

**T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HEPATİT-B'Lİ, HEPATİT-C'Lİ VE NORMAL
HEMODİYALİZ HASTALARINDA PCR
YÖNTEMİ İLE Transfusion Transmitted Virus
(TTV) PREVALANSI**

**Nihat KAYALAROĞLU
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GEBZE
2006**

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HEPATİT-B'Lİ, HEPATİT-C'Lİ VE NORMAL
HEMODİYALİZ HASTALARINDA PCR
YÖNTEMİ İLE Transfusion Transmitted Virus
(TTV) PREVALANSI

Nihat KAYALAROĞLU
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. İ. Yavuz SEZEN

GEBZE
2006

ÖZET

TEZ BAŞLIĞI: HEPATİT-B'Lİ, HEPATİT-C'Lİ VE NORMAL HEMODİYALİZ HASTALARINDA PCR YÖNTEMİ İLE Transfusion Transmitted Virus (TTV) PREVALANSI

YAZAR ADI: Nihat KAYALAROĞLU

Transfusion Transmitted Virus (TTV), 1997'de bulunan, HBV, HCV gibi hepatitle ilgili olduğu düşünülen bir DNA virüsüdür. Bu çalışmada, üç farklı hemodiyaliz merkezindeki hemodiyaliz (HD) hastaları dört gruba ayrılmıştır; Hepatit-B (HBV)'li, Hepatit-C (HCV)'li, Hepatit-B ve C'nin her ikisini de taşıyan ve normal (Hepatit-B ve Hepatit-C'nin her ikisini de taşımayan). HD hastalarına ait kan serumu örneklerindeki TTV DNA varlığı, viral genomun UTR (Untranslated Region) bölgesine özgün primerler kullanılarak PCR yöntemi ile test edildi. Ellibeş HD hastasının 23'ünde TTV DNA tespit edildi. TTV DNA bulunmasıyla, cinsiyet, yaş, diyaliz süresi ve ALT (alanin transaminaz) miktarı arasında bir korelasyon bulunamadı. TTV hakkında yapılacak olan daha kapsamlı çalışmalar, Türkiye'de bu virüsün prevalansını ortaya koyacaktır.

SUMMARY

**TITLE OF THE THESIS: TRANSFUSION TRANSMITTED VIRUS (TTV)
PREVALENCE THROUGH PCR METHOD IN
HEMODIALYSIS PATIENTS WITH HEPATITIS-
B AND HEPATITIS-C**

AUTHOR: Nihat KAYALAROĞLU

Transfusion Transmitted Virus (TTV), found in 1997, is considered to be a possible hepatitis-related DNA virus. In this study, hemodialysis (HD) patients at three different hemodialysis centers were classified into four groups; patients with hepatitis-B (HBV), with hepatitis-C (HCV), with both HBV and HCV and with neither. Serum samples from HD patients were assayed for the presence of TTV DNA by PCR using primer sets specific for the untranslated region (UTR) of the viral genome. TTV DNA was detected in 23 of the 55 HD patients tested. No correlation was observed between the TTV DNA presence and the patient's gender, age, serum ALT (alanine transaminase) level or dialysis period. More extensive research on TTV will contribute to explain the prevalence of this virus in Turkey.

TEŞEKKÜR

Öncelikle bu tezimin gerçekleştirilmesi sürecinde beni bilgi birikimi ve tavsiyeleriyle yönlendiren çok yakın ilgi ve desteğini gördüğüm hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. İ.Yavuz SEZEN'e,

Tez çalışması sırasında gerekli materyallerin toplanmasında büyük kolaylıklar sağlayan Başkent Üniversitesi Hemodiyaliz Ünitesi, Göztepe SSK Hemodiyaliz Ünitesi ve Haydarpaşa Numune Hastanesi Hemodiyaliz Ünitesinde çalışan tüm yetkililere,

Çalışmalarım sırasında uygun bir çalışma ortamı sağlayan Dr. Vedat KÖKSAL'a tüm yoğun çalışma tempom içinde bana destek olan ailem, mesai arkadaşlarım Zafer ÖZTEN, Hasan ÇAĞLAR, Barbaros KAYNAR ve Hüseyin ERSAN'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iv
SUMMARY	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Viral Hepatitler	1
1.1.1. Hepatotropik Etkenler	2
1.1.2. Hepatotropik Olmayan Etkenler	5
1.1.3. Yeni Bulunan Etkenler	5
1.1.3.1. Hepatit G Virüsü (HGV)	6
1.1.3.2. Transfüzyon Sonrası Hepatit	6
2. KONU İLE İLGİLİ YAPILAN ÇALIŞMALAR VE YAYINLAR	8
2.1. Transfusion Transmitted Virus TTV	8
2.1.1. TTV'nin Genel Özellikleri	8
2.1.2. TTV Genomu ve Klonlanması	9
2.1.3. TTV'nin Sınıflandırılması	11
2.1.4. TTV'nin Yayılışı	13
2.2. Çalışmanın Amacı	23
3. MATERYAL VE METOT	24
3.1. Çalışmada Kullanılan Stok Çözeltiler Ve Tampon Sıvılar	24
3.2. TTV DNA Ekstraksiyonu	26
3.3. Çoğaltma (PCR) İşlemi	27
3.4. PCR Ürünlerinin İncelenmesi	28
3.5. TTV DNA Çalışmasında Kullanılan Laboratuvar Cihazları	28
3.6. TTV DNA Çalışmasında Kullanılan Kimyasal Maddeler	29
4. BULGULAR	30

5. TARTIŞMA VE SONUÇ	37
KAYNAKLAR	45
ÖZGEÇMİŞ	59

SİMGELER VE KISALTMALAR

ALT	: Alanin Transaminaz
Angi-HBc	: Hepatit B virüsü çekirdek Antijenine Karşı Antikor
Anti-HCV	: Hepatit C virüsüne karşı Antikor
Anti-TTV	: TT virüsüne karşı Antikor
CMV	: Cytomegalovirus
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
EBV	: Epstein Barr virüsü
HAV	: Hepatit A virüsü
HBsAg	: Hepatit B virüsü yüzey antijeni
HBV	: Hepatit B virüsü
HCV	: Hepatit C virüsü
HD	: Hemodiyaliz
HDV	: Hepatit D virüsü
HEV	: Hepatit E virüsü
HGV	: Hepatit G virüsü
HIV	: Human immun deficiency virus (İnsan immün yetmezlik virüsü)
HSV	: Herpes Simpleks virüsü
IFN	: İnterferon
ORF	: Open Reading Frame (Açık Okuma Penceresi)
nm	: Nanometre
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RDA	: Representational Difference Analysis
RNA	: Ribonükleik Asit
RT-PCR	: Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyon
TTV	: TT virüsü (Transfusion Transmitted Virus)
VZV	: Varicella Zoster Virus

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. TTV Genomu	10
2.2. TTV ile hemodiyaliz süresi ve kan transfüzyonu arasındaki prevalans	14
2.3. TTV'nin Farklı Genotiplerinin dünya üzerindeki yayılışı	22
4.1. Hastalarda TTV gösteren %1.5 agaroz gel fotoğrafı	30

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. TTV, B19, CAV virüslerinin bazı özelliklerinin karşılaştırılması	12
2.2. Post-transfüzyon hepatitli hastalarda TTV DNA'nın tespiti	19
2.3. Çeşitli ülkelerdeki TT virüsü prevalansları	21
2.4. TTV'nin Türkiye'deki durumu	22
4.1. Hemodiyaliz hastalarında TTV DNA pozitifliğinin cinsiyete göre dağılımı	31
4.2. Hemodiyaliz hastalarında TTV DNA pozitifliğinin yaşa gruplarına göre dağılımı	32
4.3. Hemodiyaliz hastalarında hepatit B ve hepatit C taşıyıcılık durumuna göre TTV DNA pozitifliğinin dağılımı	33
4.4. Hemodiyaliz hastası olan hepatit-B, C ve normal kişilerde ALT enzim miktarının dağılımı	34
4.5. Diyaliz süresi ile TTV DNA ve HCV RNA arasındaki ilişki	35
4.6. TTV DNA ile serum ALT arasındaki ilişki	36
4.7. Farklı diyaliz ünitelerinde TTV'nin dağılımı	36

1. GİRİŞ

Günümüzde hepatit hastalığı toplumda çok yaygın olarak görülmektedir. Hepatit etkenlerinin en önemli tahribat yaptığı organ karaciğerdir. Karaciğer, vücudumuzda yüzlerce çok önemli metabolik olayın gerçekleştirilmesinde rol oynamaktadır. Dolayısıyla bu organın zarar görmesi insan sağlığı için birçok problemi beraberinde getirir ve bazı bireylerde ölüme neden olabilir.

Hepatite neden olan birçok etken bulunmaktadır. Aşağıda bunlardan bazılarını kısaca değinilmiştir. Ancak birçok hepatit vakasındaki nedeni hala bilemiyoruz. Moleküler biyolojideki gelişmeler ve yapılan yoğun araştırmalar ışığında her geçen gün hepatite neden olduğu düşünülen yeni etkenler ortaya konulmaktadır. Bu etkenler içinde araştırmacıların en son dikkatini çeken “Transfusion Transmitted Virus (TTV)”tür. Genel olarak, diğer hepatit virüslerinde olduğu gibi bu virus de çeşitli yollarla taşınabilmektedir.

1.1. Viral Hepatitler

Viral hepatit karaciğer inflamasyonuna yol açan viral etkenlerle ortaya çıkar. Viral hepatite sebep olan etkenler hepatotropik ve hepatotropik olmayan şeklinde iki gruba ayrılır. Major etkenler primer olarak hepatositleri tutan hepatotropik virüslerdir. Bunlar Hepatit A Virüsü (HAV), Hepatit B Virüsü (HBV), Hepatit C Virüsü (HCV), Hepatit D Virüsü (HDV), Hepatit E Virüsü (HEV) ve Hepatit G Virüsüdür (HGV) (Simmonds et al., 1998). Hepatotropik olmayan viral hepatit etkenleri ise sekonder olarak hepatositleri infekte eden Sitomegalovirus (CMV), Varisella Zoster Virus (VZV), Epstein Barr Virus (EBV), Herpes Simpleks Virus (HSV), Cocksackievirus, Rubella ve Sarı Humma virüsleridir (Akbulut, 1998).

Viral Hepatitler, 450 milyon HBV taşıyıcısı, 100 milyon HCV taşıyıcısı bulunması, kronikleşmesi ve ciddi boyutlarda ölüme yol açan hepatosellüler

karsinomayla ilişkisi ve de ekonomik açıdan büyük problemler yaratması sebepleriyle dünyanın en önemli sağlık sorunlarından (Dündar, 1998). Viral hepatitin klinik tabloları, etkenin nitelikleri ve konağın bağışıklık durumu ile ilgili olarak akut, kronik hepatitten, taşıyıcılığa ve karaciğer karsinomuna kadar çok değişkendir. Temelde, halsizlik, iştahsızlık, bulantı, kusma ve sarılık gibi karaciğer inflamasyonuna bağlı belirtilerle karakterizedir (Sherman and Finlayson, NDC et al., 1982).

1.1.1. Hepatotropik Etkenler

1.1.1.a. HAV: Tüm dünyada yaygın olarak görülen, fekal-oral yolla bulaşan, kronikleşmeyen, taşıyıcılığı olmayan ve genellikle sakin seyirli bir enfeksiyon hastalığına yol açmaktadır.

Bulaşma Yolları: Kişiden kişiye geçiş, genellikle aile içinde olduğu gibi çok yakın temasla sınırlıdır.

Besinler ve su yolu ile bulaşma; özellikle gelişmekte olan ülkelerde kanalizasyon sistemlerinin yeterince düzenli olmaması ve su temininin uygun şekilde yapılamaması bu yolla bulaşımı ön plana çıkartmaktadır. Yine çiğ süt, pasta, çilek, hamburger, krema, salata, portakal suyu gibi yiyecekler de bulaşma araçlarını teşkil eder (Akbulut, 1998).

Parenteral yolla bulaşma; Hepatit-A sarılığın başlamasından hemen önce viremi oluşturduğu için bu dönemde, kan verilirse, yüksek olasılıkla hastalığın başlamasına yol açar. HAV'ın biyolojik özelliğinden yani kılıfsız virüs olmasından dolayı çözücüler, dezenfektanlar gibi sıklıkla kullanılan yöntemlerle inaktive olmazlar, bu nedenle HAV vericilerinden faktör, plazma ve diğer kan ürünleri alıcılarına geçebilir.

1.1.1.b. HBV: DNA virüsüdür ve kronikleşebilen, kronik olgularda ve taşıyıcılıkta siroz ve hepatosellüler karsinomaya yol açabilen önemli bir enfeksiyon hastalığına neden olmaktadır. HBV parenteral, perinatal-vertikal, horizontal yolla ve cinsel temas yoluyla bulaşabilmektedir. Tedavide

interferon (IFN) kullanılabilmektedir ve aşısı vardır (Balık, 1998). Oldukça kısa olan genomu çember şeklinde ve kısmen çift sarmallı olup, 3200 nükleotidden oluşur. HBV-DNA'sının çember şeklindeki yapısal bütünlüğü, her iki zincirin 5' uçlarından birbirine tutunması ile gerçekleşir. HBV, yaklaşık 42 nm büyüklüğünde küresel bir partikülden ibarettir. Bu partikülün dış yüzeyi yaklaşık 7–8 nm genişliğinde bir kılıf ile kaplıdır. Bu zarf yüzey antijeni (HBs-Ag) protein ve glikoproteinleri ile hücrel lipitleri içerir.

HBV'nin serum içerisindeki 30–32°C de saklandığında 6 ay süre ile ve –20°C de dondurulduğunda ise yıllarca insanlar için infekte edici özelliğini koruduğu tespit edilmiştir. Yine serum içerisinde 60°C de 4 saat süre ile inaktive olmadığı saptanmıştır. Buna karşılık albümin içerisinde 60°C de 10 saat sonra infeksiyöz özelliğini kaybeder. Öte yandan kuru sıcak ile 160°C de 1 saatte ve serum içerisinde iken 90°C de 1-20 dk içinde inaktive olur (Simmonds et al., 1998; Mutlu et al.,1999; Gürakar, 2000).

Bulaşma yolları: Perkütan bulaşma; virüsün perkütan inokülasyonu, kan ve kan ürünlerinin transfüzyonu, hemodiyaliz, endoskopi, yapay solunum cihazı gibi aletlerin kullanımı, aynı enjektörün farklı bireylerde kullanımı ile bulaşma olur (Taşyaran, 1998).

Cinsel temasla bulaşma; homoseksüeller arası cinsel temas, HBV için en riskli seksüel bulaşma yoludur. Rektal mukoza mikrotravmalarına bağlı infekte kan veya infekte semen teması riski artırmaktadır. Heteroseksüel yolla bulaşmada HBV taşıyıcılarının eşleri en çok tehlike altında olanlardır.

Perinatal bulaşma; taşıyıcı annenin perinatal dönemde enfeksiyonu bebeğine geçirme olasılığı %40-50'dir. Anneden çocuğa bulaşma, doğum esnasında veya doğumdan sonra oluşabilen deri ve mukoza sıyrıklarının infekte maternal sıvılara teması, vajinal kanaldan geçiş sırasında anne kanının yutulması, sezaryen sırasında anne kanıyla temas veya plasenta hasarı sonucu maternal dolaşımın fetal dolaşıma karışması gibi nedenlerle meydana gelir (Simmonds et al., 1998; Taşyaran, 1998).

Horizontal bulaşma; HBV'nin hepatositler yanı sıra perifer kan mononükleer hücrelerinde de replike olabilme yeteneğinin olması nedeniyle, çok küçük miktarlardaki infekte kanın, infekte kişilerle cinsellik içermeyen yakın temastaki bireylerin hasarlı derileriyle temasının horizontal bulaşmaya yol açabileceği düşünülmektedir (Sherman, 1982; Akkız, 1998).

1.1.1.c. HCV: Parenteral yollarla bulaşan bir RNA virüsüdür ve yüksek oranda kronikleşen bir enfeksiyona yol açmaktadır. HCV enfeksiyonunun α -IFN ile tedavisi mümkündür, ancak başarı oranı düşüktür. Aşı geliştirme çalışmaları devam etmektedir. Non A-non B hepatitlerinin %95 sebebi olan HCV özellikle sağlık personeli, kan ürünleri alıcıları, hemodiyaliz uygulanan hastalar, intravenöz ilaç bağımlılarında sık görülmektedir. Anti-HCV tarama testleriyle bu oran azaltılmıştır. Genel olarak 6 aydan uzun süreli alanin transaminaz (ALT) yüksekliği ile birlikte Anti-HCV pozitifliği kronik hepatit C tanısı için yeterlidir. Anti-HCV pozitifliği ile viremi arasında iyi bir korelasyon olmasına rağmen, gerekli hallerde HCV-RNA tayini ile tanı teyit edilir ve viremi gösterilir (Akkız, 1998).

Bulaşma yolları: Parental bulaşma; HCV'nin enfekte hastadan sağlık çalışanına bulaşması dökümanite edilmiştir. Kan ve kan ürünü transfüzyonu ile de HCV bulaşabilmektedir. HCV, non-disposable iğneler ve şırıngaların kullanılması veya geleneksel sağlık teknikleri ile, örneğin akupunktur gibi, iatrojenik olarak bulaşabilmektedir. İntravenöz ilaç kullanım süresi ile seropozitiflik arasında önemli bir paralellik vardır.

Cinsel yolla bulaşma; cinsel yolla bulaşan viral hastalık riski yüksek gruplarda HCV enfeksiyonu prevalansı da artmıştır. Yüksek risk gruplarında HCV enfeksiyonu prevalansı cinsel yolla bulaşan diğer hastalıklara kıyasla daha düşük bulunmaktadır (Akkız, 1998).

Perinatal bulaşma; HCV'nin anneden yeni doğana vertikal geçişi söz konusudur. Dolaşımda yüksek titrede HCV-RNA taşıyan anneler çocuklarını enfekte etmektedirler. HCV'nin anneden bebeğe vertikal bulaşması HBV'ye kıyasla oldukça düşük orandadır (Akkız, 1998).

1.1.1.d. HDV: Defektif bir RNA virüsü olan HDV, enfeksiyon için HBV'ye ihtiyaç duymaktadır. Akut hepatit D'nin spesifik bir tedavisi olmadığı gibi, HDV için ayrı bir aşı da yoktur. Hepatit B aşısı kullanılarak, HBV enfeksiyonunun önlenmesiyle HDV enfeksiyonundan korunulabilmektedir (Leblebicioğlu,1998; Eroğlu, 1998). HDV enfeksiyonlu hastalarda karaciğer hastalığının yanı sıra hepatoselüler karsinoma da gelişebilmektedir. Ancak bunun, karaciğerde HBV enfeksiyonu da bulunduğu için hangisine ait olduğu tam açık değildir (Eroğlu, 1998).

1.1.1.e. HEV: HEV genomu tek sarmallı RNA virüsüdür. Fekal-oral yolla bulaşan non A-non B hepatitinin en önemli nedeni olan virüstür. Mortalite oranı gebelerde yüksektir. Spesifik tedavisi yoktur ve aşı çalışmaları devam etmektedir (Aydın, 1998).

Bulaşma yolları: HEV'nin esas bulaşma yolunun fekal-oral olduğunun bilinmesinin yanında son yıllarda yapılan çalışmalarda transfüzyonal bulaşın olabileceğine dair çalışmalar mevcuttur. Hastalık daha çok genç ve orta yaş grubunda görülmekte, çocuk ve yaşlılarda daha nadir rastlanmaktadır (Sherman, 1998).

1.1.2. Hepatotropik Olmayan Etkenler

Major hepatotropik virüslerden başka, viral hepatite nadiren de olsa neden olan diğer virüsler de vardır. Bu virüsler sekonder olarak karaciğeri enfekte ederler. Örneğin CMV, EBV, HSV, VZV, Rubella virus, Sarı Humma, Marburg virüsü, Ebola virüsü, Adenovirüs, Coxsackie virüsler (Uzunlamoğlu, 1998; Simmonds, 1998).

1.1.3. Yeni Bulunan Etkenler

Bilinen hepatit virüslerinin (HAV, HBV, HCV, HDV, HEV, HGV) etken olarak gösterilmediği pek çok hepatit vakası bulunmaktadır. HCV ve HBV içermeyen kan ürünleri transfüzyonuyla da transfüzyon sonrası hepatitin meydana gelmesi ve bazı akut hepatit, kronik hepatit, fulminant

hepatit ve siroz vakalarında herhangi bir etiyoloji saptanamamış olması, sorumlu olabilecek başka virüsler olabileceğini göstermektedir. Yapılan çalışmalar sonrasında HGV ve bunu takiben hepatit virüsü olduğu düşünülen TT Virüsü keşfedilmiştir.

1.1.3.1. Hepatit G Virüsü (HGV)

1995'te birbirinden bağımsız iki farklı araştırmacı grubu yeni bir hepatit virüsü bildirmişlerdir (Alter et al.,1997; Linnen et al., 1996). Bir grubun HGV, diğer grubun HGBV-C adını verdikleri bu virüslerin moleküler özellikleri karşılaştırıldığında aynı virüsün farklı izolatları olduğu anlaşılmıştır. HGV ile ilgili henüz cevaplanamamış pek çok soru bulunmaktadır. HGV'nin hepatotropizmi ve karaciğerde replike olup olmadığı henüz tam olarak belirlenememiştir. HGV'nin kan yoluyla bulaştığı bildirilmiştir. HGV'nin cinsel temasla ve anneden bebeğe perinatal yolla bulaşabildiğini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır. HGV' nin enfeksiyon süresi farklılık göstermektedir. Fulminant hepatit nedeni olabileceği konusundaki tartışmalar devam etmektedir. HGV'nin zarf proteinine karşı antikor araştıran anti-E2 ELISA geliştirilmiştir (Tacke et al., 1997).

HGV enfeksiyonu hafif seyretmekte ve bir yıl içinde kendiliğinden iyileşmektedir. HGV'nin karaciğer hastalıklarıyla ilgisi kesin olarak saptanamamıştır. α -IFN tedavisi uygulanmış hastalarda tedavi sonrası cevap alınmış ama tedavi kesilince nüksler görülmüştür (Erensoy, 1998).

1.1.3.2. Transfüzyon Sonrası Hepatit

Transfüzyon sonrası hepatit önemli bir hastalıktır ve buna sebep olan kan veya kan ürünleri hepatite karşı dirençsiz hastalarda enfeksiyona yol açmaktadır. Transfüzyon sonrası hepatit her kan ürünüyle veya kanla bulaşabilmektedir. Donmuş veya yıkanmış kırmızı kan hücrelerinde hepatit bulaşma riskinin hemen hemen yok olduğu iddia edilmekle birlikte bu evrensel bir veri değildir (Sherman et al., 1982).

Transfüzyon sonrası hepatit insidansının azaltılması çalışmalarında büyük ilerlemeler olmuştur. Gönüllü donörlerin kanlarının kullanılması donörlerde HBsAg, Anti-HBc ve Anti-HCV tarama testlerinin yapılmasıyla transfüzyona bağlı HBV ve HCV enfeksiyonu prevalansı çok azalmıştır. Kan donörlerinin HCV için test edilmesi pratik olarak transfüzyona bağlı HCV enfeksiyonunu elimine etmiştir. Kan ve kan ürünlerinde enfeksiyon açısından da sıfır risk yoktur. Çünkü; a- hiçbir test %100 duyarlı değildir, b- ülkeler kendi şartlarına göre düşük insidanslı hastalıkların taramalarını kan merkezlerinde yapmamaktadırlar, c- her geçen gün yeni bir enfeksiyon etkeni saptanmaktadır. Halen tanımlayamadığımız mikroorganizmaların olabileceği düşünülmektedir (Gürakar, 2000).

Transfüzyon sonrası hepatiti engellemek için sorumlu etken bulunana kadar alanin transaminaz (ALT) aktivitesi artmış olan donörün kabul edilmemesi yoluyla bu riskin azaltılabileceği düşünülmektedir. Transfüzyon sonrası hepatit etkenleri araştırılırken Transfusion Transmitted Virus (TTV) adında yeni bir virüs saptanmıştır (Nishizawa et al,1997).

2.KONU İLE İLGİLİ YAPILAN ÇALIŞMALAR VE YAYINLAR

2.1. Transfusion Transmitted Virus (TTV)

2.1.1. TTV' nin Genel Özellikleri

TTV DNA ilk defa transfüzyon sonrası hepatitli bir hastanın serumunda bulunmuştur (Nishizawa et al., 1997). Bu hastanın karaciğerindeki TTV DNA miktarı serumdakinin 10–100 katı bulunmuştur. Bu veri, TTV replikasyonunun ve enfeksiyonunun karaciğerde olduğunu düşündürmektedir. TTV'nin hepatopoetik hücrelerde de görüldüğü tesbit edilmiştir (Liwen et al., 2002). Kedi, köpek, güvercin, maymun gibi farklı canlılarda da bu virüs bulunmuştur (Okamoto et al., 2002).

Viral hepatitler uzun zamandan beri hemodiyaliz (HD) hastalarının önemli bir problemidir. HBV, HCV, HGV ve başka rapor edilen etkenler hepatitte rol oynar. Günümüzde TTV hakkında az bilgiye sahip olduğumuz için, HD hastalarında TTV enfeksiyonunun epidemiyolojisine az önem verilmektedir. TTV, eğer HBV, HCV gibi patojenik bir etken ise biyolojik özelliklerini belirlemek önemlidir.

Farklı populasyonlarda farklı genotipler daha yüksek oranda bulunabilmektedir. Japon populasyonlarında en önemli genotipin G1 olduğu ortaya konulmuştur. Ülkemizdeki araştırmalar bu konuda yeterli veri sağlamamaktadır. Çizelge 2,5'te ülkemizde TTV prevalansı ile ilgili yapılan bazı çalışmalar gösterilmiştir. Yine Japon populasyonlarında TTV, HBV, HCV ve HGV'ye göre daha yüksek oranda bulunmuştur. Post-transfüzyonlu nonA-G hepatitli beş hastanın üçünün serumlarında TTV bulunmuş ve bunların aminotransferaz düzeylerinin de yüksekliği tespit edilmiştir (Okamoto et al., 2002).

Bu veriler araştırmacılara, TTV'nin post-transfüzyon non A-G hepatitten sorumlu yeni bir virüs olabileceğini düşündürmüştür. Çizelge 2.3'te gösterildiği gibi post-transfüzyonlu hastalarda TTV'nin pozitif bulunması genellikle ALT enzim düzeyinin yükselmesiyle ilişkili olsa da, TTV pozitif olduğu durumlarda ALT miktarının düşük olabileceğini de gösteren araştırmalar yapılmıştır (Nishizawa et al., 1997; Oguchi et al., 1999).

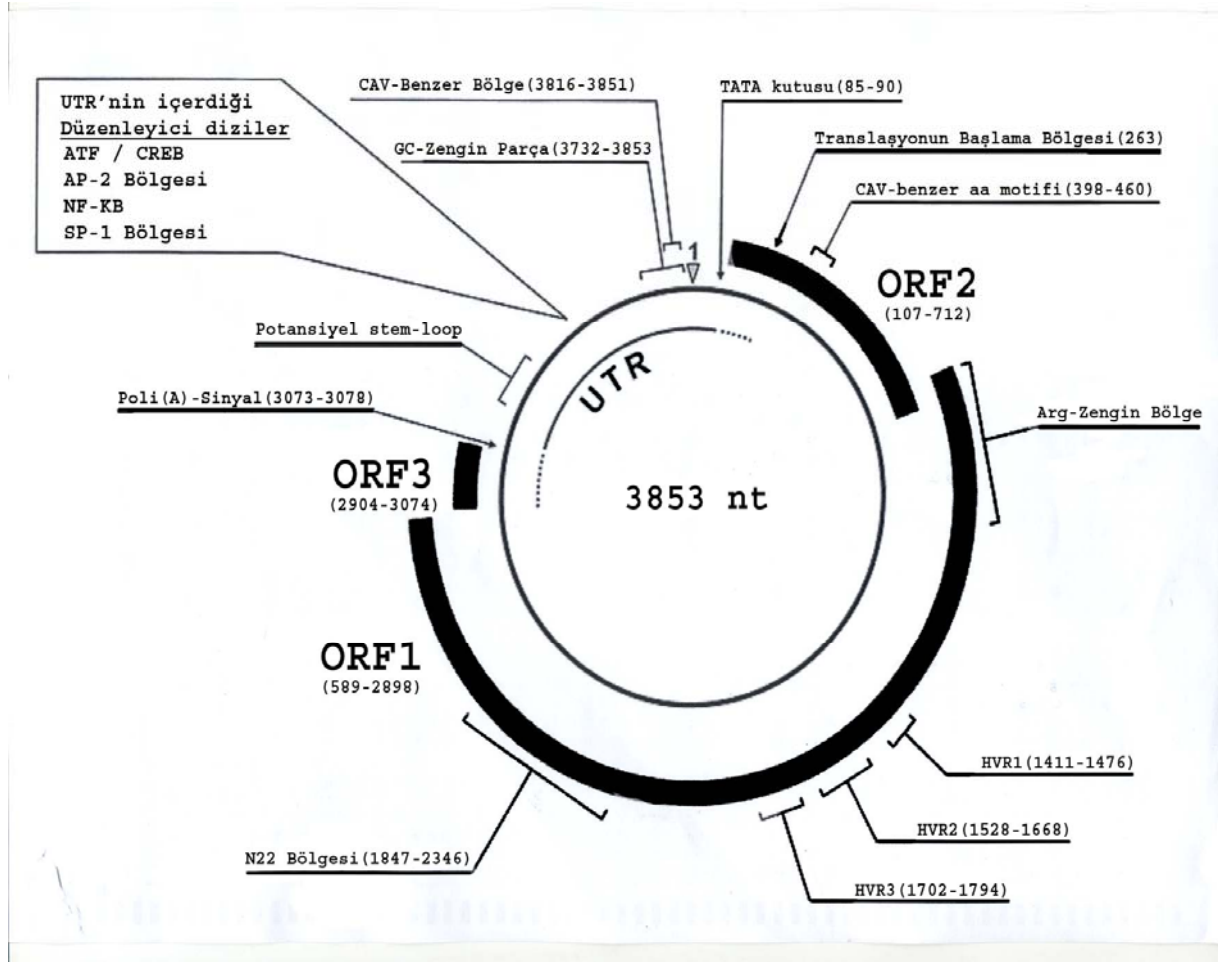
HD hastalarında dünyanın değişik yerlerinde yapılan çalışmalar TTV nin epidemiyolojik ve klinik durumunu tam ortaya koyamamıştır. Naoumov ve ark. (1998), çok sayıda TTV post-transfüzyonlu hastada normal karaciğer fonksiyonu olduğunu göstermiş ve bu hastalarda herhangi bir histolojik problem olmadığını göstermişlerdir.

2.1.2 TTV Genomu ve Klonlanması

TTV, kılıfsız, tek zincirli 3852 nükleotidlik 30–50 nm büyüklüğünde genoma sahip bir DNA virüsüdür. TTV, ilk defa Japonya'da transfüzyon sonrası hepatit etkenleri araştırılırken bilinen nükleik asit dizileriyle çok az homoloji gösteren yeni bir viral klon olarak izole edilmiş, PCR ile bu dizilerin oligonükleotid primerleri belirlenmiştir. Bu virüse, ilk tespit edildiği Japon hastanın ad ve soyadının ilk harfi ile uyumlu olarak TT virüsü ismi verilmiştir. Bu isim aynı zamanda, "Transfusion transmitted" tanımıyla da uyumludur. CsCl deki yoğunluğu 1,31–1,35 g/cm³, süroz gradiyentinde ise 1,26 g/ml olarak belirlenmiştir (Bendinelli et al., 2001).

N22 adı verilen TTV'ye özgü bir klon, RDA (Representational Difference Analysis) tekniğiyle izole edilmiştir (Okamoto et al., 1998b; Cossart, 1998). Bu teknik ile iki DNA populasyonu arasındaki nükleik asit dizi farklılıkları saptanabilmektedir. TTV'nin ilk saptandığı çalışmada araştırmacılar, bir hastanın (ALT düzeyinin pik yaptığı gün ve diğeri bundan iki hafta sonra alınan olmak üzere) iki farklı döneminde alınmış kan serumundaki nükleik asit dizilerini karşılaştırmışlardır. İkinci örnekte, ilk serumda bulunan bir grup nükleik asit dizisi temsil edilmekte olup N22 klonu

bu şekilde elde edilmiştir. Daha sonra, bu klonun ORF'deki nükleotid dizilerinin bugüne kadarki gen bankalarına konulmuş dizilerle benzerlik göstermediği saptanmıştır. Virüsün genomunun DNA ya da RNA mı olduğunu belirlemek için Revers Transkriptaz (RT) uygulanmıştır. Sonuçta post-transfüzyon beş hastadan ikinci, üçüncü ve beşinci hastalarda N22 klonu bulunmuştur.



Şekil 2.1 TTV Genomu

TTV'nin genotipleri hakkında tam bir konsensus yoktur. Otuzdan fazla genotipi bulunmaktadır. Bu genotipler 5 ana grupta toplanabilir. Grup 1'de genotip 1-6 bulunur. 2. grupta ise 7, 8, 17, 22 ve 23 nolu genotipler bulunur. Grup 3 ise 11 genotip içerir bunlar genotip 9-16, 18-20'dir. Grup 4, 9 genotip içerirken; grup 5, 3 tane, yeri tam olarak tespit edilememiş genotip içerir (Nishizawa et al., 1999; Takacs et al., 2003). Dünya üzerindeki en son çalışmalarla, TTV'ye ait yeni genotipler, altgruplar ve TTV'ye benzer yeni

virüsler ortaya çıkartılmaktadır. Ayrıca, araştırmaların büyük bir çoğunluğu TTV'nin replikasyon mekanizmaları, genomdaki özel nükleotid dizileri üzerine yoğunlaşmaktadır (Huang et al., 1998; Vasconcelos et al., 2002; Liu et al., 2002; Szladek et al., 2003; Thom et al., 2003). Bu çalışmalara paralel olarak TTV'ye ait bir gen *E. coli*'de eksprese edilmiştir (Li et al., 2000).

Karaciğer hasarı şiddeti ve interferon tedavisindeki yanıt bu altgruplarla ilişkili olabilir (Tanaka et al., 1999; Okamoto et al., 1998b). TTV genomu yüksek derecede çeşitliliğe sahiptir. TTV'de 3 farklı ORF tespit edilmiştir. ORF1 770 aminoasiti, ORF2 150 aminoasiti kodlar ve bunlara ek olarak 57 aminoasit kodlama kapasiteli olan ORF3 bulunur.

Türkiye'de TTV genotiplerinden %35,9 u G1, %64,1 G2C olarak bulundu. Farklı genotipler arasında %60–72 arasında benzerlik görüldü. Alt tipler arasında homoloji %85–90 olarak rapor edildi. Benzer altgruplar arasında %93 ve daha fazla benzerlik olduğu saptandı (Erensoy et al., 2002).

2.1.3 TTV'nin Sınıflandırılması

Günümüzde, akut ve kronik hepatitlerde etiyolojiden sorumlu olası viral ajanların araştırılması, moleküler biyolojik yöntemlerle gerçekleştirilmektedir. Şimdiye kadar elde edilen bilgilerle TTV sınıflandırılmamıştır (Cossart, 2000). Kılıfsız ve tek sarmallı olmasından dolayı Parvo virüslere benzetilse de genomik yapısının sirküler olması, viryon büyüklüğü (TTV: 30 – 50 nm, Parvovirüsler: 18 – 20 nm), CsCl'deki yoğunluğu (TTV: 1,31 – 1,35 g/cm³, Parvovirüsler: 1,39 – 1,42 g/cm³) ve dizi özdeşliğinin olmaması TTV'nin parvovirus ailesine katılmasını engellemektedir. Aşağıdaki çizelge 2.1'de, TTV'nin, CAV, B19 virüsleri ile karşılaştırılması gösterilmiştir. Bu virüsler TTV'ye özellikleri açısından en yakın virüslerdir.

Çizelge 2.1 TTV, B19, CAV virüslerinin bazı özelliklerinin karşılaştırılması

Özellik	B19	CAV	TTV
Virion Yapısı	Zarfsız İzometrik Nükleokapsit	Zarfsız İzometrik Nükleokapsit	Parvovirüs ve Circovirüs benzeri
Boyut (nm)	18–22	23–25	30–50
Simetri	İkozahedral	İkozahedral	İkozahedral
Stabilite	Solventlere, kuru ısıya ve düşük pH'a dirençli	Solventlere, kuru ısıya ve düşük pH'a dirençli	Solventlere, kuru ısıya ve düşük pH'a dirençli
Genom	Tek zincirli	Tek zincirli	Tek zincirli
En Büyük Proteinin izoelektrik noktası	6.17 (VP1)	11.02 (VP1)	10.52 (ORF1)
CsCl' deki yoğunluk	1.38–1.51	1.33–1.34	1.31–1.35

TTV, negatif sarmallı sirküler DNA genomu ve CsCl'deki yoğunluğu (Circovirüsler: 1,33–1,37 g/cm³) ile Circovirus ailesine daha yakındır. Ancak bu aileye de partiküllerinin büyüklüğü (Circovirüsler: 15–22 nm) ve dizi benzerliklerinin olmaması sebebiyle katılamamaktadır (Okamoto et al., 1998b; Mushahwar et al., 1999). Buna göre, bazı araştırmacılar, bu yeni virüsün bulunduğu ailenin Circinovirüs ismini almasını önermişlerdir (Mushahwar et al., 1999).

2.1.4. TTV' nin Yayılışı

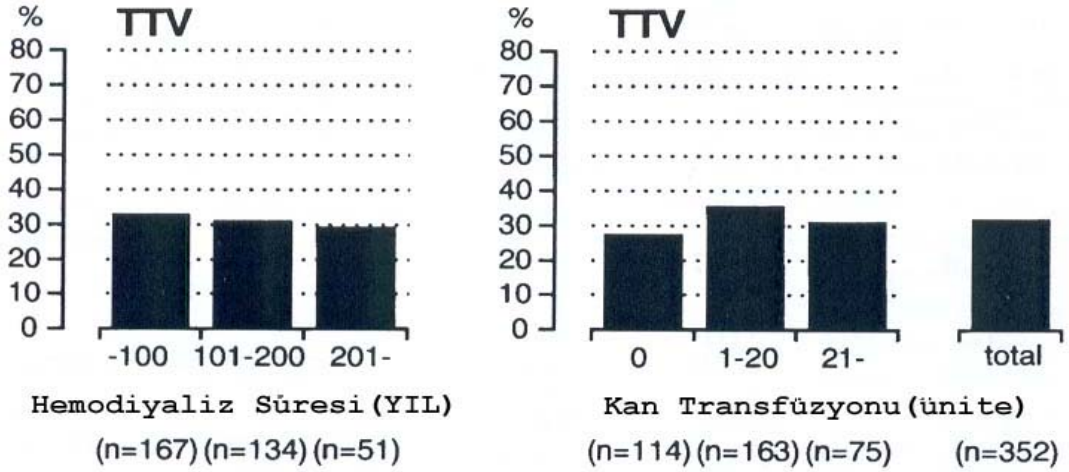
TTV ile ilgili ilk çalışmalarda kan alan kişilerde virüs sık görülmüştür. Bundan dolayı virüsün kan komponentlerinin transfüzyonuyla taşınabileceği akla gelmiştir. Pıhtılaşma faktörleri olan faktör8, faktör9 ve immunoglobulin preparatlarında TTV DNA ortaya çıkartılmıştır. Ancak, Azzari ve ark. (2001), yaptıkları çalışmalarda bu preparatlarda TTV'ye rastlamamışlardır.

TTV, HBV ve HCV gibi parenteral yollarla taşındığı düşünülmektedir. Bütün kronik HD hastalarının ve plazmasında virüs bulunan kişilerin hepsinin periferik mononükleer kan hücrelerinde TTV'nin bulunduğu gösterildi (Fodor et al., 2002). Parenteral bulaşma yönünden riskli gruplarda TTV-DNA yüksek bulunmuştur (Kanda et al., 1999; Stinissen et al., 1997; Tanaka et al., 1998; Sugiyama et al., 1999).

Bazı araştırmacılar, TTV'nin periferik mononükleer kan hücrelerinde sıklıkla bulunduğunu tespit etmişlerdir (Zhong et al., 2001). Yapılan başka bir çalışmada, periferik mononükleer kan hücrelerinin %5'inde, karaciğer dokusunun %29'unda bulunmuştur. Kordon kanı mononükleer hücrelerinde ise TTV DNA saptanmamıştır (Okamura et al., 1999). Kemik iliği hücrelerinde replikasyonu tesbit edilmiştir (Mariscal et al., 2002).

TTV'nin parenteral geçiş ile yayılmadığı görüşünü ortaya koyan birçok araştırma yapılmıştır. HD hastalarının TTV pozitif olanlarının %84'üne, TTV negatif olanların ise %63'üne transfüzyon yapılmıştır. Bu durum anlamlı bir sonuç çıkarmamaktadır. Bu araştırmalara göre, HD hastalarında parenteral olmayan yollarla geçiş mümkündür (Kanamoto-Tanaka et al., 2002).

Her iki yolla da TTV'nin yayılabileceğini gösteren çalışmalar yapılmaktadır. HD hastaları kan kaynaklı virüs hastalıkları için yüksek bir risk altındadırlar. TTV enfekte kişilerin dışkılarında da TTV DNA saptanmıştır (Okamoto et al., 1998a; Ukita et al., 1999). Serumda virüs miktarı fazla olan hastalarda TTV dışkıyla atılmaktadır. Bu durum TTV'nin fekal-oral yol ile bulaşabileceğini göstermektedir.



Şekil 2.2. TTV ile Hemodiyaliz Süresi ve Kan Transfüzyonu Arasındaki Prevalans (Oguchi et al., 1999)

Şekil 2.2’de gösterildiği gibi, hiç kan transfüzyonu almamış kan donörlerinde TTV’nin yüksek oranda saptanması, parenteral yolla bulaşma yönünden riskli olmayan kişilerde de enfeksiyonun belirlenmesi ve enfekte kişilerin dışkılarında rastlanması, parenteral olmayan yollarla da bulaşma olabileceğine önemli bir kanıttır (Oguchi et al., 1999).

TTV’nin, nonparenteral olarak cinsel yolla da bulaştığı gösterilmiştir. Bulaşma için uzun süre içerisinde çok temas gerekmektedir. TTV’li kronik karaciğer hastalarının eşleri, erkek eşcinseller, çok sayıda cinsel partner ile temas edenler ve homoseksüeller risk altındadır.

Anneden bebeğe TTV bulaşma ihtimali üzerinde birçok çalışma yapılmaktadır. TTV’nin endemikliğini araştıran bir grup araştırmacı, Kongo Cumhuriyetinde bir klinikte kadınların %58’inde, yeni doğan çocukların %54’ünde TTV DNA tespit etmişlerdir. TTV enfeksiyonunun yeni doğanlarda doğumdan üç ay sonra kazanıldığı ortaya koyulmuştur. TTV negatif anneden doğan çocukların %43’ünde TTV DNA saptanmıştır. TTV pozitif annelerin enfekte çocuklarında farklı nükleotid dizileri bulunmuştur (Davidson et al., 1999). Bu veriler ışığında araştırmacılar, TTV’nin anneden çocuğa geçebileceğini, çevreden alınabileceğini, anne sütünde sıklıkla rastlanmasından dolayı bu yolla da aktarılabileceğini öne sürmektedirler. (Davidson et al., 1999; Tabak et al., 1999; Tunçbilek et al., 1999).

TTV DNA pozitif beş hastanın tamamının safrasında virüse rastlanmıştır. Bu bilgi, araştırmacıları, TTV'nin safra yolu ile bağırsaklara, oradan da fekal yol ile dış ortama atılacağı sonucuna götürmüştür (Ukita et al., 1999).

TTV DNA pozitif post-transfüzyonlu beş hastanın üçünün dışkılarında da TTV DNA saptanmıştır. Serum ve dışkının sekans analizleri sonucu aynı virüs oldukları gösterilmiştir (Okamoto et al., 1999). TTV diyaliz hastalarında dışkı, safra sıvısında da bulunmuştur. Bu veriler TTV'nin non-parenteral yollarla taşınabileceğini göstermektedir. Kırk farklı ortamdan alınan kan donörlerinin dışkılarında da TTV bulunmuştur (Cossart, 2000). Hemodiyaliz, talasemili, Behçet hastalarında, kan donörlerinde TTV prevalansı yüksek bulunurken, hasta gruplarında anlamlı bir fark saptanamamıştır (Verdi et al., 1999).

Herhangi bir kan ürünü almayan veya cerrahi bir operasyon geçirmeyen bir grup HD hastasında yapılan incelemede TTV negatif olanlar her iki periyotta da negatif bulunmuştur. Kanamoto-Tanaka ve ark. (2002), TTV'nin pozitiflik veya negatifliğinin değişebileceğini ortaya koymuşlardır. Touinssi ve ark. (2001), birçok TTV pozitif HD hastasının başlangıçta TTV negatif olduğunu göstermişlerdir.

Diyaliz hastalarındaki 3 yıllık çalışma sürecinde TTV'nin %50'si elimine olmuştur. Diyaliz hastası olmayan başka bir grupta bu oran %30 olarak gerçekleşmiştir. TTV'nin azalması hemodiyaliz prosedüründen kaynaklanabilir. Post-transfüzyonlu non A-G hepatiti araştırılan 3 hastanın 2 sinde 15–17 hafta sonra temizlenmiştir. Ancak, 10 yıl önce TTV tesbit edilen hemofili hastalarında hala TTV'ye rastlanmaktadır. 4 yıl süren başka bir çalışmada, viremik hastaların ancak %29'unda TTV'nin temizlendiği gösterilmiştir. TTV klirensinin, HCV klirensinden yüksek olduğunun gösterildiği çalışmalar rapor edilmektedir (Watanabe et al., 1999).

Tsuda ve ark. (1999) TTV antikorunu (anti-TTV) saptayan bir yöntem geliştirmişlerdir. 44 kan donöründen 6'sında TTV DNA bulunmuştur. Bu altı

donörden 1'i anti-TTV pozitif iken 5'i anti-TTV negatif bulunmuştur. TTV DNA negatif olan 38 donörün 11'inde anti-TTV pozitif, 27'sinde ise anti-TTV negatif bulunmuştur.

Tükürükte, anne sütünde, serebro spinal sıvıda, göğüs boşluğu ve karın boşluğundaki sıvıda TTV tesbit edilmiştir. Gallian ve ark. (1999) tükürükte %68 (serumun 10 katı), dışkıda %18 oranında TTV tespit etmiş ve tükürük yoluyla da yayılım olabileceğini belirtmişlerdir. Martinez ve ark. (2000) parenteral geçişle TTV'nin taşınamayacağını ifade etmektedirler. Hastaneden yayılım konusunda yapılan çalışmalarda önemli bulgular elde edilmiştir (Forns et al.,1999).

Karaciğerde, serumdaki miktarının 10–100 katı kadar TTV'ye rastlanması, TTV DNA'nın hepatositlerde replike olduğunu düşündürmektedir. TTV'nin intrahepatit replikasyonu HCV ile ko-infeksiyonlu bireylerde olabilir.

HCV ya da HBV ile infekte olmuş hastalarda TTV oranının %75 olarak rapor edildiği bir çalışmada, bu hastalarda kan nakilleri diğerlerinden az olduğu halde TTV'nin çok yaygın olması, farklı yollar ile de yayılabileceğini akla getirmektedir (Forns et al.,1999).

TTV'de vertikal transmisyon söz konusu olabilir (Chen et al., 2000). Virüsün transplasental yayılımı mümkün olabilir. Kendisi TTV pozitif olan annelerin, %19'unda göbek bağındaki kanda TTV pozitif, kendisi TTV negatif olan annelerin hiçbirinde göbek bağındaki kanda TTV bulunamamıştır. İlginç olan bir durum da ikiz annesi TTV negatif iken göbek bağı TTV negatif, ancak başka bir ikiz çocuk annesinde göbek bağından biri TTV pozitif diğeri negatif olarak bulunmuştur (Saback et al.,1999).

Bu verileri irdelediğimizde virüsün ismi transfusion transmitted olsa da, tam olarak hangi yollarla bulaştığı kesin değildir. TTV'nin göbek bağında bulunması transplasental yayılımının varlığı konusunda yeterli bir bilgi olamaz. Saback ve ark. (1999) çocuklar üzerinde yaptıkları araştırmalarda, yeni

doğarlarda %6.5, 11 yaştan küçüklerde %17 oranında TTV tespit etmişlerdir. Hsu ve ark. (2003) ise araştırmalarında TTV'yi, sağlıklı çocuklarda %27, HBV taşıyısı çocuklarda %33, talesemik çocuklarda %37 oranlarında bulmuşlardır.

HD ünitesinde çalışanlarda TTV %33, diğer çalışanlarda ise %26,7 olarak bulunmuştur (Shibuya et al., 2001). Fakat, HD ünitelerinde çalışanların mesleki riski diğer sağlık çalışanları kadardır. Ancak, TTV'nin yüksek olarak görüldüğü HD ünitelerinde de ilgili çalışmalar yapılmalıdır.

TTV'li sağlık çalışanları ile diğerleri arasında ALT miktarlarında farklılık bulunamamıştır (Shibuya et al., 2001). HD ünitelerinde muhtemel yayılım yollarından biri personelden veya kişiden kişiye yayılımdır. Özellikle ülkemizde genellikle HD ünitelerinde çalışan kişiler birçok hasta ile çalışmak durumunda kalmaktadırlar. Bu durum diğer birçok enfeksiyon ajanının yayılımı için bir risk olduğu gibi TTV'nin yayılımı için de geçerli olabilir. Ayrıca, henüz etkin TTV tarama yöntemleri dünyada yaygınlaşmadığından, hepatit-B'li olanlarının, diğerlerinden farklı bölümlerde diyalize girmeleri gibi TTV taşıyan ve taşımayan hastaların bir ayrıma tabi tutulmaları mümkün olmamaktadır ki bu da yine bir risk faktörüdür. Bütün bunlara rağmen, elimizdeki bilgilere göre hastane personeline TTV enfeksiyonu düşük bir risktir. Bu verilerde dikkat edilmesi gereken, sadece devam eden TTV enfeksiyonlarının incelendiğidir. Geçici veya daha önce olan TTV enfeksiyonlarının değerlendirilmesi için spesifik antikorlar gerekmektedir. Bundan dolayı, "HD ünitelerinde çalışanlarda TTV riski düşüktür" ifadesi tam olarak desteklenemez.

TTV DNA'nın HD hastalarında %54,3, kan donörlerinde %37 olarak bulunduğu bir çalışmada viral etken prevalansı ile çalışılan popölasyonların immün kompedans düzeyleri arasında bir ilişki kurmak mümkündür. Bu bulgular gösteriyor ki immün sistemin interferon tedavisi ile uyarılması TTV viremisini açıklayabilir (Touinssi 2001).

Şimdi yeni ve daha duyarlı PCR tespit protokolleri TTV'nin daha iyi tespitine olanak sağlamaktadır. Çünkü farklı teknikler kullanılarak aynı deney grubunda farklı sonuçlar elde edilebilmektedir. Örneğin, Standardised Primary PCR (SSP) yöntemi ile TTV DNA, kan donörlerinde %37, diyabetiklerde %57,7 olarak bulunmuştur. Bu kan örneklerindeki çalışma heminested PCR ile tekrarlandığında oran, kan donörlerinde %58, diyabetiklerde %63 bulunmuştur. Bu durum bazı yörelerdeki çok düşük ya da çok yüksek TTV prevalanslarını anlamada yardımcı olabilir. HD hastalarında, diyabetiklerde ve HIV-I enfekte olmuş kişilerde, kan donörlerine göre CD4+ T hücresi sayısı fazladır.

Bir araştırmada diyaliz hastalarının %16'sı, sağlıklı insanların %2'sinde TTV DNA pozitif bulunmuştur. Bu hastalarda TTV DNA oranı HCV RNA pozitiflerde %16, HCV negatiflerde %20, HBV pozitiflerde %5 olarak tespit edilmiştir. Bütün bu durumlarla ilgili özel bir TTV genotipinin ilişkilendirilemeyeceği belirtilmektedir (Martinez et al., 2000).

TTV'ye hamile bayanlarda, hemofili hastalarında, HIV-1 koenfeksiyonlarda, intravenöz ilaç kullananlarda, diabet ve karaciğer hastalarında rastlanmaktadır. TTV DNA bulunma riski yüksek olan gruplarda yapılan çalışmalarda, kronik karaciğer hastalarında (non A-G) %18, hepatoselüler karsinomalı hastalarda %9,2, fahişelerde %9,7, gönüllü donörlerde %7, gebe kadınlarda %6,8 oranında bulunmuştur (Okamoto et al., 1998b; Türkoğlu, 1999b). Akut solunum sistemi rahatsızlıkları olan çocukların burun sekresyonlarında da bu virüs tesbit edilmiştir (Maggi et al., 2003). Türkiye'de çeşitli hasta gruplarında TTV çalışması yapılmaktadır, ancak toplumdaki prevalans tespit edilememiştir.

Çizelge 2.2 Post-transfüzyon Hepatitli Hastalarda TTV-DNA'nın Tespiti (Nishizawa et al., 1997; Oguchi et al., 1999)

Yaş	Cinsiyet	Takılan Kan (ÜNİTE)	Teşhis	Haftalar	ALT	TTV-DNA
58	Erkek	35	Koroner Enfeksiyon	8	55	Pozitif
70	Kadın	26	Safra Kesesi Kanseri	6	15	Pozitif
56	Erkek	21	Özefagus Kanseri	6	192	Pozitif

Viral DNA, infekte olmuş karaciğer dokularında bulunmuştur (Yan et al., 2001; Comar et al., 2002) ki bu durum virüsün hepatotropik olduğunu gösterebilir. İnsanda akut ya da kronik hepatit vakalarının TTV ile ilişkisi ve bioklinik önemi açık değildir. Son yapılan çalışmalarda, TTV pozitif hastalarda kimyasal ve histolojik herhangi bir karaciğer problemi tespit edilememiştir. Karaciğer, böbrek, kalp, kemik iliği transplantasyonlarında TTV bulaşması ile ilgili bilgiler elde edilmiştir (Kobayashi et al., 1999; Oguchi et al., 1999; Kanda et al., 1999).

TTV üzerinde yapılan ilk çalışmalardan sonra, TTV'nin hepatitle olan ilişkisi araştırılmıştır. Fulminant hepatitli, kriptojenik sirozlularda, alkolik sirozlularda, hemofili hastalarında, etiyolojisi bilinmeyen akut hepatitlerde ve kronik hepatit C'li hastalarda TTV yüksek oranda bulunmuştur (Irwing et al.,

1999; Hirata et al., 1998; Charlton et al., 1998). Ayrıca, HD hastalarında, talasemili hastalarda ve romatoid artritli hastalarda TTV DNA daha sıklıkla saptanmıştır. Diyabetik fakat böbrek hastası olmayanlarda TTV DNA %50 olarak tespit edilmiştir (Gallian et al., 1999). Kanseri hastalarında da yüksek oranda TTV tespit edilmiştir (Zhong et al., 2001).

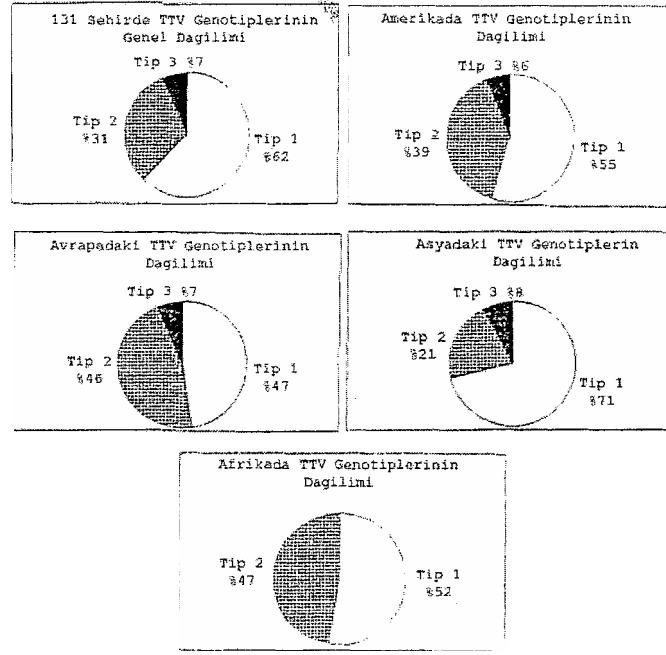
TTV, çeşitli karaciğer hastalıklarından sorumlu olabilir. Ancak çeşitli çalışmalarda TTV ile anormal ALT düzeyleri arasında ya da karaciğer kanserinde TTV ile anormal ALT düzeyleri arasında bir korelasyon olmadığı gösterilmiştir. TTV, diyaliz hastalarında değişik oranlarda bulunmaktadır. TTV DNA diyaliz hastalarında HGBV-C/HGV'den daha çok bulunmaktadır (Dai et al., 2002). Yine damar içi uyuşturucu bağımlılarında, TTV'nin, bağımlılık süresi, uyuşturucunun tipi ve yaş ile arasında bir korelasyon alabileceğini göstermektedir (Gallian et al., 1999).

TTV'nin dünya üzerindeki dağılımı farklılık göstermektedir. Bazı araştırma grupları TTV düzeyini, İskoçya'da %1,9, Brezilya'da %20, Kuzey Amerika'da %1, Japonya'da %12, Nijerya'da %51 olarak tespit etmişlerdir (Dai et al., 2002). Değişik ülkelerdeki TTV prevalans sonuçları çizelge 2.3'de gösterilmiştir (Dündar, 1998; Akarca, 1998; Simmonds et al., 1998). Bazı toplumlarda (Gambiya) TTV prevalansının %83'e kadar yükseldiği görülmektedir.

Şekil 2.3'de de görüleceği üzere, dünya üzerindeki TTV genotiplerinin dağılımında coğrafik durum önem kazanmaktadır. Araştırmayı yapan Gallian ve ark. (2000)'nin sınıflandırması içinde tüm kıtalarda genotip 1 en yüksek oranda bulunmaktadır. Fakat Avrupa'da genotip 1 ile genotip 2 arasındaki yüzdeleri orandaki fark çok azalmaktadır. Diğer önemli bir veri de, Afrika kıtasında genotip 3'e rastlanmamaktadır. Önümüzdeki yıllarda TTV'nin kökeni ve dünya üzerindeki yayılımı araştırılırken bu ve benzeri çalışmalara ihtiyacımız olacaktır. Ülkemizde bazı araştırma gruplarının yaptıkları çalışmaların sonuçları çizelge 2,5'te gösterilmiştir (Erensoy et al., 1999; Akarca et al., 1999; Verdi et al., 1999; Tabak et al., 1999; Tunçbilek et al., 1999; Türkoğlu et al., 1999a).

Çizelge 2.3. Çeşitli Ülkelerdeki TT Virüsü Prevalansları

<u>Ülke</u>	<u>Çalışılan Grup</u>	<u>Pozitif/Toplam Sayı</u>	<u>Prevalans</u>
Japonya	Kan donörü	34/290	12
Tayland	Kan donörü	38/105	36
Nijerya	Taşra halkı	32/63	51
Gambiya	Taşra halkı	63/76	83
İskoçya	Kan donörü	19/100	1,9
İtalya	Kan donörü	22/100	22
ABD	Kan donörü	1/100	1
Brezilya	Taşra halkı	18/91	20
Türkiye	Kan donörü	9/200	4,5



Şekil 2.3. TTV'nin farklı genotiplerinin dünya üzerindeki yayılışı (Gallian et al., 2000)

Çizelge 2.4. TT Virüsünün Türkiye'deki durumu

Araştırmacı	Çalışma grubu	Kişi sayısı	TTV pozitif	%
Erensoy ve ark.	Kan donörleri	33	15	45
Verdi ve ark.	Kan donörleri	150	12	8
Tabak ve ark.	Akut non A-E hepatit	13	0	0
Akarca ve ark.	Talasemi	30	3	30
Akarca ve ark.	Fulminant hepatit sağlıklı kontrol	14	5	36
Türkoğlu ve ark.	Sağlıklı kontrol	32	3	9,30
Türkoğlu ve ark.	Çeşitli hasta grupları	93	44	22,7
Tunçbilek ve ark.	Kan donörleri	200	9	4,5

2.2. Çalışmanın Amacı

Bu çalışmada TTV, hepatit-B'li, hepatit-C'li ve normal diyaliz hastalarında araştırılmıştır. Diyaliz hastaları, zorunlu olarak kan transfüzyonu yapılması, sürekli hastane ortamında bulunma gibi risklere maruz kalmaktadırlar. Özellikle post-transfüzyonlu hastalar hepatit açısından büyük risk taşıdığından, HD hastaları, bu araştırmanın yapılabileceği çok önemli bir hastalık grubu olarak karşımıza çıkmaktadır. Eğer bu virüs hastalığa neden oluyorsa, hangi faktörlerle bu risk artmakta ya da azalmaktadır? Virüs hangi yollarla yayılmaktadır? Bu ve buna benzer soruların cevapları alındığı takdirde, toplumda ve HD hastaları gibi doğal olarak risk altında kalan hastalara uygun çözümler sunulup gerekli önlemler alınabilecektir.

3. MATERYAL VE METOT

Göztepe SSK Hastanesi, Haydarpaşa Numune Hastanesi ve Başkent Üniversitesi Hemodiyaliz Ünitelerinde tedavi gören toplam 55 HD hastasıyla çalışma yapılmıştır. HD hastaları hepatit-B’li, hepatit-C’li, hepatit B ve C’nin her ikisini de taşıyan ve hepatit B ve C’nin her ikisini de taşımayan (normal) olmak üzere 4 grupta incelenmiştir. 15-79 yaş aralığında olan hastaların 30’u (%54) erkek, 25’i (%46) kadındır. Hepatit-B ve Hepatit-C ile ilgili serolojik testler (HBs-Ag ve Anti HCV), kapalı sistem Chemiluminescence yöntemi ACCESS Enzim İmmunaassay (EIA) cihazıyla, ilgili diyaliz merkezleri tarafından yapılmıştır. TTV DNA araştırılması için hastalardan alınan kan serumları -20°C de saklandı. Bu hastaların serum örneklerine Proteinaz K/Fenol-Kloroform yöntemi uygulanarak DNA ekstraksiyonu yapıldı. Ekstrakte edilen DNA’lar, TTV genomuna ilişkin T801 (5’GCT ACG TCA CTA ACC ACG TG3’) sense primer nukleotid 6-25 ve T935 (5’ CTG CGG TGT GTA AAC TCA CC 3’) antisense nukleotid 204-185 oligonukleotid dizilerinden oluşan primer çifti ile çoğaltıldı. Amplifikasyon sonrası PCR ürünleri, agaroz jel elektroforezde yürütüldükten sonra 199 bp uzunluğundaki bantlar UV transillüminatör de incelenerek değerlendirildi. Bu çalışmanın istatistikî hesaplamalarında Fisher’in ki-kare testi kullanılmıştır.

Çalışmaya katılan hastalar bir paket ve daha az sigara kullanmakta olup, hiçbirinde intravenöz ilaç kullanımı, alkol bağımlılığı ve riskli bir cinsel ilişki bulunmamaktadır. Hiçbir hastada HIV-1’e rastlanmamıştır. Hepatit virüsü bulunduranların çoğunda viral hepatitin temelinde görülen halsizlik, iştahsızlık, bulantı, kusma gibi şikayetlerinin olduğu tespit edilmiştir.

3.1.Çalışmada Kullanılan Stok Çözeltiler ve Tampon Sıvıları

1. TE Tamponu: 10 kez konsantre hazırlandı ve kullanılacağı zaman seyreltildi.

10 mM Tris HCl (pH:8)

0.5 mM EDTA (pH:8)

2. SDS (%10): 0.5 gr. SDS, 45 ml. Distile su içerisinde çözüldü. pH'sı 7,2'ye ayarlandı.

3. Proteinaz K: Toz halindeki enzim 20 mg/ml olacak şekilde distile su ile sulandırılıp eritildi. -20°C de saklandı.

4. Alkali Fenol Çözeltilisi: Hazır olarak alınıp kullanıldı. +4°C de saklandı.

5. Kloroform ve İzooamilalkol: Hazır olarak alındı ve 24:1 oranında karıştırılarak ekstraksiyon için kullanıldı.

6. dNTP: dATP, dGTP , dTTP, dCTP'den her biri 100 mM konsantrasyonda olacak şekilde hazır olarak alındı. – 20°C'de saklandı.

7. Taq Polimeraz: Çeşitli firmalardan hazır olarak alındı. –20°C'de saklandı.

8. Primerler: Liyofilize olarak sentez ettirildi. Belirli oranlarda sulandırılarak kullanıldı. – 20°C'de saklandı.

9. 1 M MgCl₂: Gerekli miktar distile suda çözüldü. Küçük hacimlere bölünüp otoklavda sterilize edildi.

10. Elektforez Tamponu (TBE 10X=Jel ve Tanklar için Tampon):

Tris baz 108g

Borik asit 55g

EDTA 0.5.M, pH:8.0 40 ml

1 lt'ye distile su ile tamamlandı.

11. Etidyum Bromid (EB): 10 mg/ml olarak hazırlanarak distile suda manyetik karıştırıcı ile çözüldü. +4°C de ışıktan korunarak muhafaza edildi.

1 M Tris HCl (pH:8.5): 121.1 gr Tris base, 800 ml H₂O içinde çözüldü. pH konsantre HCl ile ayarlandı. Hacim distile su ile 1 lt'ye tamamlandı.

EDTA: Ana çözelti 0.5 M olarak hazırlandı. 186.1 gr disodyum etilendiamin tetraasetat 2H₂O'ya karşılık 20 gr NaOH tartılarak hem EDTA'nın çözülmesi, hem pH' nın 8.0'e gelmesi sağlandı.

DEPC (Diethyl Pyrocarbonate)'li Su Hazırlanışı: 0.1 ml su ile çeker ocak içerisinde karıştırıldı ve eritilerek otoklavlandı.

3.2.TTV DNA Ekstraksiyonu

PCR uygulaması için örneklerden Proteinaz K/Fenol yöntemi ile ekstraksiyon yapıldı. Bu amaçla 60 µl serum örneği üzerinde 200 µl ekstraksiyon tamponu ve 10 µl proteinaz K karışımı ilave edilip bir saat 40°C de inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda, tüpler 5-10 s gibi kısa bir süre santrifüjde çevrilerek kenarlarda oluşmuş damlacıkların düşmesi sağlandı. Karışımın üzerine 200 µl alkali fenol ve 200 µl kloroform-izoamilalkol çözeltisinden konuldu. Yeni karışım bir dakika kadar iyice vortekslendikten sonra, 13.000 devir/dak'da beş dakika boyunca santrifüj edildi. Bu işlem sonucunda iki faza ayrılan karışımın üstte kalan berrak DNA fazı bir pipetle dikkatlice başka bir tüpe alındı. Üzerine 400 µl isopropil alkol konup vortekslendikten sonra yeniden santrifüjde çevrildi. Ekstraksiyonun son aşamasında 400 µl etilalkol (%70'lik) eklendi ve yeniden santrifüj edildi. Etil alkolle çöktürülen DNA kurutulurak 30 µl distile su ile sulandırılıp PCR aşamasına kadar -20° C de saklandı.

3.3.Çoğaltma (PCR) İşlemi

Hasta örneğinde az sayıda bulunan “etkene özgü nükleik asitlerin (DNA/RNA) *in vitro* çoğaltılarak saptanması” esasına dayanan PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyon) yöntemi, yaygın olarak kullanılmaya başlanan bir moleküler biyoloji uygulamasıdır. PCR uygulamalarıyla, örneklerde az sayıda bulunan DNA moleküllerinin sayısının trilyonlarla ifade edilebilecek düzeyde arttırılmış olması, yöntemi “aşırı duyarlı” bir teknik haline getirmektedir. Fakat bu aşırı duyarlılık özelliği, her zaman bir avantaj sağlamamakta, bazı durumlarda “yalancı pozitifliğe” sebep olabilmektedir. Yalancı pozitifliğin en önemli sebebi “kontaminasyon” olup, kontaminasyonu önlemek için laboratuvar dizaynı ile personel seçimi ve güvenilirliğine dikkat etmek şarttır (Durmaz, 2001).

“Temiz” PCR odasında, her bir tüp için aşağıdaki gibi çoğaltma karışımı hazırlanmıştır:

Template DNA	10 ng/μl	10μl
Tampon PCR	10X	5 μl
dNTP	12 mM	2 μl
MgCl ₂	25 mM	4 μl
Primer 1	10μl	0.5 μl
Primer 2	10μl	0.5 μl
UNG*	1 u/μl	0.5 μl
Taq polymerase	5 u/μl	0.5 μl
ddH ₂ O		27.0 μl
TOPLAM		50.0 μl

*Uracyl-N-glycosylase (UNG) kontaminasyondan korunma amacıyla amplifikasyon aşamasında kullanılmaktadır. Denatürasyon 94°C de 45 s, bağlanma 55°C de 40 s ve uzatma 72°C de 45 s (40 siklus) olacak şekilde amplifikasyon gerçekleştirilmiştir. Son siklustaki uzatma fazı 72°C de 4 dk olacak şekilde ayarlanmış ve PCR tamamlanmıştır.

3.4.PCR Ürünlerinin İncelenmesi

Amplifikasyon işlemini takiben tüplerdeki PCR ürünü yatay agaroz jel elektroforezi ile incelendi. Bu amaçla 0.5 g/ml etidyum bromid (EB) içeren %1.5 luk agaroz (No: A-9539:SIGMA) jelde açılmış kuyulara PCR ürünlerinden 20 µl alınarak ve 1 µl renklendirici (loading buffer) ile parafin üzerinde karıştırılarak örnekler yerleştirildi. Ayrıca ortama amplifiye olmuş ürünleri boylarına göre değerlendirmek amacıyla size marker (Qx174, *Hae* III ile kesilmiş) eklendi. 150 V'da 10-15 dakika elektroforez uygulanarak transillüminatörde ultraviyole (UV) altında sonuçlar incelendi.

3.5. TTV DNA Çalışmasında Kullanılan Laboratuvar Cihazları

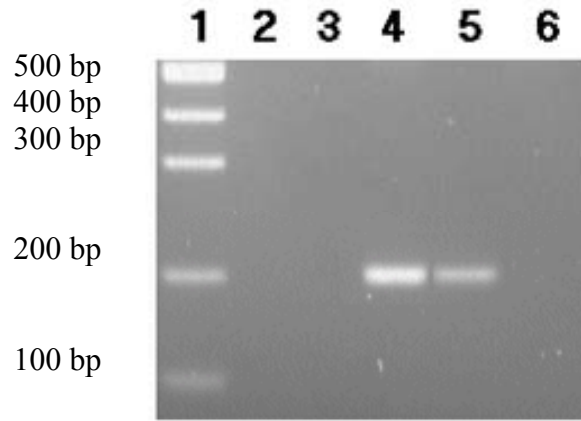
1. Thermal Cycler (Üstten ısıtmalı kapaklı) MJ Resaarch 150 Minicycler (16 tüplü)
2. Soğutmalı santrifüj (Hettich EBA 12 R) (24 tüplü 1,5 rotor)
3. Soğutmasız santrifüj (Hettich EBA 12) (24 tüplü 1,5 rotor)
4. Mini Agaroz jel Elektroforez (The Horizon 58, 11.14 and 20.25)
5. Güç ünitesi (Model P304 Power Supply, 300-500V)
6. UV transilluminatör (302-312 nm)
7. Hassas terazi (Hassasiyet 0.00, Scaltec)
8. PII motro cihazı (Hana, HI 9321. 931400)
9. Distile su cihazı (Nüve, NS 245)
10. Otoklav (Nüve, OT 012)
11. Vortex (Nüve, NM 110)

3.6. TTV DNA Çalışmasında Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kimyasal madde	Katalog No	Miktar
1. Alkali fenol	P4557 Sigma	400 ml
2. Asit fenol	P4682 Sigma	400 ml
3. N – lauroylsarcosine	L9150 Sigma	100 gr
4. Guanidine Thiocynate	G9277 Sigma	500 gr
5. Isoamyl alcohol	19392 Merck	500 ml
6. Isopropanol	15916 Merck	500 ml
7. Chloroform	C2442 Merck	500 ml
8. Ribonuclease inhibitor	R2520 Sigma	25.000 unit
9. Protease	P6911 Sigma	5 gr
10. Agaroza	P9539 Prona	500 gr
11. Ethidium Bromide	E4391 Sigma	25 tablet
12. Orange G	O3756 Sigma	25 gr
13. Sukroz	S0389 Sigma	501 gr
14. Size marker	P9577 Sigma	Kutu
15. Boric acid	B6768 Merck	5 kg
16. EDTA	E5134 Sigma	500 gr
17. Trizma base	T7149 Sigma	10 kg
18. Sodium dodecyl sulfate	4390 Sigma	1 kg
19. 2-Mercaptoethanol	M3148Sigma	100 ml
20. Sodium hidrokside	S 0399 Merck	500 gr
21. HCL	II7020 Merck	500 ml
22. Taq DNA Polymerase	Fermentas Sigma	100U, 500U

4. BULGULAR

Başkent Üniversitesi Diyaliz Merkezi, Göztepe SSK Hastanesi Diyaliz Merkezi ve Haydarpaşa Numune Hastanesi Diyaliz Merkezleri'nden alınan 55 HD hastasına ait kan serum örnekleri PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yöntemi ile çalışılarak 23 tanesinde TTV DNA pozitif olarak bulunmuştur.



Şekil 4.1. Hastalarda TT virüsünü gösteren %1.5'lik agaroz gel fotoğrafı. 1: 100 bp DNA marker, 2: TTV negatif hasta, 3: TTV negatif hasta, 4: TTV pozitif kontrol, 5: TTV pozitif hasta, 6: H₂O kontrol (PCR miks kontrol)

Çizelge 4.1'de üç farklı hemodiyaliz ünitesinden alınan toplam 55 hastaya ait kan serumu örneklerinin PCR testi sonuçlarının cinsiyete göre dağılımı gösterilmiştir. 55 hastanın 30 tanesi (%54) erkek, 25 tanesi (%46) kadındır. TTV DNA, erkek HD hastalarının 13 tanesinde (%24), kadın hastaların 10 tanesinde (%21) tespit edildi. HD hastalarının TTV DNA pozitifliğinin cinsiyete göre dağılımı incelendiğinde, erkeklerle kadınlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$).

Çizelge 4.1. HD hastalarında TTV-DNA pozitifliğinin cinsiyete göre dağılımı

Cinsiyet	HD hastaları		TTV DNA Pozitif	
	n	%	n	%
Erkek	30	54	13	24
Kadın	25	46	10	21
Toplam	55	100	23	42

Deneylerin diğer önemli bir verisi de HD hastalarının yaş gruplarına göre TTV DNA pozitifliğinin karşılaştırılmasıdır. Çizelge 4.2’de görüldüğü üzere hastalar yaşlarına göre; 15–30, 31–45, 46–60, 61 ve üzeri yaş grubu olmak üzere dört farklı gruba ayrılarak incelenmiştir. 15–30 yaş grubundaki 7 hastanın 2 tanesinde (%28), 31–45 yaş grubundaki 18 hastanın 8 tanesinde (%44) , 46–60 yaş grubundaki 11 hastanın 5 tanesinde (%45), 61 ve üzeri yaş grubundaki 19 hastanın 8 tanesinde (%12) TTV DNA tespit edilmiştir.

TTV-DNA pozitifliği yönünden HD hastaları değerlendirildiğinde, 15-30 yaş grubuyla diğer gruplar arasında bir fark bulunmuştur. Ancak, örnek sayısının azlığı bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır. Diğer gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Çizelge 4.2. HD hastalarında TTV DNA pozitifliğinin yaş gruplarına göre dağılımı

Yaş Grupları	HD hastaları		TTV DNA pozitif	
	n	%	n	%
15-30	7	13	2	28
31-45	18	33	8	44
46-60	11	20	5	45
61 ve üzeri	19	34	8	42
Toplam	55	100	23	42

TTV ile major hepatit etkenleri olan HBV, HCV arasındaki ilişki ve TTV DNA pozitif HD hastalarının dağılımı çizelge 4.3'te verilmiştir. Buna göre HBsAg pozitif ve HCV negatif olan 10 HD hastasında 4 birey (%40), HBsAg negatif ve HCV pozitif olan 23 bireyden 11 tanesi (%47) , HBsAg pozitif ve HCV pozitif 2 hastadan hiç biri, HBsAg negatif ve HCV negatif 20 hastadan 8 tanesi (%40) TTV DNA taşımaktadır.

Çizelge 4.3. HD Hastalarında Hepatit-B ve Hepatit-C taşıyıcılık durumuna göre TTV DNA pozitifliğinin dağılımı.

Hepatit B ve Hepatit C taşıyıcılık durumuna göre		HDhastası		TTV-DNA pozitif	
		n	%	n	%
HBsAg Pozitif	HCV Negatif	10	18	4	40
HBsAg Negatif	HCV Pozitif	23	42	11	47
HBsAg Pozitif	HCV Pozitif	2	3	-	0
HBsAg Negatif	HCV Negatif	20	36	8	40
Toplam		55	100	23	42

Aşağıdaki çizelge 4.4'te hepatit B ve C taşıyıcısı olan HD hastalarında ALT enzim düzeyi gösterilmiştir. HBsAg ile ALT enzim düzeyi arasında çok anlamlı bir sonuç bulunmuştur. HBsAg pozitif ve HCV negatiflerle, HBsAg negatif ve HCV negatifler arasında ALT enzim düzeyi olarak anlamlı bir fark bulunmuştur.

Çizelge 4.4. HD hastası olan Hepatit B, C ve normal kişilerde ALT enzim miktarının dağılımı

Hepatit B ve Hepatit C taşıyıcılık durumuna göre		ALT Enzim Düzeyi			
		Normal		Yüksek	
		n	%	n	%
HBsAg Pozitif	HCV Negatif	3	30	7	70
HBsAg Negatif	HCV Pozitif	19	82	4	12
HBsAg Pozitif	HCV Pozitif	-	0	2	100
HBsAg Negatif	HCV Negatif	20	100	-	0
Toplam		42	76	13	24

Diyaliz süresi ile TTV DNA ve HCV RNA arasındaki ilişki çizelge 4.5'te gösterilmiştir. Diyaliz süresi 0-1 yıl olan 4 bireyden 2 tanesi (%50) TTV DNA pozitifdir. 2-5 yıllık bir sürede diyaliz tedavisi gören 26 hastadan 10 tanesi (%38), 6- 10 yıllık 13 HD hastasından 7 tanesi (%53), 11 ve daha çok yıldır hemodiyaliz tedavisi gören 12 kişiden 4 tanesi TTV DNA pozitif olarak tesbit edilmiştir. HCV RNA ise diyaliz süresi; 0-1 yıl olan 2 bireyde (%50), 2-5 yıllık 13 bireyde (%50), 6-10 yıllık olan 8 bireyde (%61), 11 yıl ve üzeri olan 2 bireyde (%16) tesbit edilmiştir. Çizelge 4.5'teki veriler kullanılarak TTV DNA pozitifliği ile diyaliz süresi arasında anlamlı bir

farkın olmadığı ortaya konulmuştur ($p>0.05$). HCV RNA ile diyaliz süresi arasında da anlamlı bir fark görülmemektedir.

Çizelge 4.5. Diyaliz Süresi ile TTV DNA ve HCV RNA Arasındaki İlişki

Diyaliz Süresi (yıl)	Toplam	TTV DNA Pozitif		TTV DNA Negatif		HCV RNA Pozitif		HCV RNA Negatif	
		n	%	n	%	n	%	n	%
0-1	4	2	50	2	50	2	50	2	50
2-5	26	10	38	16	62	13	50	13	50
6-10	13	7	53	6	47	8	61	5	39
11 ve üzeri	12	4	33	8	66	2	16	10	84
Toplam	55	23	42	32	58	25	45	30	55

Birçok araştırmacı serumdaki ALT düzeyi ile TTV arasındaki ilişkiyi ortaya koymak için çeşitli çalışmalar yapmışlardır. Çizelge 4.6 incelendiğinde görüleceği üzere araştırmamızda, TTV DNA pozitif 23 hastanın 5 tanesinde (%21) ALT düzeyi yüksek, 18 bireyde (%79) ALT bulunması gereken sınırlardadır. Yine TTV DNA negatif olan 32 hastanın 8 tanesinde (%25) ALT düzeyi yüksek bulunurken 34 bireyde (%75) normal olduğu tesbit edilmiştir. Buradaki veriler değerlendirildiğinde, TTV DNA

pozitifliği ya da negatifliği ile ALT arasında anlamlı bir fark ortaya konulamamaktadır ($p>0.05$).

Çizelge 4.6 TTV DNA ile Serum ALT arasındaki ilişki

TTV DNA	n	ALT yüksek		ALT normal	
		n	%	n	%
Pozitif	23	5	21	18	79
Negatif	32	8	25	34	75

Aşağıdaki çizelge 4.7’de üç farklı diyaliz ünitesinden alınan HBsAg pozitif serum örneklerindeki TTV DNA araştırılmıştır. A ünitesinden alınan HBsAg pozitif 5 hastadan hiç birinin serumunda TTV DNA’ya rastlanmazken, B diyaliz ünitesinden alınan 4 tane HBsAg pozitif serumun üçünde TTV DNA tesbit edilmiştir. C ünitesinden alınan HBsAg pozitif 3 farklı kan örneğinden birisinde TTV DNA tespit edilmiştir.

Çizelge 4.7. Farklı diyaliz ünitelerinde TTV’nin dağılımı. A: Göztepe SSK, B: Başkent Üniversitesi, C: Haydarpaşa Numune Hastanesi diyaliz üniteleri).

Diyaliz ünitesi	HBsAg pozitif	TTV DNA pozitif	
		n	%
A	5	-	0
B	4	3	75
C	3	1	33

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüzde bilinen viral etkenlerin gösterilmediği akut ve kronik hepatitlerin varlığı devam ederken, etiyolojiden sorumlu, şüpheli farklı viral ajanların araştırılması moleküler biyolojik yöntemlerle devam etmektedir.

TTV ilk izole edildiğinde etiyolojisi bilinmeyen post-transfüzyon hepatitlerinde yüksek ALT düzeyleri ile ilişkili yeni bir TTV DNA virüsü olarak tanımlanmıştır (Nishizawa et al., 1997). Araştırmacılar ALT ile TTV DNA arasında bir ilişki saptamışlardır (Okamoto et al., 1998a). ALT düzeyinin normal değerinin üstünde çıkması TT virüs enfeksiyonu ile ilişkisi olabileceğini düşündürmektedir. Çeşitli çalışmalarda TTV varlığının ALT düzeyi ile ilgili olmadığı da bildirilmektedir (Nishizawa et al., 1997). Ancak karaciğerle ilgili problemi olan vakalarda (Kronik karaciğer hastaları, siroz ve karsinom) normal kan donörlerine göre TT virüsü daha fazla bulunmaktadır.

TTV enfeksiyonunun laboratuvar tanısını sağlamak ve kan donörlerinin güvenli taramalarını yapabilmek amacıyla geliştirilen testler henüz yeterli ve güvenilir bulunmamaktadır. Serumda TTV'nin tespitinde PCR, virüse özgü nükleik asit dizilerinin amplifikasyonu için en yaygın kullanılan yöntemdir.

TTV DNA saptanması için kullanılan primerler araştırmacı gruplarına göre değişebilmektedir. TTV'nin ilk saptandığı çalışmada Nishizawa ve ark. (1997) tek bir izolattan (N22), RD037, RD038, RD051 ve RD052 adını verdikleri primerleri tanımlamış ve kullanmışlardır. Daha sonra Okamoto ve ark. (1998) dört farklı altgrupun TTV dizilerindeki iyi korunan bölgelerden belirledikleri NG059, NG063 ve NG061 primerlerini kullanmışlardır. Zamanla TTV'nin çoğu varyantlarında korunmuş olan nükleik asit dizilerinden A5430, A5427, A8761, A5332 olarak adlandırdıkları primerleri kullanmışlardır. Takahashi ve ark. (1998) ise TTV dizilerindeki iyi korunmuş bölgelerden belirledikleri T801,T935 primerlerini kullanmışlardır. Bunlar TTV suşlarını daha duyarlı saptayan primerler olarak gösterilmiştir. Bu

çalışmada Takahashi ve ark. (1998)'nin tanımladıkları primerleri kullanmayı tercih ettik. Bu tercihimizin sebebi daha önceki araştırmacıların çoğunun bu primerleri kullanmış olması ve bu sayede çoğaltılan nükleik asitin dizi analizi yapıldığı zaman elde edilen şuşların genotip ve alt tiplerinin karşılaştırılabilecek olmasıdır.

Ülkemizde TTV genotip dağılımının belirlenmesi için yapılan çalışmalarda Japonya ve İngiltere kökenli isolatlara göre primer kullanılması, Türkiye şartlarında doğru bir genoprevalansı teorik olarak zorlaştırmaktadır. Türkiye'de TTV'nin genotip dağılımının belirlenmesi ve elde edilen genotiplerden yeni primerler düzenlenmesi bu konudaki en doğru yaklaşımdır. Ayrıca, TTV'nin son yıllarda keşfedilmiş olmasından dolayı yeterli bilgi bulunmamakla birlikte yurdumuzda da bu konuyla ilgili bazı çalışmalar yapılmıştır (Bkz. Çizelge2.4). Ancak, bu çalışmaların Türkiye coğrafyasının farklı yerlerinde, farklı hasta gruplarıyla gerçekleştirilmesi ve TTV genotiplerinin tespit edilmesi gereklidir. TTV'nin diğer gruplarla ve hastalıklarla ilişkisini tespit etmek için farklı araştırmacıların kullandığı primerleri daha geniş hasta gruplarında kullanarak, virüs miktarı veya genotiplerinin tayin edilmesi gereklidir.

Yapılan çalışmalarda, kronik hepatit-B, kronik hepatit-C, fulminant hepatit gibi çeşitleri karaciğer hastalarında, HIV seropozitif hastalarda, talasemili hastalarda, sağlıklı kan donörlerinde TTV DNA araştırılmış ve TTV enfeksiyonunun toplumumuzda sıklıkla görüldüğü belirtilmiştir (Türkoğlu ve ark, 1999). Bundan dolayı, önümüzdeki yıllarda TTV üzerindeki yeni araştırmaların sonuçlarının dikkatle izlenmesi gerekir.

HD hastalarında da TTV DNA birçok araştırma grubu tarafından yüksek oranlarda bulunmuştur (Tanaka et al., 1999; Valtoille et al., 2002; Schroter et al., 2001; Kanamoto-Tanaka et al., 2002; Oguchi, et al., 1999; Gallia et al., 1999; Okamoto et al., 1998a; Forns et al., 1999; Shibuya et al., 1999). TTV pozitiflerin %7,7'sinde, karaciğer testlerinde yüksek bir anormallik bulunduğu rapor edilmiştir (Forns et al.,1999). Touinssi ve ark. (2001) HD hastalarının %32'sinin TTV pozitif, kan donörlerinin %12'sinin

TTV pozitif olduğunu gösteren bir çalışma yapmışlardır. Yaptığımız bu çalışmada, TTV DNA pozitif HD hastalarının oranı %42 bulunmuştur. Yukarıda verilen araştırma sonuçlarıyla elde ettiğimiz sonuçlar genel anlamda benzerlik göstermektedir.

TTV pozitif ve TTV negatifler arasında yaş, cinsiyet, diyaliz süresi, kan transfüzyonu bakımından farklılık olmadığını gösteren araştırmalar yapılmıştır (Okamura et al., 1999). Ancak, hepatit virüslerinin bulunma oranları erkeklerde ve kadınlarda farklıdır. Hepatit B, hepatit C erkeklerde kadınlardan daha çok bulunur. Çünkü hepatit B mikrobuna karşı antikor cevabın oranı kadınlarda erkeklerden çoktur. HBV üzerinde cinsiyetin etkisi, farklı cinsiyetlerin immün cevabındaki genetik farklılıklarla açıklanabilir. TTV prevalansı cinsiyet ile farklılaşmamaktadır. Bu verilen grupta yapılan inceleme, TTV'nin yayılımının seksüel aktivite ile ilişkili olmadığına yorumlanabilir. Çalışmamızda, TTV DNA bulunma oranı erkeklerde %24, kadınlarda %21 olarak tesbit edilmiştir ve aralarında istatistiksel değerlendirme açısından bir anlam bulunamamıştır.

Yaş gruplarına göre TTV DNA prevalansı çeşitli gruplar tarafından araştırılmıştır. Oguchi ve ark. (1999), 0–49 yaş grubunda %20, 50–69 yaş grubunda %37, 70 ve daha yukarı yaşlarda %41 bulmuşlardır ve düşük yaşlarda belirgin bir fark tespit edememişlerdir.

Yaptığımız çalışmada, yaş gruplarına göre TTV DNA pozitifliği yönünden HD hastalarında değerlendirilmiş, 15–30 yaş grubu ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur. Ancak, örnek sayısının azlığı güvenilirliği azaltmaktadır, çünkü bir hastanın durumunun değişmesi yüzdelik oranlarda büyük değişimlere neden olabilmektedir.

Diyaliz süresiyle TTV DNA pozitifliği arasında ilişki kurulamayacağı çeşitli araştırmalarla gösterilmiştir (Kanamoto-Tanaka et al., 2002; Martinez et al., 2003; Gallian et al., 1999, Shibuya et al., 2001; Utsunomiya et al., 1999; Valtuille et al., 2002). Diyaliz hastalarında, transfüze edilen kanların

diyaliz ne kadar zamandır uygulandığı, yapılan transfüzyon miktarı ile ilişkisi olduğunu ortaya koyan çalışmalar da yapılmıştır (Oguchi et al.,1999). 15 yıla kadar diyaliz süresi prevalansı değişmediği ve kan transfüzyonlu hastaların %51,2'sinde TTV pozitif olduğunu gösteren bulgular rapor edilmiştir. (Touinssi et al., 2001). Tsuda ve ark. (1999), anti-TTV'nin enfeksiyon geçtikten sonra uzun süre varolabileceği sonucuna varmışlar ve TTV araştırması ile TTV prevalansının tam olarak anlaşılamadığı; çünkü TTV DNA'nın sadece devam eden enfeksiyonda bulunduğunu öne sürmüşlerdir. Ancak, bu testlerin güvenilirliği ve maliyeti gelecekteki yaygınlıklarının da belirleyicisi olacağı söylenebilir. Bundan dolayı, toplumda TTV DNA ve anti-TTV'nin birlikte incelenmesi çok daha sağlıklı sonuçlar ortaya koyacaktır. Bu çalışmada, diyaliz süresiyle TTV DNA pozitifliği arasında tam bir korelasyon olmadığını saptadık. Ancak, 11 yıl ve üzeri diyaliz tedavisi gören hastalarla diğer gruplar karşılaştırıldığında aralarında çok anlamlı bir sonuç bulunmuştur.

TTV tanı ve taramasında gerçekten de önemli ilerlemeler sağlanmış olmasına karşın, ülkemizde TTV'nin araştırıldığı çalışmalar kısıtlı sayıdadır. Toplumdaki prevalansı tam olarak tespit edilememiştir. TTV'nin coğrafik dağılımını ve TTV enfeksiyonunun ülkemizdeki durumunu doğru şekilde değerlendirebilmek için daha yüksek sayıda olgu içeren ve daha geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

HD hastalarında, TTV'nin parenteral yolların yanında nonparenteral yollarla da taşınabileceğini ortaya koyan çalışmalar vardır (Gallian et al., 1999; Valtuille et al., 2002; Kanamoto-Tanaka et al., 2002; Oguchi et al., 1999; Forns et al., 2002; Yuki et al., 1999; Shibuya et al., 1999).

Kao ve ark. (1999), ko-enfeksiyonlu HD hastalarında TTV DNA oranını; hepatit B'lilerde %15, HCV taşıyıcılarında ise %36 olarak tesbit etmişlerdir. Oguchi ve ark. (1999), HBsAg'nin sağlıklı kişilerle HD hastaları arasında farklı olmadığını ortaya koydular. HCV, HBV ile TTV arasında herhangi bir korelasyonun olmadığını gösteren bir çalışma yapılmıştır (Gallian et al., 1999). Yuki ve ark. (1999), TTV DNA'yı HCV pozitiflerin %48'inde tespit

etmiş ve TTV'nin intrahepatik replikasyonunun HCV'li koenfeksiyonlu bireylerde artıyor olabileceği üzerinde durmuşlardır. Campo ve ark. (2000), TTV pozitif HD hastalarının %39,9'unda HCV pozitif bulurken, bu bireylerin hiçbirinde HBV'ye rastlamamışlardır. Forns ve ark. (1999) HBV ve HCV ile enfekte olmuş kişilerde karaciğer testlerinin %75'inde anormal olduğunu, TTV DNA pozitif olanlarda ise bu anormalliğin sadece %7.7 sinde görüldüğünü tesbit etmişlerdir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara göre, TTV DNA pozitifliği ve negatifliğinin hepatit-B ve hepatit-C taşıyıcılığı ile arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Çeşitli araştırma grupları, HCV pozitiflerin %48'inde TTV DNA tespit etmiş ve HCV replikasyon düzeyinin TTV ko-infeksiyonundan etkilenmediğini ortaya koymuşlardır (Watanabe et al., 1999). Hepatit-B ve C'li çocuklarda TTV yüksek oranda bulunmuştur (Okamura et al., 1999; Ren et al., 2001).

Araştırmamızda, ALT düzeyi yüksek olan hastalarda TTV DNA pozitifliği ve negatifliği arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Bundan dolayı, verilerimize göre ALT yükselmesi ile TTV arasında doğrudan bir ilişki kurulamaz. ALT düzeyi ile TTV DNA pozitifliği arasında bir ilişki bulunmadığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Gallian et al., 1999; Yuki et al., 1999; Forns et al., 1999; Shibuya et al., 2001; Utsunomiya et al., 1999).

ALT düzeyi yüksek olan 5 hastadan sadece 2 tanesi TTV DNA pozitif olarak bulunmuş ve HCV RNA pozitif ve TTV DNA pozitif 4 hastadan 3'ünde ALT enzim düzeyinin yüksek olduğu gösterilmiştir. TTV, HCV'ye bağlı hastalık riskini arttırdığı ve ALT ile TTV arasında anlamlı bir ilişki olmadığı ortaya koymuşlardır (Kanamoto-Tanaka et al., 2002).

Okamoto ve ark. (1998a), kronik ALT enzim düzeyi yüksek olan 9 hastadan 5 tanesinin TTV pozitif iken, 4 tanesinin TTV negatif olduğunu ortaya koymuşlardır. Üç tane TTV pozitif HD hastasında ALT düzeyi yüksek bulunmuştur. Bu araştırmacılar, ALT düzeyi yüksek olan 2 hastada klinik başka bir sebep bulunamamış olmasını, bundan TTV'nin sorumlu olabileceği

şeklinde yorumlamışlardır. Ancak, günümüzde tanımlayamadığımız birçok etken olduğu düşünülürse, TTV'nin doğrudan bu artışın sebebi olarak gösterilmesi tartışılabilir bir veridir.

Serum ALT düzeyi HCV ile artarken TTV ile artmadığı, ancak, HCV ve TTV'nin beraber bulunması ALT düzeyinin daha yüksek olmasını sağladığına dair araştırma sonuçları bulunmaktadır. Bu veri de birçok araştırmacı tarafından desteklenmemektedir (Okamura et al., 1999).

HCV RNA pozitif HD hastalarında, TTV pozitif ve TTV negatif hastalarda ALT düzeyinin benzer olduğunu ortaya koyan araştırmalar yapılmıştır. Yine bu hastalarda, TTV pozitif olanların ALT düzeyinin, TTV negatif olanlardan daha yüksek oranlarda bulunduğu dair veriler de mevcuttur (Touinssi et al., 2001). HD hastalarında yapılan bir çalışmada, sadece TTV ile enfekte olmuş hastalarla, TTV'nin yanında HBV, HCV ya da her ikisiyle enfekte olmuş olanlar karşılaştırıldığında diyaliz süresinin önemli olduğu rapor edilmiştir (Gallian et al., 1999).

Bu çalışmada, farklı hemodiyaliz ünitelerinden alınan serum örneklerindeki TTV DNA oranlarında çok farklı sonuçlar bulundu. Belirli bir diyaliz ünitesinden alınan örneklerin hiçbirinde TTV DNA tesbit edilemezken, diğer bir üniteden alınan dört örneğin üçünde TTV DNA tesbit edilmiştir. Bu farklılık, hastaneden yayılım olabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle, bu ünitelerden farklı zamanlarda serum örneklerinin alınarak TTV DNA testi yapılması gereklidir.

HD hastalarında TTV'nin bulunma oranı yüksektir. HD'lerdeki yükseklik bu populasyonların parenteral etkiye maruz kalması ile ilişkili olabilir. HD hastalarında kan ürünlerinin transfüzyonu TTV'nin yayılmasıyla ilgili mekanizma olabilir. Ancak, TTV pozitif hastaların tamamına kan transfüzyonu yapılmadığından dolayı, TTV yayılımının sadece transfüzyon ile olduğunu söylemek mümkün değildir. HD hastalarının TTV pozitif olanlarında genetik heterejonite incelendiğinde bulunan benzerlikler, hastane yoluyla transmisyonunu da ortaya koyabilir. Bu hastalarda TTV'nin diğer

mekanizmalarla (fokal-oral yol) hastaneden yayıldığı düşünülebilir. Elde edilen sonuçlar, TTV'nin HD hastalarında karaciğer hastalıklarına neden olan bir ajan olduğunu ispatlamaz. Fakat TTV, karaciğer enzim düzeylerinde geçici yükselmelere neden olabilir. HD hastalarına politransfüzyon yapılmakta ve birçok riske maruz kalmaktadırlar. Farklı TTV alttipleriyle koinfekte olabilirler. Bir TTV tipiyle infekte olan HD hastasının diğer TTV tipinden korunamadığını ortaya koyan birçok veriye sahibiz. Bunun sonucu olarak bir kişide farklı TTV tipleri bulunabilmektedir.

Gelişmiş ve gelişmekte olan bölgelerde TTV prevalansları ve genotip çeşitlerinde farklılıklar bulunmaktadır. Bunun sebebini açıklayabilecek herhangi bir veriye sahip değiliz.

Belirli bir dönemde TTV DNA pozitif olan hastaların daha sonra TTV DNA negatif olmasını sağlayan etkenlerin neler olabileceği, üzerinde durulması gereken diğer bir konudur. Şu ana kadar yapılan çalışmalar bu durumu açıklayamamaktadır. TTV DNA negatif bireylerin bazıları pozitif hale gelebilmektedir. Bu veri, TTV DNA'nın ilgili bireylere nasıl bulaştığı konusunda birçok problemi beraberinde getirmektedir.

HD hastalarında yüksek TTV prevalansı immün yetmezlikle ilişkilendirilebilir. Ancak, TTV ile alıcı immün sistem arasındaki ilişki ortaya konmamıştır. Bu durum hakkında değerlendirme yapılırken T hücreleri ve monosit hücrelerinin aktivasyonu ile beraber düşünülmelidir. T hücrelerinin aktivasyonu ile TTV arasındaki eğer varsa bir ilişkinin ortaya konulması çok önemli bir veri olacaktır. Periferik kan mononükleer hücrelerinde sitokinlerin üretim durumu HD hastalarında immün yetmezlikle ilgili bir rol oynayabilir.

Çeşitli çalışmalarla TTV DNA pozitif HD hastalarında, TTV replikasyonunun kontrolü ve immün yetmezliğinin tam rolünü açıklamak için TTV viremi düzeyleri ve sitokinlerin üretim düzeyleri arasında ilişkinin ortaya konulması gereklidir.

TTV'nin sağlıklı kişilerde de yüksek oranda tespit edilmesi, bu virüsün insan florasının yesi olduğunu göz önünde tutmayı da gerektirmektedir. Virüs, immün sistemin kontrolü altında suskun kalıp, kontrol zayıfladığı anda çoğalıyor olabilir, çünkü HD hastalarında antikor üretiminin geciktiği ve immün sistemin zayıfladığı bilinmektedir (Touinssi et al., 2001).

TTV'nin belirli bir genotipi, diyaliz hastalarında gerçek genotip olabilir. Ancak, bu verinin doğrulanabilmesi için farklı ülkelerde farklı HD hastası popülasyonlarında araştırma yapılmasına gerek vardır.

KAYNAKLAR

- Akarca, U.S.** Kronik B hepatitinde interferon dışı tedaviler interferon ile yapılan kombinasyonlar. Viral Hepatit 98. 1998;119-31, Viral Hepatitle Savaşım Derneği, İstanbul.
- Akarca, US., Özütemiz, Ö., Canatan, D.** Talasemili hastalarda TT virüs enfeksiyonu. III. Ulusal Hepatoloji Kongresi Bildiri Kitapçığı.1999;41.
- Akbulut, A.** HAV enfeksiyonu Viral Hepatit. Editör: K. Kılıçturgay, Viral Hepatitle Savaşım Derneği, İstanbul. 1998;98:42-64.
- Akkız, S.** HCV Enfeksiyonu, Epidemiyolojisi ve Korunma Yolları. Viral Hepatitle Savaşım Derneği, İstanbul. 1998;98:148-61.
- Alter, HJ., Nakatsuji, Y., Melpoder, J.** The incidence of transfusion-associated hepatitis G virüs infection and its relation to liver disease. N Eng J Med.1997;336:747-54.
- Aydın, K.** HEV enfeksiyonu, epidemiyolojisi. Viral Hepatitle Savaşım Derneği, İstanbul.1998;98:193-200.
- Azzari, C., Resti, M., Moriondo M., Gambineri, E., Rossi, M.E., Novembre, E., Vierucci, A.** Lack of transmission of TT virus through immunoglobulins. Transfusion. 2001;41:1505-8 .
- Balık, İ.,** HBV Enfeksiyonunda İnterferonların Tedavide Kullanımı. Viral Hepatitle Savaşım Derneği, İstanbul. 1998;98:107-118.
- Bandinelli, M., Pistello, M., Maggi, F., Vatteroni, M.L., Freer, G.** Molecular properties, biology and clinical implications of TT virus,

a recently identified widespread infectious agent of humans. *Clinical Microbiology Reviews*. 2001 ; 14:98-113.

Boysen, T., Christensen, J.K., Madsen, C.D., Eugen-Olsen, J., Christense, L.S., Moller-Sorensen, H., Weber, A., Ladefoged, S.D., Krogsgaard, K. Presence and Significance of TT virus in Danish Patients on Maintenance Hemodialysis. *Scand J Urol Nephrol*. 2003;37:259-64.

Camci, C., Guney, C., Balkan, A., Büyükberber, N., Büyükberber, S., Kadayıfçı, A., Kubar, A. The prevalence of TT virus in cancer patients. *New Microbiol*. 2002; 25:463-8.

Campo, N., Brizzolara, R., Sineli, N., Torre, F., Russo, R., Deferrari, G., Picciotto, A. TT virus infection in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2000;15:1823-6.

Charlton, M., Adjei, P., Poterucha, J., Zein, N., Moore, B., Krom, R., Themeau, T., Weisner, R. TT virus infection in North American blood donors, patients with fulminant hepatic failure and cryptogenic cirrhosis. *Hepatology*. 1998;28:839-42.

Chen, H., Wang, Y., Pei, F. A clinical prospective study on maternal-fetal transfusion transmitted virus infection. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*. 2000;35:277-8.

Comar, M., Ansaldi, F., Morandi, L., Dal, G., Foschini P.M., Croce, S., Stanta, G., Tiribelli, C., Campello, C., Bonin, S. *In situ* polymerase chain reaction detection of transfusion transmitted virus in liver biopsy. *J Viral Hepat*. 2002;9:123-7.

Cossart, Y. TTV a common virus, but pathogenic. *Lancet*. 1998;352:164.

Cossart, Y. TTV—a virus searching for a disease. *J Clin Virol*. 2000;17:1-3.

- Dai, Y., Yu, M., Chuang, W.L., Chen, S.C., Lin, Z.Y., Wang, L.Y., Hsie, M.Y., Tsai, J.F., Sung, M.H., Chang, W.Y.** Epidemiology and clinical significance of chronic Hepatitis-Related viruses infection in hemodialysis patients from Taiwan. *Nephron*. 2002;90:148-153.
- Davidson, F., Macdonald, D., Mokili, J.L., Prescott, L.E., Graham, S., Simmonds, P.** Early acquisition of TT virus (TTV) in an area endemic for TTV infection. *J Infect Dis*.1999;179:1070-6.
- Dhenain, M., Bouletreau, A., Bourguignon, F., Poujel, I., Chemin, I., Fabry, J., Vanhems, P.** The TT virus: review of the literature. *Clin Invest Med*. 2000;23:355-65.
- Durmaz, R.,** Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji. Nobel Yayınları, Malatya. 2001.
- Dündar, İ.** Hepatit viruslarında mutasyon ve getirdiği sorunlar. *Viral Hepatitle Savaşım Derneği, İstanbul*.1998;98:329-31.
- Erensoy, S.** HGV enfeksiyonu. *Viral Hepatitle Savaşım Derneği, İstanbul*.1998;98:204-11.
- Erensoy, S., Sayiner, A., Türkoğlu, S., Canatan, D., Akarca, U.S., Sertöz, R., Özacar, T.** TTV infection in Turkish blood donors. *J Microbiological Methods*.1999;38-232.
- Erensoy, S., Sayiner, A., Türkoğlu, S., Canatan, D., Akarca, U.S., Sertöz, R., Özacar, T., Batur, Y., Badur, S., Bilgic, A.** TT virus infection and genotype distribution in blood donors and a group of patients from Turkey. *Infection*. 2002;30:299-302.
- Eroğlu, C.** HDV enfeksiyonu epidemiyolojisi. *Viral Hepatitle Savaşım Derneği, İstanbul*. 1998;98:180-1.

Fodor, B., Ladanyi, E., Aleksza, M., Takacs, M., Lakos, G., Arkossy, O., Koos, A., Nagy, A., Szell, J., Klenk, N., Sarvary, E., Sipka, S. No effect of transfusion transmitted virus viremiya on the distribution and activation of peripheral lymphocytes in hemodialyzed patients. *Nephron*. 2002;92:933-7.

Forns, X., Hegerich, P., Darnell, A., Emerson, S.U., Purcell, R.H., Bukh, J. High Prevalence of TT virus (TTV) Infection in patients on Maintenance Hemodialysis: Frequent Mixed Infections With Different Genotypes and Lack of Evidence of Associated Liver Disease. *J Med Virol*.1999;59:313-7.

Fredericks, N., Relman, A. Sequence-based Identification Of Microbiol Pathogens: A Reconsideration Of Koch's Postulates. *Clin Microbiol Rev*. 1996:18-33.

Gallian, P., Berland, Y., Olmer, M., Raccah, D., de Micco, P., Philippe, M., Biagini, P., Simon, S., Bouchouareb, D., Mourey, C., Roubicek, C., Touinssi, M., Cantaloube, JF., Dussol, B., de Lamballerie, X. TT Virus Infection in French Hemodialysis Patients:Study of Prevalence and Risk Factors. *J Clinical Microbiol*.1999;37:2538-42.

Gallian, P., Biagini, P., Zhong, S., Touinssi, M., Yeo, W., Cantaloube, J.F., Attoui, H., de Micco, P., Johnson, P.J., de Lamballerie, X. TT Virus: a study of moleculer epdemiology and transmission of genotypes1, 2 and 3. *J Clinical Virol*. 2000;17:43-49.

Gürakar, M. A dan Z ye Hepatit. Selçuk Ofset Matbaası, İstanbul. 2000.

He, Z., Zhuhang, H., Wang, X., Song, S., Dong, Q., Yan, J., Buehring, GC., Luo, G. Retrospective analysis of non-A-E hepatitis: possible

role of hepatitis B and C virus infection. *J Med Virol.* 2003; 69:59-65.

Hirata, D., Kaneko, N., Iwamoto, M., Yoshio, T., Okazaki, H., Mimori, A., Masuyama, J., Minota, S. Infection with an unenveloped DNA virus (TTV) associated with non-A to G hepatitis in patients with rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol.* 1998;37:1361-2.

Hsu, H., Ni, Y., Chen, HL., Kao, JH., Chang, MH. TT virus infection in healthy children, children after blood transfusion, and children with non-A to E hepatitis and other liver diseases in Taiwan. *J Med Virol.* 2003; 69:67-71.

Huang, C., Zhou, Y., Chen, R., Detection of TT virus DNA and sequence analysis of partial gene of TTV in sera from blood donors. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi.* 1998; 12:237-40.

Irving, WL., Ball, JK., Berridge, S., Curran, R., Grabowska, A., Jameson, CL., Neal, KR., Ryder, SD., Thomson, BJ. TT virus infection in patients with hepatitis C: Frequency, persistence, and sequence heterogeneity. *J Infect Dis.* 1999;180:27-34.

Kanamoto-Tanaka, Y., Furusyo, N., Nakashima, H., Etoh, Y., Kashiwagi, S., Hayashi, J. TT virus infection in Japanese general population and in hemodialysis patients. *Digestive Diseases and Science.* 2002;47:1915-20.

Kanda, Y., Tanaka, Y., Kami, M., Saito, T., Asai, T., Izutsu, K., Yuji, K., Ogawa, S., Honda, H., Mitani, K., Chiba, S., Yazaki, Y., Hirai, H. TT Virus In Bone Marrow Transplant Recipients. *Blood.* 1999;93:2485-90.

Kao, J., Chen, W., Hsiang, S., Chen, P., Lai, M., Chen, D. Prevalence and implication of TT virus infection: Minimal role in patients with non A-E Hepatitis in Taiwan. *J Med Virol.* 1999;59:307-12.

Kobayashi, M., Chayama, K., Arase, Y., Kobayashi, M., Tsubota, A., Ikeda, K., Koike, H., Hashimoto, M., Kobayashi, M., Kumada, H., Suzuki, Y., Koida, I., Saitoh, S., Murashima, N. Prevalance of TT virus before and after blood transfusion in patients wit chronic liver disease treated surgillary for hepatocelular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol.*1999;14:358-63.

Leblebicioğlu, H. HDV infeksiyonu, klinik bulgular ve tanı. *Viral Hepatitle Savaşım Derneği, İstanbul.*1998;98:182-85.

Li, B., Cheng Y., Hou, J. Cloning and expression of TTV gene fragment in *E. coli* and identification of the expressed protein. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi.* 2000;14:257-60.

Linnen, J., Wages, J. Molecular cloning and disease association of hepatit G virus infection: A transfusion-transmissible agent. *Science.* 1996;27:505-8.

Liu, Z., Luo, K., Zheng, R., Hu, J., He, H. Novel TTV variants isolated in an epidemic hepatitis of unknown etiology. *J Med Virol.* 2002;67:113-7.

Liwen, I., Januszkiewicz-Lewandowska, D., Nowak, J. TT virus characteristics, occurence and routes of transmission. *Przegl Epidemiol.* 2002;56:91-9.

Maggi, F., Pifferi, M., Fornai, C., Andreoli, E., Tempestini, E., Presciuttini, S., Marchi, S., Pietrobelli, A., Boner, A., Pistello, M., Vatteroni, M., Bendinelli, M. TT virus in the nasal secretions

of children with acute respiratory diseases: relations to viremia and disease severity. *J Virol.* 2003;77:2418-25.

Mariscal, LF., Lopez-Alcorocho, J.M., Rodriguez, E., Ortiz-Movil, N., de Lucas, S., Bartolome, J., Carreno, V. TT virus replicates in stimulated but not in nonstimulated peripheral blood mononuclear cells. *Virology.* 2002;310:121-9.

Martinez, N., Garcia, F., Garcia, J., Bernal, C., Garcia, F Jr., Lopez, I., Alvarez, M., Piedrola, G., Maroto, M. Prevalence and Viral Persistence of TT Virus in Patients on Hemodialysis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2000;19:878-880.

Moen, E., Sagedal, S., Bjoro ,K., Degre, M., Opstad, P.K., Grinde, B. Effect of immune modulation on TT virus (TTV) and TTV-like mini-virus (TLMV) viremia. *J Med Virol.* 2003;70:177-82.

Muljono, D., Nishizawa, T., Tsuda, F., Takahashi, M., Okamoto, H. Molecular epidemiology of TT virus and characterization of two novel TTV genotypes in Indonesia. *Arch Virol.* 2001;146:1249-66.

Mushahwar, IK., Erker, JC., Muerhoff, AS., Leary, TP., Simons, JN., Birkenmeyer, LG., Chalmers, ML., Pilot-Matias, TJ, Dexai, SM. Molecular And Biophysical Characterization of TT Virus. Evidence For A New Virus Family Infection Humans. *PNAS USA.* 1999;96:3177-82.

Mutlu, G., İmir, T., Cengiz, T. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji Güneş Kitapevi, İstanbul. 1999.

Naoumov, N., Petrova, P., Thomas, W., Williams, R. Presence of a newly described human DNAvirus (TTV) in patients with liver disease. *Lanset.* 1998;352:195-7.

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 Comm.* 1997;241:92-7.

Oguchi, T., Tanaka, E., Orii, K., Kobayashi, M., Hora, K., Kiyosawa, K. Transmission of and Liver Injury by TT Virus in Patients of Maintenance Hemodialysis. *J Gastroenterol.* 1999;34:234-40.

Okamoto, H., Akahane, Y., Ukita, M., Fukuda, M., Tsuda, F., Miyakawa, Y., Mayumi, M. Fecal Excretion of a Nonenveloped DNA Virus (TTV) Associated With Posttransfusion Non-A-G Hepatitis. *J Med Virol.* 1998a;56:128-32.

Okamoto, H., Kato, N., Lizuka, H., Ukita, M., Mayumi, M., Miyakawa, Y. Molecular Cloning And Characterization of A Novel DNA Virus (TTV) Associated With Posttransfusion Non-A to G Hepatitis (TT Virus) in Plasma And Peripheral Blood Mononuclear Cells. *J Med Virol.* 1999;57:252-8.

Okamoto, H., Nishizawa, T., Kato, N. Molecular Cloning and Characterization of A Novel DNA Virus (TTV) Associated With Posttransfusion Hepatitis of Unknown Etiology. *Hepatol Res.* 1998b;10:1-16.

Okamoto, H., Nishizawa, T., Takahashi, M., Asabe, S., Tsuda, F., Yoshikawa, A. Heterogeneous distribution of TT virus of distinct genotypes multiple tissues from infected humans. *Virology* 2001;288:358-68.

Okamoto, H., Nishizawa, T., Takahashi, M., Tawara, A., Fukai, K., Muramatsu, U., Naito, Y., Yoshikawa, A. Genomic characterization of TT viruses (TTVs) in pigs, Cats and dogs and

their relatedness with species-specific TTVs in primates and tupaia. *J Gen Virol.* 2002;83:1291-7.

Okamura, H., Yoshioka, M., Kubota, M., Kikuta, H., Ishiko, H., Kobayashi, K. Detection of a novel DNA virus (TTV) sequence in peripheral blood mononuclear cells. *J Med Virol.* 1999;58:174-77.

Prati, D., Lin, Y., De Mattei, C., Liu, J.K., Farma, E., Ramaswamy, L., Zanella, A., Lee, H., Rebull, P., Allain, JP., Sirchia, G., Chen, B. A prospective study on TT virus infection in transfusion-dependent patients with beta thalassemia. *Blood.* 1999;93:1502-5.

Ren, H., Dong, H., Zhu, F., Miao, X., Wang, W., Qi, Z. Cloning and phylogenetic analysis of hepatitis-associated T virus subgenome. *Wei Sheng Wu Xue Bao.* 2001;41:408-14.

Saback, FL., Gomes, S.A., de Paula, VS., da Silva, RR., Lewis-Ximenez, LL., Niel, C. Age-Specific Prevalence and Transmission of TT virus. *J Med Virol.* 1999;59:318-22.

Schroter, M., Feucht, H.H., Schafer, P., Zollner, B., Laufs, R., Knodler, B. TT virus viremia and liver transplantation: No significant increase of the prevalence. *Blood.* 1998;92:4877-8.

Schroter, M., Feucht, H., Zolherr, B., Schafer, P., Laufs, R. Prevalence of a novel DNA virus (TTV) among patients on maintenance hemodialysis. *Nephron.* 2001;87:139-142.

Sherman, D.J., Finlayson, N. Diseases of the Gastrointestinal Tract and Liver. Churchill Livingstone, Edinburgh. 1982;483-96.

Shibuya, A., Satomichi, A., Takeuchi, A., Saingenji, K., Sakurai, K., Kobayashi, N., Yoshida, A. Transfusion transmitted virus infection

in patients on maintenance hemodialysis and in hospital workers. *J Hospital Infection*. 2001;47:277-281.

Simmonds, P., Davidson, F., Lycett, C., Macdonald, D., Prescott, L.E., Ellender, J., Yap, P.L., Ludlam, C.A., Haydon, G.H., Gillon, J., Jarvis, L.M. Detection of a novel DNA Virus (TTV) in blood donors and blood products. *Lancet*. 1998;352:191-5.

Stinissen, P., Raus, J., Zhang, J. Autoimmune pathogenesis of multiple sclerosis: Role of autoreactive T lymphocytes and new immunotherapeutic strategies. *Crit Rev Immunol*. 1997;17:33-75.

Sugiyama, K. Goto, K., Ando, T., Mizutani, F., Terabe, K., Kawabe, Y., Wada, Y. Route of TT Virus infection in children. *J Med Virol*. 1999; 59:204-07.

Szenborn, L., Hoehne, M., Zalewska, I., Groska, J., Kacprzak, I., Schreier, E. Detection of TT virus (TTV) in children and young with chronic viral hepatitis B and C . *Med Sci Monit*. 2003;9:29-33.

Szladek, G., Juhasz, A., Asztalos, L., Szoke, K., Schreier, E., Murvai, M., Szarka, K., Konya, J., Veress, G., Gergely, L. Persisting TTV genogroup 1 variants in renal transplant recipients. *Arch Virol*. 2003;148:841-51.

Tabak, F., Mert, A., Ergin, S., Şentürk, H., Aktuğlu, Y. Akut non A-E hepatit olgularında TTV ve diğer virusların rolü. III. Ulusal Hepatoloji Kongresi Bildiri Kitapçığı. 1999;37.

Tacke, M., Kiyosawa, K., Stark K., Schlueter, V., Ofenloch-Haehnle, B., Hess, G., Engel, A.M. Detection of antibodies to a putative G virus envelope protein. *Lancet*. 1997;349:318-21.

- Takacs, M., Balog, K., Toth, G., Balogh, Z., Szomor, K., Brojnas, J., Rusvai, E., Minarovits, J., Berencsi, G.** TT virus in Hungary: sequence heterogeneity and mixed infections. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2003; 35.
- Takahashi, K., Hoshino, H., Ohta, Y., Yoshida N., Mishiro, S.** Very high prevalence of TTV infection in general population of Japan revealed by a new set of PCR primers. *Hepatol Res.* 1998;12:233-39.
- Takata, Y., Kurokawa, H., Fukuda, J.** Transfusion transmitted virus (TTV) in dental patients. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2003;32:184-7.
- Tanaka, Y., Mizokami, M., Orito, E., Nakano, T., Kato, T., Ding, X., Ohno, T., Ueda, R., Tajima, K., Sonoda, S., Hayami, M.** New genotype of TT virus (TTV) infection among Colombian Native Indians. *J Med Virol.* 1999;57:264-8.
- Tanaka, Y., Mizokami, M., Orito, E., Ohno, T., Nakano, T., Kato, T., Kato, H., Mukaide, M., Park, M., Kim, B.S., Ueda, R.** New genotype of TT virus (TTV) and a genotyping assay based on restriction fragment length polymorphism. *FEBS Lett.* 1998;437:201-6.
- Taşyaran, M.A.** Epidemiyoloji ve korunma. *Viral hepatit* 98. 1998;94-101. Viral Hepatitle Savaşım Derneği.
- Thom, K., Morrison, C., Lewis, J.C., Simmonds, P.** Distribution of TTV, TTV-like minivirus, and related viruses in humans and nonhuman primates. *Virology.* 2003;306:324-33.
- Touinssi, M., Gallian, P., Biagini, P., Attoui, H., Vialettes, B., Berland, Y., Tamalet, C., Dhiver, C., Ravaux, I., de Micco, P., De Lamballerie, X.** TT Virus infection: prevalence of elevated viraemia

and arguments for the immune control of viral load. J Clin Virol. 2001;21:135-41.

Tsuda, F., Okamoto, H., Ukita, M., Tanaka, T., Akahane, Y., Konishi, K., Yoshizawa, H., Miyakawa, Y., Mayumi, M. Determination of antibodies to TTV and application to blood donors and patients with posttransfusion non-A to G hepatitis in Japan. J Virol Methods. 1999;77:199-206.

Tunçbilek, S., Coşkun, D., Çetinkaya, F., Hızal, N., Tahtakılıç, P. İstanbul'da Kan Donörlerinde TT Virusü Prevalansının Araştırılması. Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Dergisi, 4:273-7, 1999. 153-7.

Türkoğlu, S., Çakaloğlu, Y., Şentürk, H. TTV'nin farklı hasta gruplarında araştırılması. III. Ulusal Hepatoloji Kongresi Bildiri Kitapçığı, 1999a;41.

Türkoğlu, S., Önel, D., Bozacı, M. TT Virus In Turkish Patients With Fulminant Hepatic Failure And Cryptogenic Liver Disease. Acta Microbiol Immunol Hungarica. 1999b;46:465.

Ukita, M., Okamoto, H., Kato, N., Miyakawa, Y., Mayumi, M. Excretion into bile of a novel unenveloped DNA virus (TT virus) associated with acute and chronic non-A-G hepatitis. J Infect Dis. 1999;179:1245-8.

Utsunomiya, S., Yoshioka, K., Wakita, T., Seno, H., Takagi, K., Ishigami, M., Yano, M., Watanabe, K., Kobayashi, M., Watanabe, K., Kishimoto, H., Kakumu, S. TT virus infection in hemodialysis patients. American J Gastroenterol. 1999;94:3567-3570.

Uzunaliimoğlu, Ö. Viral hepatitlerde ekstrahepatik sendromlar. Viral Hepatite Savaşım Derneği, İstanbul. 1998;98:232-36.

Valtuille, R., Frankel, F., Gomez, F., Moretto, H., Fay, F., Rendo, P., Lef, L., Fernandez, J. The Role of TT virus in patients undergoing hemodialysis. J Clin Gastroenterol. 2002;34:86-8.

Vasconcelos, H.C., Cataldo, M. Niel, C. Mixed infections of adults and children with multiple TTV-like mini virus isolates. J Med Virol. 2002;68:291-8.

Vasconcelos, HC., Gomes, SA., Cataldo, M., Niel, C. Prevalance and genetic diversity of TT virus genotype 21 (YONBAN virus) in Brazil. Arch Virol. 2003;148:517-529.

Verdi, H., Uzunalimoğlu, Ö., Çagsın, H. Türkiye’de Kan Donörleri, Hemodiyaliz Talasemi Major, Behçet ve Lichen Planus Hastalarında TTV Prevalansı. III. Ulusal Hepatoloji Kongresi Bildiri Kitapçığı. 1999:35.

Watanabe, H., Shinzawa, H., Shao, L., Saito, T., Takahashi, T. Relationship of TT Virus Infection With Prevalence Of Hepatitis C Virus Infection And Elevated Alanine Aminotransferase Levels. J Med Virol. 1999;58:235-8.

Yan, H., Lang, Z., Huang, D. Pathogenecity and replication of transfusion transmitted virus in liver tissue by *in situ* hibridization. Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi. 2001;35:10-2.

Yuki, N., Kato, M., Masuzawa, M., Ishida, H., Inoue, T., Tabata, T., Matsushita, Y., Kishimoto, H., Sasaki, Y., Hayashi, N., Hori, M. Clinical Implication of Coinfection With a Novel DNA Virus (TTV) in Hepatitis C Virus Carriers on Maintenance Hemodialysis. J Med Virol. 1999;59:431-436.

- Zehender, G., Manzin, A., de Madelena, C., Colasante, C., Solforosi, L., Corsi, F., Bianchi, A., Girotto, M., Schirru, I., Russo, U., Galli, M., Clamenti, M.** Molecular Epidemiology of TT virus in Italy and Phylogenesis of Viral Isolated from Subjects at Different Risk for Parenteral Exposure. *J Med Virol.* 2001;63:76-84.
- Zhong , S., Yeo, W., Tang, MW., Lin, XR., Mo, F., Ho, WM, Hui, P., Johnson, PJ.** Gross elevation of TT virus genome load in the peripheral blood mononuclear cells of cancer patients. *Ann NY Acad Sci.* 2001;945:84-92.
- Zhou, Y., Dong, J., He, Z.** Cloning and sequencing of a Chinese complete TTV gene. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2000;80:12-5.

ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Kastamonu’da doğdu. İlk ve Ortaöğrenimini Kastamonu’da tamamladı. 1995 yılında Marmara Üniversitesi Atatürk Eğitim Fakültesi Biyoloji Bölümüne girdi. Aynı Fakülteden 1999’da mezun oldu. Halen Biyoloji öğretmenliği yapmaktadır.