksponensiyal olarak 2^{20} kat artmış olması beklenir. Ancak bu sayıya her bir siklustaki ürünün %100 olması koşuluyla ulaşılabilir. Her bir siklusta değişik faktörler etkili olarak %100 ürün oluşumunu engellemekte ve bu durum daha sonraki PZR sikluslarında daha belirgin ortaya çıkmaktadır. Bu şekilde 25-30 siklus sonunda DNA miktarındaki artış ve azalan enzim miktarı arasındaki dengesizlik reaksiyonu sınırlamaktadır. Bu süreç içerisinde enzimin aktivasyonu da azalmaktadır (163, 168).

2.5.2. Gerçek Zamanlı PZR (Real-time PCR)

Nükleik asit çoğalmasıyla eş zamanlı olarak artış gösteren floresans sinyalin ölçülmesiyle, kısa sürede kantitatif sonuç verebilen bir PZR yöntemidir. Ticari olarak geliştirilmiş tipleri bulunmaktadır. Real time PCR sisteminin uygulanmasında yalnızca çift zincirli DNA'ya bağlandıklarında floresans veren boyalar (Syber (Sybr) green, FAM, Texas red, Marina blue vb.) kullanılarak, çoğalmaya bağlı DNA artışı, ortaya çıkan floresansın miktarıyla ölçülmektedir. Primerlerin bağlanması takiben gerçekleştirilen uzama aşamasında, hedef DNA'nın çift sarmal hale gelmesiyle DNA'ya bağlanan Syber green miktarı artmakta ve buna bağlı olarak yayılan floresans miktarında artış gözlenmektedir (169-171).

Bu uygulamada, floresans artışı her zaman spesifik amplifikasyonu göstermeyebilir. Çünkü çift sarmal DNA'ya entegre olan Syber green ortamda hedef moleküller olmadığında primerlerin kendi aralarında gerçekleşecek olan bağlanmalar (primer dimer) sonucunda da yapıya katılarak floresans oluşumuna sebep olabilmektedir. Bu olumsuz faktörü gidermek için amplifikasyon ürünlerinin melting curve (erime eğrisi) analizi yapılmaktadır. Her çift sarmal DNA, kendine özgü melting temperature (T_m , çift sarmal DNA'nın %50'sinin tek sarmal hale gelmesi için gerekli sıcaklık) değerine sahiptir. PZR çoğalmasının ardından sıcaklık yavaş yavaş yükseltilerek, belirli aralıklarla tüpteki floresans miktarı kaydedilir. Çift sarmal DNA zincirleri birbirinden ayrılmaya başlayınca Syber green boya serbest kalmakta ve floresans miktarı azalmaktadır. Denatürasyon olduğunda floresans sinyali aniden düşmektedir. Erime eğrisinden yararlanılarak ampliconun T_m derecesi saptanabilmektedir. İncelenen örneğe ait

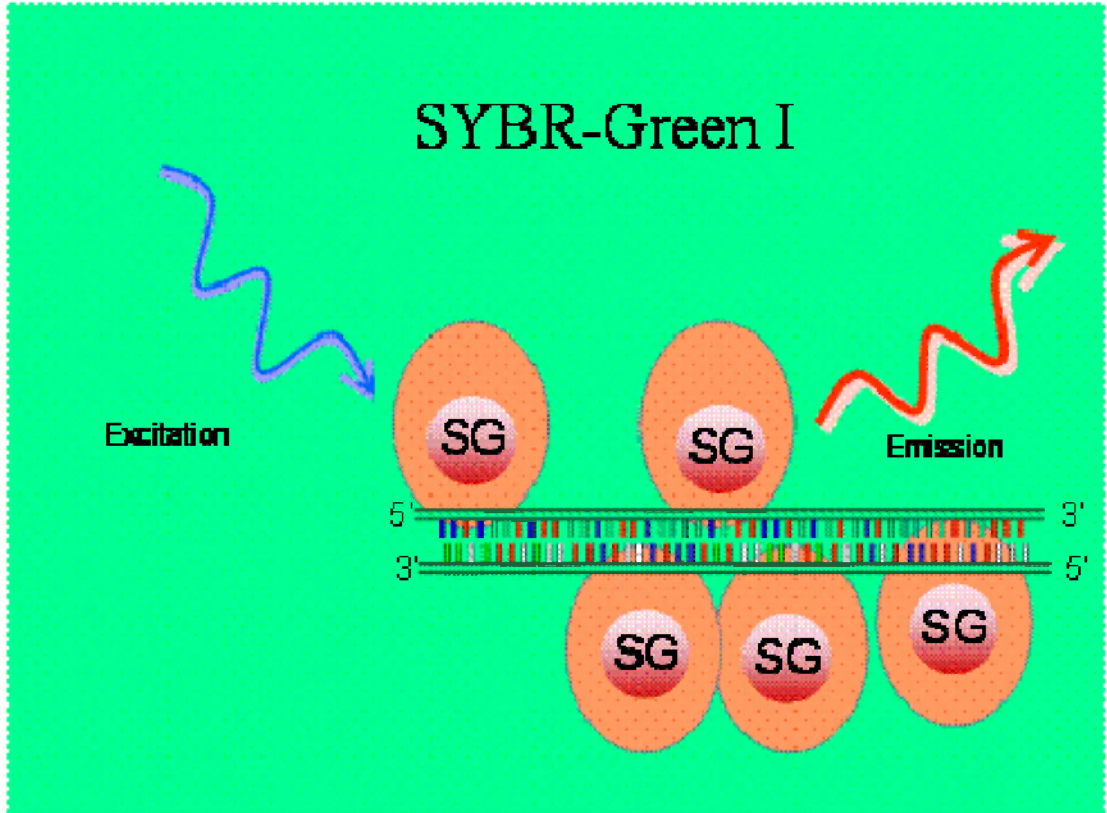
Tm derecesi, aynı koşullarda işleme alınan pozitif kontrolün Tm derecesiyle karşılaştırılarak, PZR sonucunun doğru veya hatalı olduğuna karar verilmektedir. Real-time PCR, kısa sürede kantitatif sonuç verebilmektedir. Tüpler açılmadan tanıya gidildiği için kontaminasyon riski düşüktür. Elektroforeze gerek kalmadan çoğalma esnasında sonuç alınabilmektedir. Ayrıca floresan veren proplar kullanılarak hedef nükleik asitteki mutasyonlar saptanabilmektedir (172).

Real Time-PCR sisteminde kullanılan proplar, Özgül Floresan İşaretli (FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), Taqman, Molecular Beacons, Scorpion Primerleri gibi) ve Özgül Olmayan Floresan İşaretli (Syber Green, Etidyum Bromid gibi) Proplar olmak üzere iki türdür (173).

Syber Green, Çift sarmallı DNA'ya yapışır ve her sentez fazının sonunda maksimum ışımaya (floresan) kaydedilir (Şekil 2.5.2.1). Sentezlemeyici hidrolizleme probu (Örn: TaqMan) iki ucunda birer florofor (ışığıyan madde) bulundurur. Prob bütün halinde iken raportör boya (normalde ışımaya yapabilir) bir ikinci florofor tarafından susturulmuş (Q) haldedir. Ne zaman ki PZR'ın sentez fazında DNA polimerazın 5' ekzonükleaz aktivitesi tarafından prob parçalanır, böylece ayrılan raportör boya ışımaya başlar. Bağlanmamış problarda ışımaz ve ışımaya hedef ürünün varlığı arasında bire bir ilişki bulunmaktadır. İki probun kalıp DNA'ya hesaplanmış bir şekilde bağlanması sonucu (birleşme fazı sırasında) problardan birinde olan verici (kırmızı) florofordan alıcıya (yeşil) doğru bir floresan rezonans enerji transferi olur.

Sonuçta, alıcı florofor daha uzun dalga boylu bir ışımaya yapar ve bu ışımaya kaydedilir. Dual hibridizasyon proplarını amplikonun en son ucuna yerleşecek şekilde dizayn edilirler. İkinci probun 3' sonu bloke edilir ve bu da propların amplikonlardan DNA polimeraz tarafından beklenmedik şekilde düşürülme riskini engellenmiş olur. Propların bir şekilde amplikonlardan düşmeleri ışımada sona ermesi demektir. Proplar moleküler buklet (stem-loop) gibidir. Propların iki ucu birbirlerinin tamamlayıcısı şeklinde sentezlendiğinden kendi kendilerine birleşip halka formu alırlar. Propların bir ucunda raportör bir florokrom (yeşil) diğerinde ise floresan olmayan söndürücü (Q) molekül bulunur. Halka (buklet) yapıda bu ikisi yaklaştığı için raportör ışımaya yapmaz. Birleşme fazında ise prob konformasyonel değişime uğrar, amplikona bağlanır ve ışımaya olur. Bir önceki sayfaya benzerlik gösterir.

Yalnız burada bağlanan prob değil primerdir. Primer uç kısmından hedefe bağlanır ama yinede söndürücü ve raportör pozisyonunu korur. Ne zaman sentez başlar işte o zaman konformasyonunu kaybeder. Sonuç ise raportörün ışımmasıdır. Yeniden birleşme esnasında raportör ve söndürücü birbirine yaklaşır; yani tekrar halka halini alır ve ışımaya yok olur. Scorpion primerler hem kalıp amplikona ve hemde sıcağı sıcağına kendinden sentezlenen amplikona bağlanır. Sentez biter bitmez yeni amplikon ayrılır; sıcaklığında etkisiyle halka kısmındaki sekans yeni üretilen amplikonun tamamlayıcı sekansına bağlanır. Doğal olarak raportör boya susturucudan uzaklaştığı için yeni amplikon ışımaya başlar (174).



Şekil 2.5.2.1: SyBr Green boyasının çift iplikli DNA'ya bağlanması
(<http://www.realtimepcrkits.com/real-time-pcr.htm>)

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışma için Abant İzzet Baysal Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'dan onay alındı. Çalışma Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı araştırma laboratuvarında gerçekleştirildi.

3.1. Hastalar

Abant İzzet Baysal Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Hastanesi Kan Bankasına Kasım 2009-Kasım 2010 tarihleri arasında başvuran gönüllü kan donörleri arasından rutin tarama testleri olan HBsAg, Anti HCV, Anti HIV ve sifiliz için VDRL testi yapılarak sonucu negatif bulunan serumlardan 500 tanesi seçildi. Ayrıca Mikrobiyoloji Laboratuvarına Hepatit öntanısıyla yollanan ve PCR testleriyle kanında viral genom tesbit edilen 100 Hepatit B enfeksiyonu olan hasta serumu, 85 Hepatit C enfeksiyonu olan hasta serumu çalışmaya dahil edildi. Çalışmaya alınacak serumlar çalışma yapılıncaya kadar -70 °C'de saklandı.

3.2. Serolojik Testler

HBsAg, Anti HCV ve Anti HIV testleri Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı Mikrobiyoloji Biriminde makroelisa (Architect i2000SR, Abbott Diagnostic, Chicago, IL, USA) yöntemiyle çalışıldı. Elde edilen sonuçlar <1.00 S/CO ise nonreaktif olarak, ≥ 1.00 S/CO ise reaktif olarak değerlendirildi. Çalışma yapılmadan önce cihazın kalibrasyon ve kontrol testleri üretici firmanın önerileri doğrultusunda yapıldı.

VDRL testi için immünokromatografik yöntemle çalışan sonuçların kalitatif olarak değerlendirildiği kart test kullanıldı (Acon, USA). Testin tüm aşamaları oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Örnek kuyucuğuna serum damlatıldıktan 15 dk sonra test sonucu okundu. Sonuçlar değerlendirilirken kontrol çizgisinin oluşmadığı durumda test geçersiz kabul edildi ve tekrarlandı. Test ve kontrol penceresinde çizgi oluştuğunun gözlenmesi sonucunda test pozitif olarak değerlendirildi.

ALT ve AST testleri Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı Biyokimya biriminde kinetik yöntem ile Architect C8000

cihazında (Abbott Diagnostic, Chicago, IL, USA) kendi orijinal kitleri ile (Sırasıyla Katalog no: 7D56-21 ve Katalog no: 7D81-21).çalışıldı. ALT için erkeklerde 45 U/L ve üzeri, kadınlarda 34 U/L ve üzeri bulunan sonuçlar; AST için ise erkeklerde 35 U/L ve üzeri, kadınlarda 31 U/L ve üzeri olan sonuçlar pozitif olarak kabul edildi (162). Çalışma yapılmadan önce cihazın kalibrasyon ve kontrol testleri üretici firmanın önerileri doğrultusunda yapıldı.

3.3. DNA İzolasyonu

Viral DNA izolasyonu için QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Almanya) nükleik asit izolasyon sistemleri firmanın önerisi doğrultusunda çalışıldı. Hastalara ait serumlar çalışmaya başlamadan 30 dk önce oda sıcaklığına getirildi. Oda sıcaklığına ulaşan örnekler vortekslendi. Her bir çalışmada 24 örneğin izolasyonu yapıldı. Örnek sayısı kadar temiz ependorf alınarak içine 20 µl Proteinaz K (Lysis için) pipetlendi, ardından 200 µl AL (Proteaz ile birlikte RNazların aktivasyonunu ortadan kaldırır) ve daha sonra da 200 µl örnek serum eklendi. Örnekler 15 sn vortekslendi ve 56 °C'de 10 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sırasında kapakta oluşan damlacıklardan dolayı oluşabilecek kontaminasyonu önlemek amacıyla kısa bir spin işlemi uygulandı. Sonra örneklere 200 µl ethanol (%96) (Viral RNA ve DNA'nın membrana en etkin biçimde bağlanmasını sağlamak amacıyla) eklendi, 15 sn vortekslendi ve kapakta oluşan damlacıklardan dolayı oluşabilecek kontaminasyonu önlemek amacıyla kısa bir spin işlemi uygulandı. Tüp içindeki karışım spin kolonlara (QIAamp MinElute Kolonu) (filtreli ependorflara) alındı ve 8000 rpm (Revolutions per minute)'de 1 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonunda spin kolonlar temiz toplama tüplerine yerleştirildi. 500 µl AW1 eklenerek yine 8000 rpm'de 1 dk santrifüjlendi. Süre sonunda yine toplama tüplerine alınan örneklere bu kez 500 µl AW2 solüsyonu eklendi ve 14000 rpm'de 3 dk santrifüjlendi. Bu aşamadan sonra son kez toplama tüpüne alınan örnekler 14000 rpm'de 1 dk santrifüj edildikten sonra temiz ependorflara alındı. AW1 ve AW2 uygulaması ile nükleik asitler membran üzerinde bağlı kalırken, kontaminantlar iki ayrı yıkama sayesinde uzaklaştırılmış oldu. Temiz ependorf tüpü üzerine alınan spin kolonlara 200 µl AE Buffer eklendi. 8000 rpm'de 1 dk santrifüjlenerek membran üzerinde

tutunmuş olan nükleik asit (Ürün) buffer içerisine alındı. PCR çalışması yapılmıncaya kadar ürünler -20 °C'de muhafaza edildi.

3.4. Amplifikasyon

TTV genomu real time PCR yöntemi ile çoğaltıldı. Bunun için ticari olarak hazır PCR miksi (Fluorion-TTV QLS 1.0, İontek, Türkiye) kullanıldı. Primer olarak da TTV 801 GCT ACG TCA CTA ACC ACG ve TTV 935 CTT CGG TGT GTA AAC TCA CC gen bölgeleri ("5' untranslated ORF" bölgesindeki 199 baz çifti) kullanıldı. PCR ürünü, floresan bir boya olan SYBR-green aracılığıyla reaksiyon sırasında görüntüledi. Çoğalan DNA'nın hedef bölge olduğu, erime eğrisi analizi ($86,5\pm 2$) ile kesinleştirildi (Şekil 3.4.1, Şekil 3.4.2, Şekil 3.4.3, Şekil 3.4.4). Amplifikasyon için Tablo 3.4.1'de yer alan PCR karışımı hazırlandı. Bütün tüplere bu karışımdan 23 µL dağıtıldıktan sonra 2 µL ürün eklendi. Reaksiyon tüpü içerisindeki karışımın tüpün dibinde olmasına ve içerisinde hava kabarcığı olmamasına özen gösterildi. Ağzlarının sıkı bir şekilde kapalı olduğundan emin olduktan sonra PCR cihazına (İontek Deteksiyon sistemi, Çin) yerleştirildi. PCR döngüsü Tablo 3.4.2'de belirtildiği gibi ayarlandı. Her bir çalışma sırasında pozitif ve negatif kontrol kullanıldı. Pozitif kontrolün çalışmadığı durumlarda test tekrar edildi.

3.5. İstatistiksel Analiz

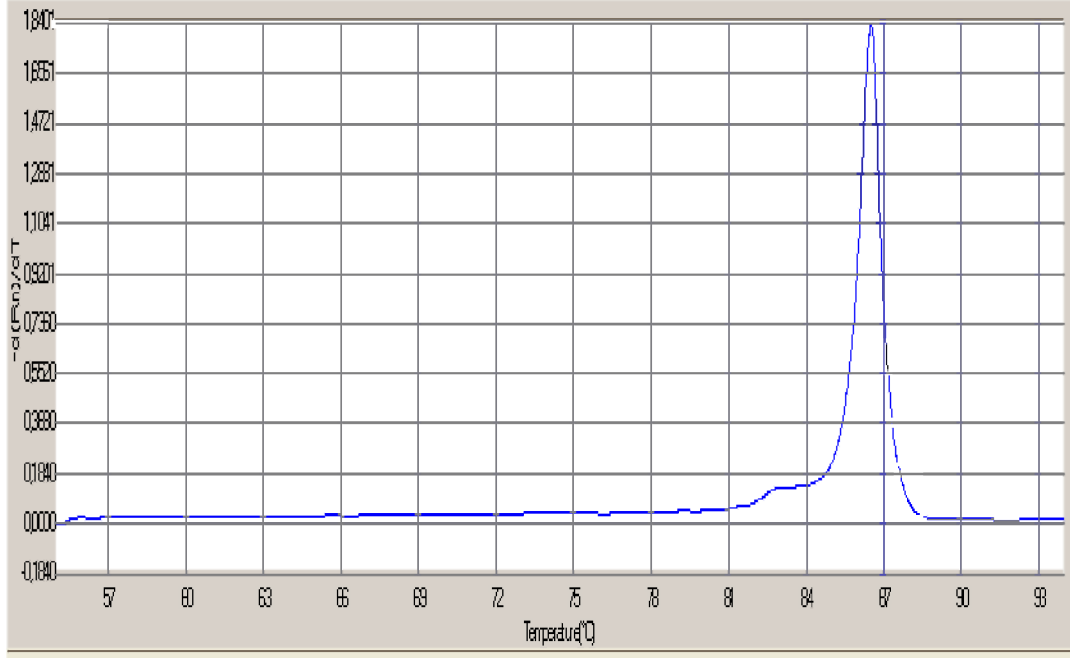
Veriler bilgisayar ortamında SPSS 13.0 (Statistical Package for the Social Science, version 13.0) programı ile değerlendirildi. İstatistiksel değerlendirmede; tanımlayıcı istatistik ve ki-kare testi (χ^2) kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık düzeyi olarak $p < 0,05$ kabul edildi.

Tablo 3.4.1: Yapılan Real-time PCR İşleminde Kullanılan Reaksiyon Karışımın İçeriği.

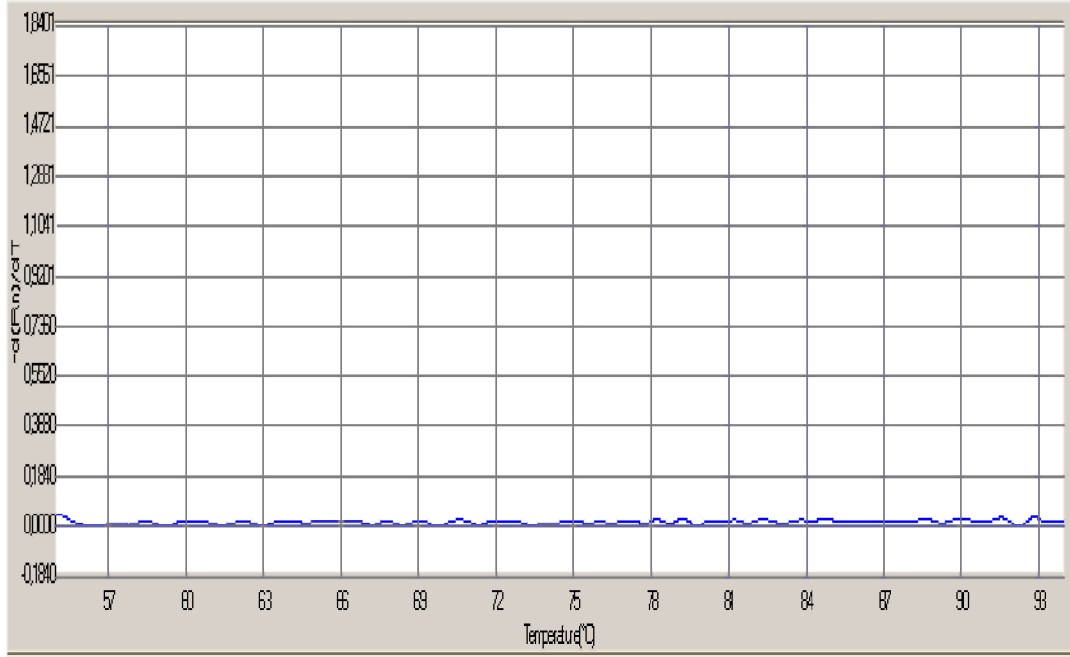
| | |
|---------------------------|---------|
| SYBR Green PCR Mix | 12.5 µl |
| Detection(Deteksiyon) Mix | 4.0 µl |
| dH ₂ O | 6.5 µl |

Tablo 3.4.2: Gerçek Zamanlı PZR döngüsü

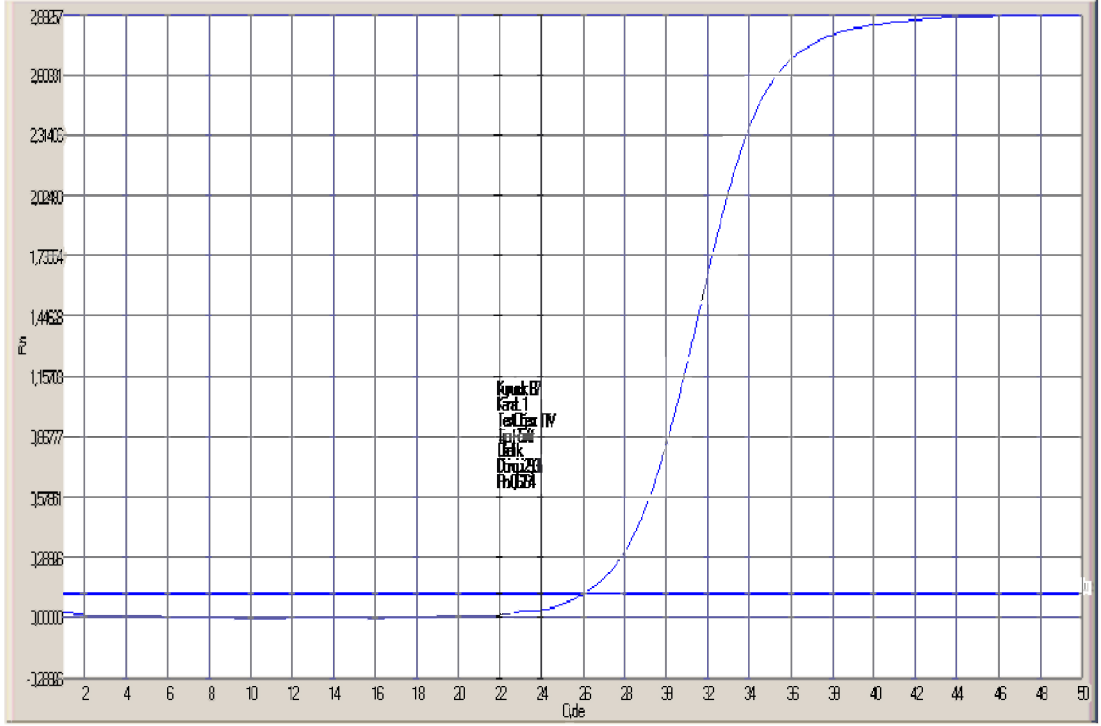
| | Sıcaklık | Süre | |
|--------------------------|----------|----------|-----------------------------|
| Enzim aktivasyonu | 95 °C | 13:30 dk | |
| Denatürasyon | 94 °C | 00:20 dk | 50 döngü |
| Annealing | 58 °C | 00:45 dk | |
| Elongasyon | 72 °C | 01:00 dk | |
| Melting analizi | 94 °C | 00:30 dk | |
| | 60° C | 01:00 dk | |
| | 60 °C | 00:15 dk | 75 döngü (+0.5 °C/döngü) |
| Ürün stabilizasyonu için | 22 °C | ∞ | |



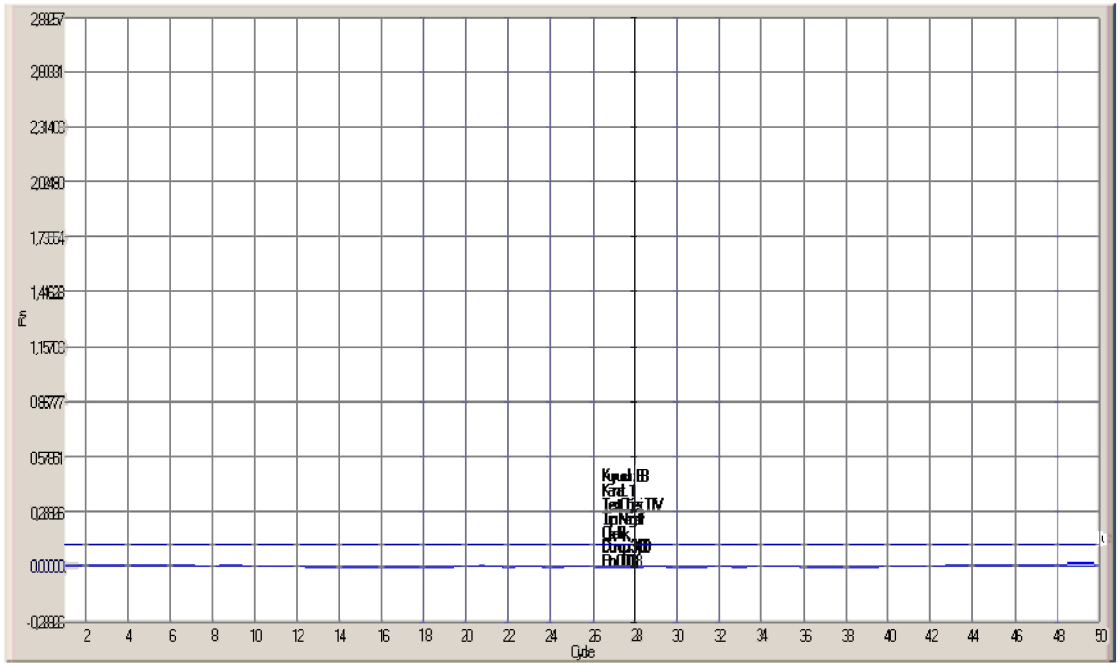
Şekil 3.4.1: TTV DNA pozitif olan serum örneklerine ait erime eğrisi ($86,5\pm 2$).



Şekil 3.4.2: TTV DNA negatif olan serum örneklerine ait erime eğrisi



Şekil 3.4.3: TTV DNA'sı pozitif olan serum örneklerine ait amplifikasyon eğrisi.



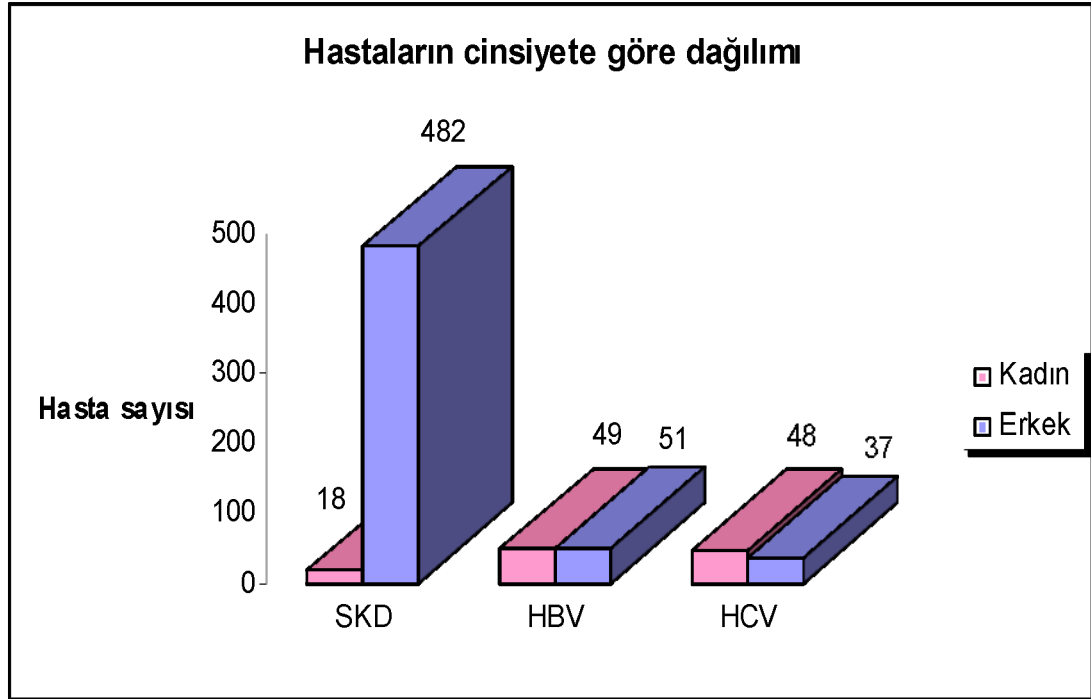
Şekil 3.4.4: TTV DNA negatif olan serum örneklerine ait amplifikasyon eğrisi.

4. BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen 500 sağlıklı kan donörünün (SKD) 18'i kadın, 482'si erkekti. Yaş aralığı 18-61 idi (ort. 35.68±9.62). Hepatit B hasta grubunun 49'u kadın, 51'i erkekti. Bu grubun yaş ortalaması 42.55±16.48 idi. Hepatit C hasta grubunun 48'i kadın, 37'si erkek ve yaş ortalaması 57.98±14.76 idi (Tablo.4.1), (Grafik 4.1).

Tablo 4.1: Çalışmaya dahil edilen hastaların cinsiyete göre dağılımı.

| | Kadın | Erkek | Toplam |
|--------|-----------|------------|--------|
| | n (%) | n (%) | |
| SKD | 18 (3,6) | 482 (96,4) | 500 |
| HBV | 49 (49) | 51 (51) | 100 |
| HCV | 48 (56,5) | 37 (43,5) | 85 |
| Toplam | 115 | 570 | 685 |

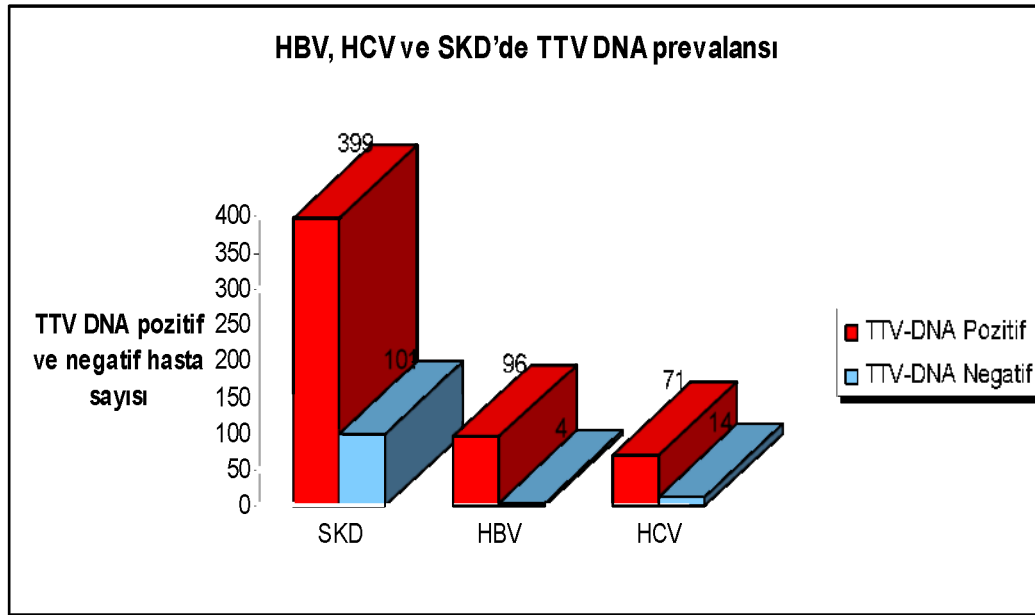


Grafik 4.1: Hastaların cinsiyete göre dağılımı.

Çalışmaya alınan 500 SKD'nin 399 (%79,8)'unun TTV DNA'sı pozitif iken 100 HBV DNA pozitif örneğin 96 (%96)'sının, 85 HCV RNA pozitif örneğin de 71 (%83,5)'inin TTV DNA'sı pozitif olarak bulundu (Tablo 4.2), (Grafik 4.2).

Tablo 4.2: HBV, HCV ve SKD'de TTV DNA prevalansı.

| | TTV-DNA | | Toplam |
|---------------|------------|------------|--------|
| | Pozitif | Negatif | |
| | n (%) | n (%) | |
| SKD | 399 (79,8) | 101 (20,2) | 500 |
| HBV | 96 (96) | 4 (4) | 100 |
| HCV | 71 (83.5) | 14 (16.5) | 85 |
| Toplam | 566 | 119 | 685 |



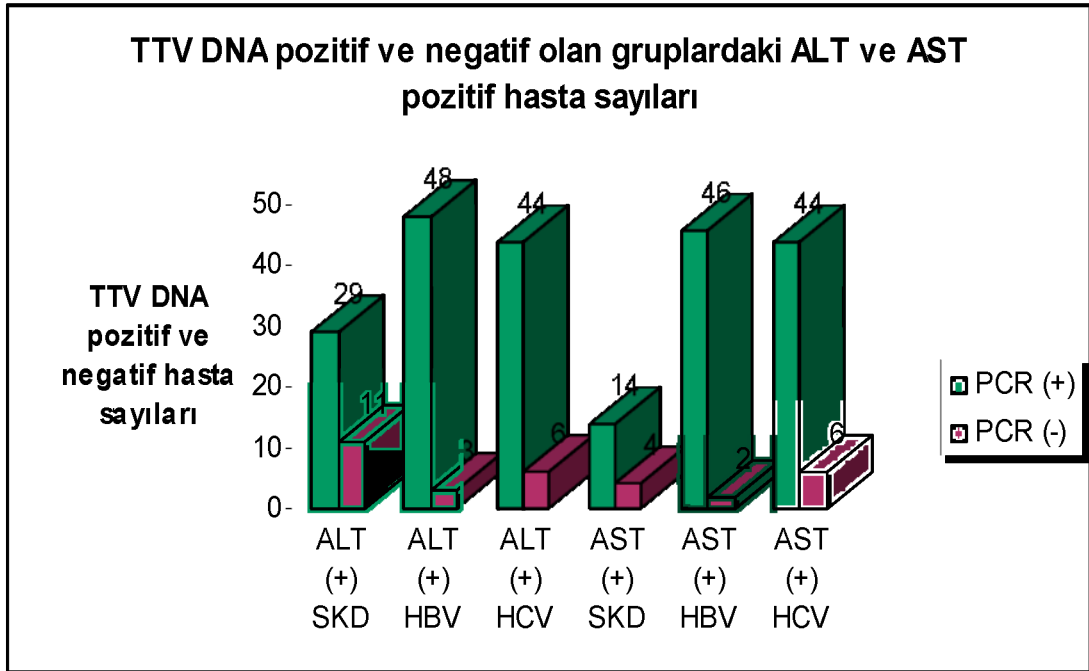
Grafik 4.2: HBV, HCV ve SKD'de TTV DNA prevalansı.

HBV grubunda TTV pozitifliği SKD ve HCV grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,00047$). SKD ve HCV grubu arasında TTV DNA pozitifliği açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p=0,5142$).

TTV DNA pozitif bulunan hasta gruplarının ALT ve AST seviyeleri yönünden değerlendirme yapıldığında; 399 SKD'nin 29'unun, HBV DNA'sı pozitif olan 96 hastanın 48'inin ve HCV RNA'sı pozitif olan 71 hastanın 44'ünün ALT değeri; 399 SKD'nin 14'ünün, HBV DNA'sı pozitif olan 96 hastanın 46'sının ve HCV RNA'sı pozitif olan 71 hastanın 44'ünün AST değeri pozitif olarak bulunmuştur (Tablo 4.3), (Grafik 4.3).

Tablo 4.3: TTV DNA pozitif ve negatif olan gruplardaki ALT ve AST pozitif hasta sayıları.

| | ALT (+) | | | AST (+) | | |
|----------------|---------|-----|-----|---------|-----|-----|
| | SKD | HBV | HCV | SKD | HBV | HCV |
| PCR (+) | 29 | 48 | 44 | 14 | 46 | 44 |
| PCR (-) | 11 | 3 | 6 | 4 | 2 | 6 |
| Toplam | 40 | 51 | 50 | 18 | 48 | 50 |



Grafik 4.3: TTV DNA pozitif ve negatif olan gruplardaki ALT ve AST pozitif hasta sayıları.

SKD'nde TTV DNA pozitif olanlarla olmayanlar arasında ALT pozitifliği ($p=0,231$) ve AST pozitifliği ($p=0,828$) açısından anlamlı fark bulunmadı. HBV hasta grubunda TTV DNA pozitif olanlarla olmayanlar arasında ALT pozitifliği ($p=0,327$) ve AST pozitifliği ($p=0,935$) açısından anlamlı fark bulunmadı. HCV hasta grubunda TTV DNA pozitif olanlarla olmayanlar arasında ALT pozitifliği ($p=0,184$) ve AST pozitifliği ($p=0,184$) açısından anlamlı fark bulunmadı.

TTV DNA'sı pozitif olan Hepatit B ve C hasta grubu ile SKD grubu arasında ALT pozitifliği ($p=0,00067$) ve AST pozitifliği ($p=0,00079$) açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı.

5. TARTIŞMA

TT virüs ilk olarak 1997'nin sonunda, Japonya'da etiyolojisi bilinmeyen akut posttransfüzyon hepatitli bir hastanın serumundan izole edildikten sonra gelişen hepatit olgusunun sorumlusu olarak kabul edilmiştir (10). Virüsün hepatit gelişmesindeki epidemiyolojik ve etiyolojik rolü ile ilgili araştırmalar yıllar içinde hız kazanmıştır. İlk başlarda Okamoto ve ark. TTV-DNA'nın serumda saptandığı miktarının 10-100 katını karaciğerde saptamışlar ve TTV infeksiyonunun ve replikasyonun karaciğerde olduğunu bildirmişlerdir (21). Hiç transfüzyon almamış kan donörlerinde TTV DNA'nın yüksek oranda olması, parenteral yolla bulaş riski olmayan kişilerde de infeksiyon gelişmesi ve dışkılarında DNA'nın saptanması non-parenteral yolla bulaş ihtimalini akla getirmiştir (21, 97). Nitekim literatürde TTV nin farklı vücut sıvılarında bulunduğu ve bulaş yolları ile ilgili olarak fazlaca veri bulunmaktadır (98-102).

Gönüllü kan donörlerinde, akut ve kronik hepatitli hastalarda, sürekli kan transfüzyonuna maruz kalan hasta gruplarında, hemodiyaliz hastalarında, solid organ transplantasyonu yapılan olgularda TTV varlığı araştırılarak hem hastalığın geçişi ile ilgili sorulara hem de karaciğer dokusu üzerinde patolojik değişiklik yapıp yapmadığı ile ilgili sorulara cevap aranmıştır (55, 175-182).

TT virüsle ilgili veriler arttıkça konu daha karmaşık bir hal almıştır. TTV'nin sağlıklı kişilerde de yüksek oranda saptandığının rapor edilmesiyle, hepatit etyolojisindeki rolü tartışılmaya başlanmıştır. Virüsün genetik çeşitliliğinin fazla olması ve tanıda yalnız moleküler yöntemlerin kullanılabilmesi araştırmalarda güçlükler neden olmuştur.

TTV infeksiyonu sağlıklı bireylerde %1 ile %94 arasında görülmektedir (183-186). Sağlıklı kan donörlerinde yapılan TTV tarama çalışmalarında farklı bölgelerden farklı oranlar bildirilmiştir. Hindistan'da 150 sağlıklı kan donöründe %45,3 Birleşik Arap Emirliklerin'de 100 sağlıklı kan donöründe %75, İtalya'da 113 sağlıklı kan donöründe %42,4, Güney Tayvan'da 475 sağlıklı kan donöründe %23,4, Kore'de 110 sağlıklı kan donöründe %8,2 ve İran'da 250 sağlıklı kan donöründe %20 oranında TTV DNA pozitifliği bildirilmiştir. Sağlıklı popülasyonda da TTV araştıran çalışmalar bulunmaktadır. Chattopadhy ve ark. 100 sağlıklı birey ile

yaptıkları çalışmada %12, Endonezya'da yapılan bir çalışmada 244 sağlıklı bireyde %42, İngiltere'de 30 sağlıklı bireyde %10, Mısır'da 30 sağlıklı bireyde %36,7, Suudi Arabistan'da 90 sağlıklı bireyde %4,4, Tayvan'da 43 sağlıklı bireyde %37,2, ve son olarak ta Rusya'da 2009 yılında Vasilyev ve ark.'nın 512 sağlıklı atleti dahil ettikleri çalışmada ise TTV DNA pozitifliği %94 olarak bulunmuştur (19, 176, 178, 180-182, 186-192).

Ülkemizde kan donörleri ile yapılmış çalışmalarda TTV infeksiyonunun görülme sıklığı Savaş ve ark. tarafından %11, Gülsoy ve ark. tarafından %25,5, Tunçbilek ve ark. tarafından %4,5, Erensoy ve ark. tarafından %51,6 olarak bulunmuştur (64, 104, 177, 179). Bizim çalışmamızda ise sağlıklı kan donörlerinde TTV DNA sıklığı %79,8 olarak bulunmuştur.

Sağlıklı kişilere göre HBV, HCV infeksiyonu olan kişilerde TTV pozitifliğinin arttığı görülmüştür (94). Chattopadhyay ve ark. yaptıkları çalışmada TTV pozitifliğini HBV grubunda sağlıklı bireylerden daha yüksek olarak bulunmuştur. Aynı zamanda HBV grubu ile HCV grubu arasında TTV pozitifliği açısından anlamlı bir fark bulmamışlardır (180). Ülkemizde Savaş ve ark. yaptıkları çalışmada hepatitli hastalarda TTV pozitifliğini %78 olarak bulmuşlardır. Ayrıca kontrol grubu olarak kullandıkları sağlıklı kan donörleriyle hepatitli grubu TTV pozitifliği yönünden karşılaştırdıklarında anlamlı fark bulmuşlardır (179). Asım ve ark. çalışmalarından elde ettikleri veriler ışığında TTV infeksiyonuna kan transfüzyonu, dövme ve intravenöz ilaç kullanımı gibi risk faktörlerinin eşlik ettiği kanaatine varmışlar ve TTV'yi kan yoluyla bulaşan infeksiyon etkeni olarak tanımlamışlardır. Aynı çalışmada araştırmacılar hepatitli hastalar ile sağlıklı kan donörleri arasında TTV varlığı açısından anlamlı bir fark bulmamışlardır (181). Biz çalışmamızda Hepatit B li hasta grubunda, SKD ve Hepatit C'li hasta grubuna göre TTV pozitifliği açısından istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu saptadık ($p=0,00047$). SKD ve Hepatit C'li hasta grubu arasında TTV DNA pozitifliği açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptamadık($p=0,5142$).

Matsumoto ve ark., kan transfüzyonu sonrasında TTV DNA'sı pozitifleşen kişilerde anormal ALT seviyesi saptanmadığını ve viremi yıllarca sürse de kronik hepatit gelişmediğini saptamışlardır (43). Karaciğer hasarının önemli bir belirteci

olan ALT ve AST düzeylerinin de araştırıldığı çalışmamızda; TTV DNA'sı pozitif olan Hepatit B ve C hasta grubu ile sağlıklı kan donörü grubu arasında ALT ($p=0,00067$) ve AST ($p=0,00079$) seviyeleri açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı. Ancak gruplar içinde TTV DNA pozitif olanlarla olmayanlar arasında ALT ve AST pozitifliği açısından anlamlı fark bulunmadı.

Bulgularımız ışığında TTV'nin Hepatit B ile ko-infeksiyon oluşturabileceğini ancak karaciğer hücreleri üzerine zarar verici bir etkisinin olmadığını söyleyebiliriz. Nitekim Pistello ve ark. çalışmalarında karaciğer hasarı olan dokuda virüs replikasyonunun sürekliliğine dikkat çekerek, karaciğer ve safra yollarında virüsün plazmada bulunduğundan daha fazla olduğunu vurgulamışlardır (51). Hepatit infeksiyonları ile TTV infeksiyonları birlikteliğinin karaciğer hasarını artırıp artırmadığı ile ilgili veriler yetersizdir. Bu konuda geniş serilerle yapılacak olan çalışmalarla net olmayan viral patogeneze ile ilgili dünya literatürüne yeni veriler sağlanmalıdır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

TTV ilk olarak plazmada tesbit edilmiş olsa da günümüzde sağlıklı kişilerde de bulunduğu ortaya çıkarılması virusun sadece kan yoluyla geçmediğini, insanlarda farklı doku ve sıvılarda da bulunması insan mikroflorasının bir parçası olduğu kanaatini kuvvetlendirmektedir.

Karaciğer hasarı yapan hepatit virüsleriyle birlikteliği dikkat çekicidir. Ancak karaciğer hasarı yapıp yapmadığı ile ilgili veriler yetersizdir. Hasarlı dokuda mı daha iyi çoğalıyor yoksa diğer virüslerle birlikte hasar oranını mı artırıyor? sorusunun cevabı net değildir. Bu konuda çalışmalar yapılarak literatüre virusun net olmayan patogenezi hakkında katkı sağlanmalıdır.

Virüsün HCV'ye göre HBV'li hastalarda daha fazla oranda görülmesi HBV-TTV birlikteliğinde daha iyi replikasyon sağlanabildiği şüphesini oluşturmaktadır. Bu konuyu netleştirmek için geniş serilerle çalışma yapılmalıdır.

Sağlıklı kişilerde tek başına bulunduğu karaciğer dokusundaki hasarın en önemli belirteci olan ALT düzeylerinde anormal bir değişikliğe neden olmamaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. **Atamer T.** Kan Transfüzyonunun Tarihçesi. *35. Ulusal Hematoloji Kongresi Kitapçığı*. **2009**; 148-154.
2. **Ündar L, Karadoğan İ.** Kan ve transfüzyon fizyolojisi. *1. Ulusal Kan Merkezleri ve Transfüzyon Tıbbi Kursu Kitabı*. **2006**; 22-27.
3. **Kocazeybek B.** Kan ve Kan Ürünleri ile Bulaşan İnfeksiyonlar: Rutin Tarama Testleri ve Moleküler Tanı Yöntemleri. *Cerrahpaşa Tıp Derg*. **2003**; 34: 158-163.
4. **Berkem R.** Transfüzyonla bulaşan infeksiyonlar-2. *1. Ulusal Kan Merkezleri ve Transfüzyon Tıbbi Kursu Kitabı*. **2006**; 99-108.
5. T.C. Sağlık Bakanlığı Ulusal Kan ve Kan Ürünleri Rehberi. *Türkiye Kan Merkezleri ve Transfüzyon Derneği Yayınları*. **2011**; 205-206.
6. **Aydın F, Kaklıkaya N.** Transfüzyonla bulaşan infeksiyonlar-1. *1. Ulusal Kan Merkezleri Ve Transfüzyon Tıbbi Kursu Kitabı*. **2006**; 92-98.
7. **Allain JP, Stramer SL, Carneiro-Proietti ABF, Martins ML, Lopes da Silva SN, Ribeiro M et al.** Transfusion-transmitted infectious diseases. *Biologicals*. **2009**; 71-77.
8. **Ferreira Gomes FVBA and Junior JE.** HTLV-II in blood donors at the Blood Center Net of Ceará – HEMOCE. *Rev Assoc Med Bras*. **2011**; 57: 309-312.
9. **Odeh RA, Yasin S, Nasrallah G, Babi Y.** Rates of infection and phylogenetic analysis of GB virus-C among Kuwaiti and Jordanian Blood Donors. *Intervirology*. **2010**; 53: 402-407.
10. **Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, Yoshizawa H, Miyakawa Y, Mayumi M.** A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Commun* **1997**; 241: 92-97.
11. **Qu L, Jenkins F, Triulzi DJ.** Human herpesvirus 8 genomes and seroprevalence in United States blood donors. *Transfusion*. **2010**; 50: 1050-1056.
12. **Ben Fredj N, Rotola A, Nefzi F, Chebel S, Rizzo R, Caselli E, Frih-Ayed M, Di Luca D, Aouni M.** Identification of human herpesviruses 1 to 8 in Tunisian multiple sclerosis patients and healthy blood donors. *J Neurovirol*. **2011**; (DOI: 10.1007/s13365-011-0056-z).

13. **Nowak J, Januszkiewicz D, Pernak M, Liweń I, Zawada M, Rembowska J et al.** Multiple sclerosis-associated virus-related pol sequences found both in multiple sclerosis and healthy donors are more frequently expressed in multiple sclerosis patients. *J Neurovirol.* **2003**; 9: 112-117.
14. **Karimi-Rastehkenari A Bouzari M.** High frequency of SEN virus infection in thalassemic patients and healthy blood donors in Iran. *Virol J.* **2010**; 7: 1.
15. **Inami T, Konomi N, Arakawa Y, Abe K.** High prevalence of TT virus DNA in human saliva and semen. *J Clin Microbiol* **2000**; 38: 2407-2408.
16. **Osiowy C, Sauder C.** Detection of TT virus in human hair and skin. *Hepatol Res* **2000**; 16: 155-162.
17. **Takayama S, Miura T, Matsuo S, Taki M, Sugii S.** Prevalence and persistence of a novel DNA TT virus (TTV) infection in Japanese haemophiliacs. *Br J Haematol.* **1999**;104: 626-629.
18. **Shimizu T, Moriyama M, Tanaka N, Arakawa Y.** Persistent TT virus infection does not contribute to the development of non-A to -G hepatocellular carcinoma. A case-control study of 19 patients in Japan. *Intervirology* **2000**; 43: 80-86.
19. **Jeon MJ, Shin JH, Suh SP, Lim YC, Ryang DW.** TT virus and hepatitis G virus infections in Korean blood donors and patients with chronic liver disease. *World J Gastroenterol.* **2003**; 4: 741-744.
20. **Biagini P, Todd D, Bendinelli M, Hino S, Mankertz A, Mishiro S et al.** Anellovirus In Virus Taxonomy. VIII Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Eds. Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA. London, United Kingdom: *Elsevier/Academic Press.* **2004**; 335-341.
21. **Okamoto H, Nishizawa T, Kato N, Ukita M, Ikeda H, Lizuka H et al.** Molecular cloning and characterization of a novel DNA virus (TTV) associated with posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Hepatol Res* **1998**; 10: 1-16.
22. **Mushahwar IK, Erker JC, Muerhoff AS, Leary TP, Simons JN, Birkenmeyer LG et al.** Molecular and biophysical characterization of TT virus: evidence for a new virus family infecting humans. *Proc Natl Acad Sci USA* **1999**; 96: 3177-3182.
23. **Ustaçelebi Ş, Abacıoğlu H, Badur S.** Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji. Güneş Tıp Kitabevi. Ankara. **2004**; 216-219.
24. <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.version=2009>

25. Peng YH, Nishizawa T, Takahashi M, Ishikawa T, Yoshikawa A, Okamoto H. Analysis of the entire genomes of thirteen TT virus variants classifiable into the fourth and fifth genetic groups, isolated from viremic infants. *Arch Virol*. 2002; 147: 21-41.
26. Macera L, Cortey M, Maggi F, Segales J, Kekarainen T. A novel rolling circle amplification assay to detect members of the family Anelloviridae in pigs and humans. *Virus Res*. 2011; 160: 424-427.
27. Biagine P, Micco de P. Anellovirus. Brian W. J. Mahy, Marc H. V. van Regenmortel eds. Desk Encyclopedia of Human and Medical Virology. 2009; 17-23.
28. Okamoto H, Takahashi M, Nishizawa T, Ukita M, Fukuda M, Tsuda F et al. Marked genomic heterogeneity and frequent mixed infection of TT virus demonstrated by PCR with primers from coding and noncoding regions. *Virology* 1999; 259: 428-436.
29. Okamoto H, Nishizawa T, Ukita M, Takahashi M, Fukuda M, Lizuka H et al. The entire nucleotide sequence of a TT virus isolate from the United States (TUSO1): comparison with reported isolates and phylogenetic analysis. *Virology* 1999; 259: 437-448.
30. Ball JK, Curran R, Berridge S, Grabowska AM, Jameson CL, Thomson BJ et al. TT virus sequence heterogeneity in vivo: evidence for co-infection with multiple genetic types. *J Gen Virol* 1999; 80: 1759-1768.
31. Worobey M. Extensive homologous recombination among widely divergent TT viruses. *J Virol* 2000; 74: 7666-7670.
32. Yamamoto T, Kajino K, Ogawa M, Gotoh I, Matsuoka S, Suzuki K et al. Hepatocellular carcinomas infected with the novel TT DNA virus lack viral integration. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; 251: 339-343.
33. Tanaka Y, Mizokami M, Orito E, Ohno T, Nakano T, Kato T, et al. Lack of integrated TT virus (TTV) genomes in cellular DNA in infected human hematopoietic cells. *Leuk Lymphoma*. 2000; 38: 411-417.
34. Tuveri R, Jaffredo F, Lunel F, Nalpa B, Pol S, Feray C et al. Impact of TT virus infection in acute and chronic, viral- and non viral-related liver diseases. *J Hepatol* 2000; 33: 121-127.
35. Hagiwara H, Hayashi N, Mita E, Oshita M, Kobayashi I, Iio S et al. Influence of transfusion-transmitted virus infection on the clinical features and response to interferon therapy in Japanese patients with chronic hepatitis C. *J Viral Hepat* 1999; 6: 463-469.

36. Nakano T, Park YM, Mizokami M, Choi JY, Orito E, Ohno T et al. TT virus infection among blood donors and patients with non-B, non-C liver diseases in Korea. *J Hepatol* 1999; 30: 389-393.
37. Hsieh SY, Wu YH, Ho YP, Tsao KC, Yeh CT, Liaw YF. High prevalence of TT virus infection in healthy children and adults and in patients with liver disease in Taiwan. *J Clin Microbiol.* 1999; 37: 1829-1831.
38. Niel C, de Oliveira JM, Ross RS, Gomes SA, Roggendorf M, Viazov S. High prevalence of TT virus infection in Brazilian blood donors. *J Med Virol.* 1999; 57: 259-63.
39. Charlton M, Adjei P, Poterucha J, Zein N, Moore B, Therneau T et al. TT-virus infection in North American blood donors, patients with fulminant hepatic failure and cryptogenic cirrhosis. *Hepatology.* 1998; 28: 839-842.
40. Gimenez-Barcons M, Forns X, Ampurdanes S, Guilera M, Soler M, Soquero C et al. Infection with a novel human DNA virus (TTV) has no pathogenic significance in patients with liver diseases. *J Hepatol.* 1999; 30: 1028-1034.
41. Kato T, Mizokami M, Orito E, Nakano T, Tanaka Y, Ueda R et al. High prevalence of TT virus infection in Japanese patients with liver disease and in blood donors. *J Hepatol.* 1999; 31: 221-227.
42. Kanda T, Yokosuka O, Ikeuchi T, Seta T, Kawai S, Imazeki F et al. The role of TT virus infection in acute viral hepatitis. *Hepatology.* 1999; 29: 1905-1908.
43. Matsumoto A, Yeo AE, Shih JW, Tanaka E, Kiyosawa K, Alter HJ. Transfusion-associated TT virus infection and its relationship to liver disease. *Hepatology.* 1999; 30: 283-288.
44. Jiang RL, Lu Q, Luo KX, Tan FM. A prospective study of transfusion-transmitted virus transmission by blood transfusion. *J Viral Hepat.* 1999; 6: 49-51.
45. Jiang XJ, Luo KX, He HT. Intrahepatic transfusion-transmitted virus detected by in situ hybridization in patients with liver diseases. *J Viral Hepat.* 2000; 7: 292-296.
46. Okamoto H, Ukita M, Nishizawa T, Kishimoto J, Hoshi Y, Mizuo H et al. Circular double-stranded forms of TT virus DNA in the liver. *J Virol.* 2000; 74: 5161-5167.

47. **Desai SM, Muerhoff AS, Leary TP, Erker JC, Simons JN, Chalmers ML et al.** Prevalence of TT virus infection in US blood donors and populations at risk for acquiring parenterally transmitted viruses. *J Infect Dis.* **1999**; 179: 1242-1244.
48. **Itoh K, Takahashi M, Ukita M, Nishizawa T, Okamoto H.** Influence of primers on the detection of TT virus DNA by polymerase chain reaction. *J Infect Dis.* **1999**; 180: 1750-1751.
49. **Ikeda H, Takasu M, Inoue K, Okamoto H, Miyakawa Y, Mayumi M.** Infection with an unenveloped DNA virus (TTV) in patients with acute or chronic liver disease of unknown etiology and in those positive for hepatitis C virus RNA. *J Hepatol.* **1999**; 30: 205-212.
50. **Okamura A, Yoshioka M, Kikuta H, Kubota M, Ma X, Hayashi A et al.** Detection of TT virus sequences in children with liver disease of unknown etiology. *J Med Virol.* **2000**; 62: 104-108.
51. **Tanaka H, Okamoto H, Luengrojanakul P, Chainuvati T, Tsuda F, Tanaka T et al.** Infection with an unenveloped DNA virus (TTV) associated with posttransfusion non-A to G hepatitis in hepatitis patients and healthy blood donors in Thailand. *J Med Virol.* **1998**; 56: 234-238.
52. **Pistello M, Morrica A, Maggi F, Vatteroni ML, Freer G, Fornai C et al.** TT virus levels in the plasma of infected individuals with different hepatic and extrahepatic pathology. *J Med Virol.* **2001**; 63: 189-195.
53. **Nobili V, Maggi F, Diciommo V, Caione D, Marcellini M, Bendinelli M.** Is torquetenovirus a potential cause of liver damage in children? *J Infect.* **2005**; 50: 368-369.
54. **Tokita H, Murai S, Kamitsukasa H, Yagura M, Harada H, Takahashi M et al.** High TT virus load as an independent factor associated with the occurrence of hepatocellular carcinoma among patients with hepatitis C virus-related chronic liver disease. *J Med Virol.* **2002**; 67: 501-509.
55. **Campo N, Brizzolara R, Sinelli N, Torre F, Russo R, Deferrari G et al.** TT virus infection in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* **2000**; 15: 1823-1826.
56. **He Z, Zhuang H, Wang X, Song S, Dong Q, Yan J et al.** Retrospective analysis of non-A-E hepatitis: possible role of hepatitis B and C virus infection. *J Med Virol.* **2003**; 69: 59-65.
57. **Hsu HY, Ni YH, Chen HL, Kao JH, Chang MH.** TT virus infection in healthy children, children after blood transfusion, and children with non-A to E hepatitis or other liver diseases in Taiwan. *J Med Virol.* **2003**; 69: 66-71.

58. Kato T, Mizokami M, Mukaide M, Orito E, Ohno T, Nakano T et al. Development of a TT virus DNA quantification system using real-time detection PCR. *J Clin Microbiol.* **2000**; 38: 94-98.
59. Schröter M, Laufs R, Zöllner B, Knödler B, Schafer P, Feucht HH. A novel DNA virus (SEN) among patients on maintenance hemodialysis: prevalence and clinical importance. *J Clin Virol.* **2003**; 27: 69-73.
60. Umemura T, Alter HJ, Tanaka E, Yeo AE, Shih JW, Oriti K et al. Association between SEN virus infection and hepatitis C in Japan. *J Infect Dis.* **2001**; 184: 1246-1251.
61. Ali S, Fevery J, Peerlinck K, Verslype C, Schelstraete R, Gyselinck F et al. TTV infection and its relation to serum transaminases in apparently healthy blood donors and in patients with clotting disorders who have been investigated previously for hepatitis C virus and GBV-C/HGV infection in Belgium. *J Med Virol.* **2002**; 66: 561-566.
62. Azzi A, De Santis R, Morfini M, Zakrzewska K, Musso R, Santagostino E et al. TT virus contaminates first-generation recombinant factor VIII concentrates. *Blood.* **2001**; 98: 2571-2573.
63. Chan PK, Chik KW, Li CK, Tang NL, Ming MS, Cheung JL et al. Prevalence and genotype distribution of TT virus in various specimen types from thalassaemic patients. *J Viral Hepat.* **2001**; 8: 304-309.
64. Erensoy S, Saymer AA, Türkoğlu S, Canatan D, Akarca US, Sertöz R et al. TT virus infection and genotype distribution in blood donors and a group of patients from Turkey. *Infection.* **2002**; 30: 299-302.
65. Huang YH, Wu JC, Chiang TY, Chan YJ, Huo TI, Huang YS et al. Detection and viral nucleotide sequence analysis of transfusion-transmitted virus infection in acute fulminant and non-fulminant hepatitis. *J Viral Hepat.* **2000**; 7: 56-63.
66. Ikeuchi T, Yokosuka O, Kanda T, Imazeki F, Seta T, Saisho H. Roles of TT virus infection in various types of chronic hepatitis. *Intervirology* **2001**; 44: 219-223.
67. Kurihara C, Ishiyama N, Nishiyama Y, Katayama K, Miura S. Changes of DNA titer and sequence variance of TT virus in hepatic disorders. *Hepatol Res.* **2001**; 19: 212-224.
68. Masia G, Ingianni A, Demelia L, Faa G, Manconi PE, Pilleri G et al. TT virus infection in Italy: prevalence and genotypes in healthy subjects, viral liver diseases and asymptomatic infections by parenterally transmitted viruses. *J Viral Hepat.* **2001**; 8: 384-390.

69. Mikuni M, Moriyama M, Tanaka N, Abe K, Arakawa Y. SEN virus infection does not affect the progression of non-A to -E liver disease. *J Med Virol.* 2002; 67: 624-629.
70. Nishiguchi S, Enomoto M, Shiomi S, Tanaka M, Fukuda K, Tamori A et al. TT virus infection in patients with chronic liver disease of unknown etiology. *J Med Virol.* 2000; 62: 392-398.
71. Tanaka Y, Mizokami M, Orito E, Nakano T, Kato T, Ding X et al. A new genotype of TT virus (TTV) infection among Colombian native Indians. *J Med Virol.* 1999; 57: 264-268.
72. Watanabe H, Saito T, Kawamata O, Shao L, Aoki M, Terui Y et al. Clinical implications of TT virus superinfection in patients with chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol.* 2000; 95: 1776-1780.
73. Wong SG, Primi D, Kojima H, Sottini A, Giulivi A, Zhang M et al. Insights into SEN virus prevalence, transmission, and treatment in community-based persons and patients with liver disease referred to a liver disease unit. *Clin Infect Dis.* 2002; 35: 789-795.
74. Maggi F, Pifferi M, Fornai C, Andreoli E, Tempestini E, Vatteroni M et al. TT virus in the nasal secretions of children with acute respiratory diseases: relations to viremia and disease severity. *J Virol.* 2003; 77: 2418-2425.
75. Pifferi M, Maggi F, Andreoli E, Lanini L, Marco ED, Fornai C et al. Associations between nasal torquetenovirus load and spirometric indices in children with asthma. *J Infect Dis.* 2005; 192: 1141-1148.
76. Bando M, Ohno S, Oshikawa K, Takahashi M, Okamoto H, Sugiyama Y. Infection of TT virus in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med.* 2001; 95: 935-942.
77. Pifferi M, Maggi F, Caramella D, De Marco E, Andreoli E, Meschi S et al. High torquetenovirus loads are correlated with bronchiectasis and peripheral airflow limitation in children. *Pediatr Infect Dis. J.* 2006; 25: 804-808.
78. Calcaterra S, Zaniratti MS, Serraino D, Peroni M, Abbate I, Cappiello G et al. Cervicovaginal shedding of TT virus in HIV-infected women. *J Hum Virol.* 2001; 4: 343-345.
79. Maggi F, Marchi S, Fornai C, Tempestini E, Andreoli E, Lanini L et al. Relationship of TT virus and Helicobacter pylori infections in gastric tissues of patients with gastritis. *J Med Virol.* 2003; 71: 160-165.

80. Shibayama T, Masuda G, Ajisawa A, Takahashi M, Nishizawa T, Tsuda F et al. Inverse relationship between the titre of TT virus DNA and the CD4 cell count in patients infected with HIV. *AIDS* 2001; 15: 563-570.
81. Garbuglia AR, Iezzi T, Capobianchi MR, Pignoloni P, Pulsoni A, Sourdis J et al. Detection of TT virus in lymph node biopsies of B-cell lymphoma and Hodgkin's disease, and its association with EBV infection. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2003; 16: 109-118.
82. zur Hausen H, de Villiers EM. Virus target cell conditioning model to explain some epidemiologic characteristics of childhood leukemias and lymphomas. *Int J Cancer* 2005; 115: 1-5.
83. Szladek G, Juhasz A, Kardos G, Szoke K, Major T, Sziklai I et al. High co-prevalence of genogroup 1 TT virus and human papillomavirus is associated with poor clinical outcome of laryngeal carcinoma. *J Clin Pathol.* 2005; 58: 402-405.
84. de Villiers EM, Bulajic M, Nitsch C, Kecmanovic D, Pavlov M, Kopp-Schneider A et al. TTV infection in colorectal cancer tissues and normal mucosa. *Int J Cancer* 2007; 121: 2109-2112.
85. Girard C, Ottomani L, Ducos J, Dereure O, Carles MJ, Guillot B. High Prevalence of Torque teno (TT) virus in classical Kaposi's sarcoma. *Acta Derm Venereol.* 2007; 87: 14-17.
86. Gergely PJr, Pullmann R, Stancato C, Otvos LJr, Koncz A, Blazsek A et al. Increased prevalence of transfusion-transmitted virus and cross-reactivity with immunodominant epitopes of the HRES-1/p28 endogenous retroviral autoantigen in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol.* 2005; 116: 124-134.
87. Sospedra M, Zhao Y, zur Hausen H, Muraro PA, Hamashin C, de Villiers EM et al. Recognition of conserved amino acid motifs of common viruses and its role in autoimmunity. *PLoS Pathog.* 2005; 1: 41.
88. Gergely PJr, Blazsek A, Danko K, Ponyi A, Poor G. Detection of TT virus in patients with idiopathic inflammatory myopathies. *Ann N Y Acad Sci.* 2005; 1050: 304-313.
89. Hirata D, Kaneko N, Iwamoto M, Yoshio T, Okazaki H, Mimori A et al. Infection with an unenveloped DNA virus (TTV) associated with non-A to G hepatitis in patients with rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol.* 1998; 37: 1361-1362.
90. Maggi F, Andreoli E, Riente L, Meschi S, Rocchi J, Delle Sedie A et al. Torquetenovirus in patients with arthritis. *Rheumatology* 2007; 46: 885-886.

91. **Miyamoto M, Takahashi H, Sakata I, Adachi Y.** Hepatitis associated aplastic anemia and transfusion-transmitted virus infection. *Intern Med.* **2000**; 39: 1068-1070.
92. **Poovorawan Y, Tangkijvanich P, Theamboonlers A, Hirsch P.** Transfusion transmissible virus TTV and its putative role in the etiology of liver disease. *Hepatogastroenterology.* **2001**; 48: 256-260.
93. **Safadi R, Or R, Ilan Y, Naparstek E, Nagler A, Klein A et al.** Lack of known hepatitis virus in hepatitis-associated aplastic anemia and outcome after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **2001**; 27: 183-190.
94. **Bandinelli M, Pistello M, Maggi F, Fornai C, Freer G, Vatteroni ML.** Molecular properties, biology, and clinical implications of TT virus, a recently identified widespread infectious agent of humans. *Clin Microbiol Rev* **2001**; 14: 98-113.
95. **Okamoto H, Nishizawa T, Takahashi, Asabe S, Tsuda F, Yoshikawa A.** Heterogeneous distribution of TT virus of distinct genotypes in multiple tissues from infected humans. *Virology* **2001**; 288: 358-368.
96. **Leary TP, Erker JC, Chalmers ML, Desai SM, Mushahwar IK.** Improved detection systems for TT virus reveal high prevalence in humans, non-human primates and farm animals. *J Gen Virol* **1999**; 80: 2115-2120.
97. **Okamoto H, Akahane Y, Ukita M, Fukuda M, Tsuda F, Miyakawa Y, et al.** Fecal excretion of a nonenveloped DNA virus (TTV) associated with posttransfusion non-A-G hepatitis. *J Med Virol* **1998**; 56: 128-132.
98. **Kangxian L, Weifang L, Lian Z, Zhiying C.** Epidemiological survey and follow-up of transfusion –transmitted virus after an outbreak of enterically transmitted infection. *J Viral Hepat.* **2000**; 7: 309-312.
99. **Nakagawa N, Ikoma J, Ishihara T, Yasui-KawamuraN, Fujita N, Iwasa M et al.** Biliary excretion of TT virus (TTV). *J Med Virol* **2000**; 61: 462-467.
100. **Emre S, Otlu B, Cankaya C, Doganay S, Durmaz R.** Transfusion-transmitted virus DNA in serum, tear and aqueous humour of patients undergoing cataract operation. *Clin Experiment Ophthalmol.* **2007**; 35: 759-762.
101. **Fornai C, Maggi F, Vatteroni ML, Pistello M, Bandinelli M.** High Prevalence of TT virus (TTV) and TTV-like minivirus in cervical swabs. *J Clin Microbiol.* **2001**; 2022-2024.

102. **Mutlu D, Abacioğlu H, Altunyurt S.** Investigation of transplacental transmission of TT virus in mother-newborn pairs. *Mikrobiyol Bul.* **2007**; 41: 71-77.
103. **Prescott LE, Simmond P.** Global distribution of transfusion-transmitted virus. *N Engl J Med.* **1998**; 339: 776-777.
104. **Tunçbilek S, Coşkun D, Çetinkaya F, Hıznel N, Tahtakılıç P.** İstanbul'da kan donörlerinde TT virusu (TTV) prevalansının araştırılması. *Flora.* **1999**; 4: 273.
105. **Türkoğlu S.** TTV'nin (Transfusion-transmitted virus) farklı hasta gruplarında araştırılması. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Derg.* **2001**; 31: 259-262.
106. **Gürbüz OA, Ülkar GB, Mert A.** Kan vericilerinde ve hepatit B virus DNA, hepatit C virus RNA pozitif hastalarda TT virusunun araştırılması. *İnfeksi Derg.* **2002**; 16: 91-95.
107. **Kocazeybek B.** Etiyolojisi saptanamayan ve klinik olarak posttransfüzyon kuşkululu olgularda TT virusunun araştırılması. *İnfeksi Derg.* **2002**; 16: 151-157.
108. **Arslan H, Ergin F, Özdemir N, Arat Z, Tarakçı Ö.** Hemodiyaliz hastalarında TT virus DNA sıklığının araştırılması. *1. Ulusal Moleküler ve Tamsal Mikrobiyoloji Kongresi.* **2000**; Kapadokya, A37.
109. **Mıstık R, Usta M, Aydın Ö.** Hemodiyaliz, renal transplantiglomerulopati olgularla sağlıklı kişilerde TTV DNA prevalansı. *5. Ulusal Viral Hepatit Sempozyumu.* **2000**; Ankara, B14.
110. **Türkoğlu S, Yılmaz G, Altuğlu İ, Kansak N, Önel D, Bozacı M et al.** HIV seropozitif kişilerde TT virus infeksiyonu prevalansı. *4. Türkiye AIDS Kongresi.* **1999**; Kuşadası, B33.
111. **Tsuda F, Okamoto H, Ukita M, Tanaka T, Akahane Y, Konishi K et al.** Determination of antibodies to TT virus (TTV) and application to blood donors and patient with posttransfusion non to G hepatitis in Japan. *J Virol Methods.* **1999**; 77: 199-206.
112. **Erensoy S.** Hepatit Etyolojisinde Sorgulanan Yeni Viruslar. Tekeli E, Balık İ (Editörler). *Viral Hepatit 2003 içinde 1.baskı.* Ankara, Viral Hepatitle Savaşım Derneği Yayını; **2002**; 269-285.
113. **Koziel MJ, Siddiqui A.** Hepatitis B Virus. In Mandell GL, Bennet JE, Dolin R, ed. *Mandell Douglas and Bennet's Principles and Practice of Infectious Diseases.* 6.th ed. New York, Churchill Livingstone; **2005**; 1864-1890.

- 114.Mıstık R, Balık İ.** Türkiye’de viral hepatitlerin epidemiyolojik analizi. Tekeli E, Balık İ (Editörler). Viral hepatit 2003’te. 1. Baskı. İstanbul, Karakter Color A.Ş. **2003**; 9-55.
- 115.Tabak F.** Virus Hepatitlerinin Epidemiyolojisi. Yücel A, Tabak F (Editörler). Günümüzde Virus Hepatitleri’nde. 2.Baskı. İstanbul Bulaşıcı Hastalıklarla Savaş Derneği. **1998**; 21-30.
- 116.Robinson WS:** Hepadnaviridae: Hepatitis B virus and hepatitis delta virus. Mandeli GL, Douglas RG, Bennett JE (Eds). Principles and Practice of Infectious Disease. 3rd ed. New York, Churchill Livingstone. **1990**; 1204-1231.
- 117.Seeger C, Mason WS.** Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev.* **2000**; 64: 51-68.
- 118.Yenen OS:** Viral hepatitler. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (Editörler) İnfeksiyon Hastalıkları. İstanbul Nobel Kitapevleri Ltd. Şti. **1996**; 641-700.
- 119.Akan E:** Viral hepatitler. Genel ve Özel Viroloji. 3.Baskı, İzmir, Saray Kitapevleri. **1994**; 502-549.
- 120.**http://tr.wikipedia.org/wiki/Hepatit_B_virus.
- 121.Rebecca T, Horvat and Gary E Tegtmeier.** Hepatitis B ve D Viruses. In Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, eds. Manual of Clinical Microbiology 9th ed. Washington, DC, ASM Pres NW. **2009**; 1641-1659.
- 122.Lin KW, Kirchner T.** Hepatitis B. *Am Fam Physician.* **2004**; 69: 75-82.
- 123.Lee WM.** Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med.***1997**; 337: 1733-1745.
- 124.Lok AS, McMahon BJ.** Chronic hepatitis B: update of recommendations. *Hepatology.* **2004**; 39: 857-861.
- 125.Lin YC, Chang MH, Ni YH, Hsu HY, Chen DS.** Long term immunogenicity and efficacy of universal hepatitis B virus vaccination in Taiwan. *J Infect Dis.* **2003**; 187: 134-138.
- 126.Locamini S.** Molecular virology of hepatitis B virus. *Semin Liver Dis.* **2004**; 24: 3-10.
- 127.Lok AS.** Natural history and control of perinatally acquired hepatitis B virus infection. *Dig Dis.* **1992**; 10: 46-52.

- 128.Lok AS.** Hepatitis B infection: pathogenesis and management. *J Hepatol.* **2000**; 32: 89-97.
- 129.Robinson WS.** Hepatit B virus and Hepatitis D virus. In G.L. Mandell, J.E. Bennett ve R. Dolin (ed.), Principles and Practice of Infectious Disease. Churchill Livingstone, New York. N.Y. 1652-1685.
- 130.Kıyan M, Taşyaran M.** HBV Enfeksiyonu. Tekeli E, Balık İ (Editörler). Viral Hepatit 2003 içinde. Ankara, **2002**; 85-179.
- 131.Chisari F V.** Cytotoxic T cells and viral hepatitis. *J. Clin. Investig.* **1997**; 99: 1472-1477.
- 132.Nayersina R,Fowler P,Guilhot S,Missale G, Cerny A, Schlicht HJ et al.** HLA A2 restricted cytotoxic T lymphocyte responses to multiple hepatitis B surface antigen epitopes during hepatitis B virus infection. *J Immunol.* **1993**; 150: 4659-4671.
- 133.Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M.** Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science.* **1989**; 244: 359-362.
- 134.Thomas DL, Ray SC, Lemon SM.** Hepatitis C. Mandell, Bennett, & Dolin: Principles and Practice of Infectious Diseases, 6th ed. Churchill Livingstone, **2005**; 132: 1951-1981.
- 135.Ustaçelebi Ş, Us AD.**(Editörler) Genel Viroloji içinde. Ankara **2008**; 29-58.
- 136.John D.Scott, David R. Gretch.** Hepatit C ve G Virüsleri. In Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, eds. Manual of Clinical Microbiology 9.baskı ASM Pres NW, Washington, DC Cilt 2 **2009**; 1437-1452.
- 137.Pozzetto B, Bourlet T, Grattard F, Bonneval L.** Structure, genomic organization, replication and variability of hepatitis C virus. *Nephrol Dial Transplant.***1996**; 11 Suppl 4: 2-5.
- 138.Curry PM, Chopra S.** Acute viral hepatitis. In Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Principle's and practice of Infectious Diseseses, 6th ed. New York, Churchill Livingstone **2005**; 1426-1441.
- 139.**<http://www.who.int/en/>
- 140.Ökten A.** Türkiye'de kronik hepatit, siroz ve hepatosellüler karsinoma etiyolojisi. *Güncel Gastroenterol.* **2003**; 7: 187-191.

141. **Tözün N.** “HCV infeksiyonunun Türkiye açısından önemi” Epidemiyoloji ve projeler. Çakaloğlu Y (Editör). *Hepatit C Güncelleme Toplantısı Konuşma Metinleri İçinde*. İstanbul: Türk Karaciğer Araştırmaları Derneği, 2008; 1-3.
142. **Lavanchy D.** The global burden of hepatitis C. *Liver Int.* 2009; 1: 74-81.
143. **Alter MJ.** Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol.* 2007; 13: 2436-2441.
144. **Frank C, Mohamed MK, Strickland GT, Lavanchy D, Arthur RR, Magder LS et al.** The role of parenteral antischistosomal therapy in the spread of hepatitis C virus in Egypt. *Lancet.* 2000; 355: 887-891.
145. **Barut H Ş, Günal Ö.** Dünyada ve Ülkemizde Hepatit C Epidemiyolojisi *Klinik Dergisi* 2009; 22: 38-43.
146. **Mistik R.** Türkiye’de Viral Hepatit Epidemiyolojisi Yayınların İrdelenmesi. Tabak F, Balık İ, Tekeli E (Editörler). Viral Hepatit 2007 içinde. Viral Hepatitle Savaşım Derneği, Ankara 2007; 10-50.
147. **Yıldırım B, Barut S, Bulut Y, Yenisehirli G, Ozdemir M, Cetin I et al.** Seroprevalence of hepatitis B and C viruses in the province of Tokat in the Black Sea region of Turkey: A population-based study. *Turk J Gastroenterol.* 2009; 20: 27-30.
148. **Flamm SL, Parker RA, Chopra S.** Risk factors associated with chronic hepatitis C virus infection: limited frequency of an unidentified source of transmission. *Am J Gastroenterol.* 1998; 93: 597-600.
149. **Stramer SL, Glynn SA, Kleinman SH, Strong DM, Caglioti S, Wright DJ et al.** Detection of HIV-1 and HCV infections among antibody-negative blood donors by nucleic acid-amplification testing. *N Engl J Med.* 2004; 351: 760-768.
150. **Terrault NA.** Sexual activity as a risk factor for hepatitis C. *Hepatology.* 2002; 36 Suppl 1: 99-105.
151. **Centers for Disease Control and Prevention.** Recommendations for prevention and control of hepatitis C (HCV) infection and HCV-related chronic disease. *Morb Mortal Wkly Rep.* 1998; 47: 1-34.
152. **Alter MJ, Margolis HS, Krawczynski K, Judson FN, Mares A, Alexander WJ et al.** The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. The Sentinel Counties Chronic non-A, non-B Hepatitis Study Team. *N Engl J Med.* 1992; 327: 1899-1905.

- 153. Jauncey M, Micallef JM, Gilmour S, Amin J, White PA, Rawlinson W et al.** Clearance of hepatitis C virus after newly acquired infection in injection drug users. *J Infect Dis.* **2004**; 190: 1270-1274.
- 154. Poynard T, Bedossa P, Opolon P.** Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet.* **1997**; 349: 825-832.
- 155. Sánchez-Quijano A, Andreu J, Gavilán F, Luque F, Abad MA, Soto B et al.** Influence of human immunodeficiency virus type 1 infection on the natural course of chronic parenterally acquired hepatitis C. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **1995**; 14: 949-953.
- 156. Fattovich G, Giustina G, Degos F, Diodati G, Tremolada F, Nevens F et al.** Effectiveness of interferon alfa on incidence of hepatocellular carcinoma and decompensation in cirrhosis type C. European Concerted Action on Viral Hepatitis (EUROHEP). *J Hepatol.* **1997**; 27: 201-205.
- 157. Türkoğlu S.** HCV Enfeksiyonu. Tekeli E, Balık İ (Editörler) Viral Hepatit 2003 içinde. Ankara, **2002**; 183-226.
- 158. Özen H, Koçak N.** Hipertransaminazemiye ve hepatomegaliye neden olan viral hepatit dışı nedenler. *Katkı Pediatr Derg.* **1998**; 19: 661-674.
- 159. Gilbert-Barness E, Barness LA, Farrell PM.** Liver Disease. Clinical Use of Pediatric Diagnostic Tests, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. **2003**; 303-326.
- 160. Ng VL, Balistreri W.** Manifestations of liver diseases. In Nelson Textbook of Pediatrics. (17th. ed.). Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB (eds.). W.B. Saunders Co. Philadelphia. **2004**; 1308-1314.
- 161. Uygun A, Polat Z.** Viral Hepatit Dışı Serum Transaminaz Düzeyinde Artışa Neden Olan Hastalıklar. *Güncel Gastroenteroloji Dergisi.* **2009**; 13/4: 211-224.
- 162. Panteghini M, Bais R, Von Solinge WW.** Enzymes. In Burlis CA, Ashwood ER, Bruns DE. Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. 4th ed. **2009**; 597-644.
- 163. Birben E.** Polimeraz zincir reaksiyonu. *Astım Allerji İmmünoloji.* **2006**; 4: 92-94.
- 164. Arda M.** Hastalıkların Teşhisinde Biyoteknolojik Yöntemlerin Kullanılması. *Kökem Derneği Bilimsel Yayınları.* No: 1, Ankara. **1980**.

165. **Erol İ, Yurtyeri A, Hildebrant G, Kleer J.** Polimeraz Zincir Reaksiyonu. Seminer Notu, yayımlanmamış, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Ankara. **1990.**
166. **Erlich H.A, Gelfand D and Sninsky J.** Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science* **1991**; 252: 1643-1651.
167. **Aldemir OS. ve Uçan US.** Polimeraz Zincir Reaksiyonu, Temel Prensipler. *Hayvancılık Araştırma Dergisi.* **2001**; 11: 53-59.
168. **Caner V. ve Çarlı KT.** Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Bazı Tavuk İnfeksiyonlarındaki Yeri. *UÜJ Fac Vet Med.* **2001**; 20: 137-145.
169. **Heid C A, Stevens J, Lıvak KJ, Williams PM.** Real-time quantitative PCR. *Gen Res.* **1996**; 6: 986-994.
170. **Grove DS.** Quantitative real-time polymerase chain reaction for the core facility using Taqman and the Perkin-Elmer/Applied Biosystems Division 7700 Sequence Detector. *J Biomol Tech.* **1999**; 10: 11-16.
171. **Kubista M, Andrade, J.M, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K et al.** The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med.* **2006**; 27: 95-125.
172. **Morris T, Robertson B, Gallagher M.** Rapid reverse transcription PCR detection of hepatitis C virus RNA in serum by using the TaqMan fluorogenic detection system. *J Clin Microbiol.* **1996**; 34: 2933-2936.
173. **Sayitoğlu MA.** Hematoloji'de Real Time PCR. Temel Moleküler Hematoloji Kursu. **2005**; Mersin, 20-22.
174. <http://www.fatih.edu.tr/~abasiyanik/mfarg.htm>
175. **Huang CH, Zhou YS, Chen RG, Xie CY, Wang HT.** The prevalence of transfusion transmitted virus infection in blood donors. *World J Gastroenterol.* **2000**; 6: 268-270.
176. **Dai CY, Yu ML, Chuang WL, Lu SN, Wang JH, Huang JF et al.** The epidemiology of TT virus (TTV) infection in a hepatitis C and B virus hyperendemic area of southern Taiwan. *Kaohsiung J Med Sci.* **2000**; 16: 500-509.
177. **Gülsoy Ö, Kocazeybek B, Tulgar B, Ayyıldız A.** Sağlıklı (Non A-C) ve Ko-enfeksiyonlu (HBV ve/veya HCV Seropozitif) Kan Donörlerinde Transfusion Transmitted Virusu (TTV) varlığının Araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.* **2003**; 33: 74-79.

178. **Mubarak SA, Facharzt MBBS, Elnazer AM, Alzaabi AS, Elkoush AA, Islam AA.** Transfusion transmitted virus in screened United Arab Emirates blood donors. *Saudi Med J.* **2006**; Vol. 27: 58-62.
179. **Savaş MC, Güney C, Kadayıfçı A, Balkan A, Koruk M, Kubar A et al.** High prevalence of transfusion-transmitted virus infection in patients with chronic liver diseases in an endemic area of hepatitis B and C virus. *Med Princ Pract.* **2003**; 12: 176-179.
180. **Chattopadhyay S, Das BC, Gupta RK, Kar P.** Presence of TT virus infection in chronic hepatitis patients from a hospital in New Delhi, India. *Indian J Med Res.* **2005**; 29-33.
181. **Asim M, Singla R, Gupta RK, Kar P.** Clinical & molecular characterization of human TT virus in different liver diseases. *Indian J Med Res.* **2010**; 545-554.
182. **Lee MC, Wang LY, Lin HH, Lin TY, Hu CT, Wang CH et al.** Transfusion-transmitted Virus Infection in Renal Transplant Recipients in Eastern Taiwan. *Tzu Chi Med J.* **2006**; 18: 427-431.
183. **Niel C, Saback FL, Lampe E.** Coinfection with multiple TT virus strains belonging to different genotypes is a common event in healthy Brazilian adults. *J Clin Microbiol.* **2000**; 38: 1926-1930.
184. **Abe K, Inami T, Asano K, Miyoshi C, Masaki N, Hayashi S et al.** TT virus infection is widespread in the general populations from different geographic regions. *J Clin Microbiol.* **1999**; 37: 2703-2705.
185. **Prescott LE, MacDonald DM, Davidson F, Mokili J, Pritchard DI, Arnot DE et al.** Sequence diversity of TT virus in geographically dispersed human populations. *J Gen Virol.* **1999**; 80: 1751-1758.
186. **Vasilyev EV, Trofimov DY, Tonevitsky AG, Ilinsky VV, Korostin DO, Rebrikov DV.** Torque Teno Virus (TTV) distribution in healthy Russian population. *Viol J.* **2009**; 6: 134.
187. **Artini M, Cariani E, Almerighi C, Fulco M, Rossini A, Pietropaolo L et al.** Prevalence and genomic variability of transfusion transmitted virus in Italian cryptogenic chronic liver disease and healthy blood donors. *Dig Liver Dis.* **2002**; 34: 570-576.
188. **Zandieh T, Babaahmadi B, Pourfathollah A, Galedari H, Emam J, Jalalifar MA.** Transfusion Transmitted virus (TTV) infection in Thalassemic patients. *Iranian J Publ Health.* **2005**; 34: 24-28.

- 189. Muljono DH, Nishizawa T, Tsuda F, Takahashi M, Okamoto H.** Molecular epidemiology of TT virus (TTV) and characterization of two novel TTV genotypes in Indonesia. *Arch Virol.* **2001**; 146: 1249-1266.
- 190. Nikolai V Naoumov, Elena P Petrova, Mark G Thomas, Roger Williams.** Presence of a newly described human DNA virus (TTV) in patients with liver disease. *Lancet* **1998**; 352: 195-197.
- 191. Hafez MM, Shaarawy SM, Hassan AA, Salim RF, Abd El Salam FM, Ali AE.** Prevalence of transfusion transmitted virus (TTV) genotypes among HCC patients in Qalubia governorate. *Virologia*. **2007**; 4: 135.
- 192. Hekmatdoost A, Ghaziani T, Esteghamathanzaie F, Alavian S, Mohaghegh H, Zali M.** Transfusion transmitted virus and autoimmune hepatitis. Is there any association? *Saudi Med J.* **2004**; 25: 1760-1761.

8.EKLER