

**ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**IRAK HALKI ARASINDA ÇOKLU TRANSFÜZE TALASEMİ
HASTALARINDA VİRÜS (HEPATİT C, B, SİTOMEGALOVİRÜS VE
TOXOPLASMA GONDII) PREVALANSININ SERO-MOLEKÜLER
BELİRTEÇLER İLE BELİRLENMESİ**

Aseel Shakir Ghlaime AL-JAREE

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ÇANKIRI
2024**

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Aseel Shakir Ghilaim AL-JAREE tarafından hazırlanan “**Irak Halkı Arasında Çoklu Transfüze Talasemi Hastalarında Virüs (Hepatit C, B, Sitomegalovirüs ve *Toxoplasma Gondii*) Prevalansının Sero-Moleküler Belirteçler ile Belirlenmesi**” adlı tez çalışması 26/08/2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Melda DÖLARSLAN

Eş Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Naeem Mohammed MOHSEN

Jüri Üyeleri :

Başkan : Doç. Dr. Melda DÖLARSLAN
Fiziki Coğrafya Anabilim Dalı
Ankara Hacı Bayram Veli Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Mine TÜRKTAS
Biyoloji Anabilim Dalı
Gazi Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Serkan GÜLSOY
Toprak İlmi ve Ekolojisi Anabilim Dalı
Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Ebru ÖZDENİZ
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Ebru GÜL
Orman Mühendisliği Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Ersoy YILMAZ

Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum “**Irak Halkı Arasında Çoklu Transfüze Talasemi Hastalarında Virüs (Hepatit C, B, Sitomegalovirüs ve *Toxoplasma Gondii*) Prevalansının Sero-Moleküler Belirteçler ile Belirlenmesi**” konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü’nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan “Bilimsel İntihal Tespit Programı”yla tarandığını, “intihal içermediğini” beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim (26/08/2024).

Aseel Shakir Ghilaim AL-JAREE

ÖZET

Doktora Tezi

IRAK HALKI ARASINDA ÇOKLU TRANSFÜZE TALASEMİ HASTALARINDA VİRÜS (HEPATİT C, B, SİTOMEGALOVİRÜS VE *TOXOPLASMA GONDII*) PREVALANSININ SERO-MOLEKÜLER BELİRTEÇLER İLE BELİRLENMESİ

Aseel Shakir Ghlaime AL-JAREE

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç Dr. Melda DÖLARSLAN

Eş Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Naeem Mohammed MOHSEN

Talasemi, genler yoluyla bireyler arasında aktarılan kalıtsal bir hastalıktır. Şu ana kadar genetik modifikasyon dışında herhangi bir tedavisi kanıtlanmamıştır. Talasemi transfüzyonu yapılan hastaların çoğu, donörlerin kanı yoluyla hastalıkların bulaşmasından şikâyetçidir. Bu çalışma, immünolojik ve serolojik testlerden daha etkili ve doğru olduğu düşünülen moleküler tanının gerekliliğini vurgulamaktadır. Bu bağlamda çalışmamızda, Örneklerin toplanması ve moleküler serolojik belirteçlerin çalışılması tamamlandıktan sonra, Irak nüfusuna aktarılan talasemi hastaları arasında virüs (hepatit C ve B, Sitomegalovirüs ve *Toxoplasma gondii*) prevalansının sero-moleküler belirteçler ile araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya 500 beta-talasemi major hastası katılmıştır. Hastaların %67'si erkek, %33'ü kadın olup yaş aralığı 5±50 yıl arasında değişmektedir. Çalışmaya katılan hastaların serum örneklerinde IgG ve IgM'yi tespit etmek için ELISA, virüs miktarını belirlemek için ise PCR testi kullanılmıştır. Mevcut ticari ELISA ve PCR kitlerine göre, Hepatit B ve HBVsAg IgG taşıyan 16 örnek (9 erkek, 7 kadın), Hepatit B ve HBVsAg IgM taşıyan 7 örnek (4 erkek, 3 kadın) tespit edilmiştir. HBV-PCR 5 hastada (3 erkek, 2 kadın) pozitif bulunmuştur, viral olmayan 144 talasemi hastasında ise tüm kontrol sonuçları negative olarak belirlenmiştir. Hepatit C tipi HCVA b IgG'nin 27 erkek, 19 kadın olmak üzere 46 hastada pozitifdir. HCVA b IgM hastalarında ise 16'sı erkek, 10'u kadın olmak üzere 26 hasta pozitif olarak belirlenmiştir. PCR incelemesinde ise 12'si erkek ve 8'i kadın olmak üzere 20 hasta pozitif tespit edilmiştir. Talasemi hastalarının örneklerinde de sonuç negatiftir. CMV-IgG 317 hastadan 267'sinde pozitif olup bunların 139'u kadın, 128'i erkek olarak dağılım göstermiştir. Kontrol grubunda IgG, 60 erkek ve 70 kadında pozitifdir. Sitomegalovirüs IgM, erkek ve kadınlarda sırasıyla 17 ve 30 olmak üzere 47 kişide pozitif bulunmuştur. CMV-IgM moleküler belirteçlerle 12 kadın ve 16 erkek olmak üzere 28 kişide pozitif bulunmuştur. Toksoplazmoz IgG, erkeklerde 18, kadınlarda 22 olmak üzere 40 pozitif hasta bulunurken, enfeksiyonu olmayan talasemi hastalarında 3 erkek ve 3 kadında pozitifdir. Ayrıca *Toxoplasma gondii* IgM ve PCR test sonuçları tüm hasta ve kontrollerde negatif bulunmuştur. Bu sonuçlara göre, iki teknik olan immünolojik ve moleküler tanı arasında önemli bir fark olduğu ve immünoglobulinlerin uzun süre kalabilmesi nedeniyle

immünolojik tanıya güvenmenin mümkün olmadığı, ancak antijenlerin varlığının enfeksiyon için bir gösterge olduğu bulunmuştur. Benzer şekilde, enfeksiyon erkekler ve kadınlar arasında farklılık göstermiş ve genel olarak kadınlar daha az enfekte olmuştur, ancak Sitomegalovirüs enfeksiyonu kadınlarda daha yüksek değerler almıştır. Enfeksiyonların çoğu tekrarlanan kan transfüzyonları yoluyla meydana geldiğinden, donör kanının moleküler tanısının doğrulanması önerilmektedir. Diğer patojenlerin araştırılması da talasemi hastalarının yanı sıra donörler için de dikkate alınmalıdır.



2024, 89 sayfa

ANAHTAR KELİMELEER: Hepatit B, Hepatit C, Moleküler, Sitomegalovirüs, Talasemi, *Toxoplasma gondii*

ABSTRACT

PhD Thesis

SERO-MOLECULAR MARKERS STUDY PREVALENCE ON THE VIRUS (HEPATITIS C, B, CYTOMEGALOVIRUS, AND *TOXOPLASMA GONDII*) AMONG MULTI-TRANSFUSED THALASSEMIA AMONG IRAQI PEOPLE\WASIT CITY

Aseel Shakir Ghilaim AL-JAREE

Çankırı Karatekin University
Institute of Graduate Studies
Department of Biology

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Melda DÖLARSLAN
Co-Advisor: Asst. Prof. Dr. Naeem Mohammed MOHSEN

Thalassaemia is an inherited disease transmitted between individuals through genes. So far, no treatment other than genetic modification has been proven. Most patients receiving thalassaemia transfusions complain of disease transmission through the blood of donors. This study emphasises the necessity of molecular diagnosis, which is more effective and accurate than immunological and serological tests. In this context, our study aimed to investigate the prevalence of viruses (hepatitis C and B, Cytomegalovirus and *Toxoplasma gondii*) among thalassaemia patients transferred to the Iraqi population by sero-molecular markers after the collection of samples and the study of molecular serological markers were completed. The study included 500 beta-thalassaemia major patients. 67% of the patients were male, 33% were female and the age range was 5±50 years. ELISA was used to detect IgG and IgM and PCR test was used to determine the amount of virus in the serum samples of the patients participating in the study. According to available commercial ELISA and PCR kits, 16 samples (9 males, 7 females) carrying Hepatitis B and HBVsAg IgG and 7 samples (4 males, 3 females) carrying Hepatitis B and HBVsAg IgM were detected. HBV-PCR was positive in 5 patients (3 males, 2 females) and all control results were negative in 144 non-viral thalassaemia patients. Hepatitis C type HCVAb IgG was positive in 46 patients (27 males, 19 females). HCVAb IgM was positive in 26 patients, 16 males and 10 females. In PCR examination, 20 patients, 12 males and 8 females, were found positive. The results were also negative in the samples of thalassaemia patients. CMV-IgG was positive in 267 of 317 patients, of whom 139 were female and 128 were male. In the control group, IgG was positive in 60 males and 70 females. Cytomegalovirus IgM was positive in 47 patients, 17 and 30 in males and females, respectively. CMV-IgM was found positive by molecular markers in 28 individuals, 12 females and 16 males. Toxoplasmosis IgG was positive in 40 patients, 18 in males and 22 in females, while it was positive in 3 males and 3 females in thalassaemia patients without infection. In addition, *Toxoplasma gondii* IgM and PCR test results were negative in all patients and controls. According to these results, it was found that there is a significant difference between the two techniques, immunological and molecular diagnosis, and that it is not possible to rely on immunological diagnosis

because immunoglobulins can remain for a long time, but the presence of antigens is an indicator for infection. Similarly, infection differed between men and women, and overall women were less infected, but Cytomegalovirus infection had higher values in women. As most infections occur through repeated blood transfusions, confirmation of molecular diagnosis of donor blood is recommended. Investigation of other pathogens should also be considered for donors as well as thalassaemia patients.



2024, 89 pages

Keywords: Hepatitis B, Hepatitis C, Molecular, Cytomegalovirus, Thalassemia, *Toxoplasma gondii*

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Tez danışmanım Doç. Dr. Melda DÖLARSLAN'a sabrı, rehberliği ve anlayışı için teşekkür ederim.

Aseel Shakir Ghlain AL-JAREE

Çankırı, Ağustos 2024



İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER DİZİNİ	ix
KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	3
2.1 Talasemi	3
2.2 Talasemi Türleri.....	3
2.2.1 Alfa-talasemi (α -talasemi)	3
2.2.2 Beta-talasemi (β -talasemi).....	4
2.3 Epidemiyoloji.....	6
2.4 Patofizyoloji	7
2.5 Talasemi Hastalarında Kan Transfüzyonu	8
2.6 Talasemi Tanısı	9
2.7 Talasemi Sendromunun Hastalıkla İlişkili Komplikasyonları	10
2.8 Talasemi Tedavisi.....	11
2.8.1 Splenektomi.....	11
2.8.2 Demir şelasyon tedavisi	12
2.8.3 Kemik iliği nakli.....	12
2.8.4 Kan nakli	13
2.8.5 Gen terapisi	13
2.8.6 Hematopoietik kök hücre nakli	13
2.9 Virüslerin Kan Yoluyla Bulaşması.....	14
2.9.1 Hepatit	14
2.9.2 Sitomegalovirüs.....	20
2.9.3 <i>Toxoplasma gondii</i>	24

3. MATERYAL VE METOT	28
3.1 Materyal	28
3.1.1 Cihaz ve ekipman.....	28
3.1.2 Kimyasal ve biyolojik malzemeler	29
3.2 Yöntem	29
3.2.1 Çalışma grupları	29
3.2.2 Kan örneklerinin toplanması.....	30
3.2.3 Laboratuvar çalışmaları	31
3.2.4 Moleküler analiz	38
3.3 İstatistiksel Analiz	54
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	55
4.1 Demografik Bulgular	60
4.2 Erkek ve Kadınlar Arasındaki Dağılım	60
4.3 Biyokimyasal Sonuçlar	61
4.3.1 Demir parametreleri.....	61
4.3.2 Karaciğer fonksiyon testi	63
4.4 Hepatit B Virüsü için Viral Yük Sonuçları	64
4.5 HBV'nin Serolojik Tanıya Bağlı Dağılımı	65
4.6 HBV'nin Cinsiyete Göre Dağılımı	65
4.7 HBV'nin Yaşa Bağlı Dağılımı	66
4.8 Hepatit C Virüsü için Viral Yük Sonuçları	67
4.9 HCV'nin Serolojik Tanıya Bağlı Dağılımı	68
4.10HCV'nin Cinsiyete Göre Dağılımı	69
4.11HCV'nin Yaşa Bağlı Dağılımı	70
4.12CMV için Viral Yük Sonuçları	71
4.13CMV'nin Serolojik Tanıya Bağlı Dağılımı	72
4.14CMV'nin Cinsiyete Göre Dağılımı	73
4.15CMV'nin Yaşa Bağlı Dağılımı	74
4.16Toxoplasma gondii'nin Moleküler Tanısı.....	75
4.17Toxoplasma gondii'nin Serolojik Tanıya Bağlı Dağılımı	75
4.18Tokso plazmanın Cinsiyete Göre Dağılımı	76
4.19Tokso plazmanın Yaşa Bağlı Dağılımı	77

5. SONUÇ VE ÖNERİLER	78
KAYNAKLAR	80
ÖZGEÇMİŞ.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.



SİMGELER DİZİNİ

±	Artı, eksi
°C	Derece santigrat
dL	Desilitre
g	Gram
µL	Mikrolitre
mL	Mililitre
mm	Milimete
nm	Nanometre
%	Yüzde



KISALTMALAR DİZİNİ

DFX	Deferasiroks
DFP	Deferipron
DFO	Deferoksamin
HBV	Hepatit B
HCV	Hepatit C
CE	Kapiller bölge elektroforezi
CMV	Sitomegalovirüs
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Talasemi majör ve Talasemi intermedia arasındaki laboratuvar ve klinik farklılıklar	8
Şekil 2.2 Talasemi kriterleri.....	10
Şekil 2.3 1980-2018 yılları arasında HBV, HCV ve HIV için birim başına enfeksiyon riski.....	14
Şekil 2.4 Hepatit B virüsü (HBV) replikasyon döngüsü (Jawetz <i>et al.</i> 1977).....	16
Şekil 2.5 Akut Hepatit B'deki serolojik belirteçler	17
Şekil 3.1 Çalışma tasarımı	31
Şekil 4.1 Erkek ve kadınlar arasındaki dağılım	61
Şekil 4.2 Hepatit B virüsü için viral yük sonuçları.....	64
Şekil 4.3 HBV'nin serolojik tanıya bağlı dağılımı.....	65
Şekil 4.4 HBV'nin cinsiyete göre dağılımı	66
Şekil 4.5 HBV'nin yaşa bağlı dağılımı	67
Şekil 4.6 RT-qPCR viral yük HCV için amplifikasyon grafiği.....	68
Şekil 4.7 HCV'nin serolojik tanıya bağlı dağılımı.....	69
Şekil 4.8 HCV'nin cinsiyete bağlı dağılımı	70
Şekil 4.9 HCV'nin yaşa bağlı dağılımı	71
Şekil 4.10 RT-qPCR viral yük CMV için amplifikasyon grafiği	72
Şekil 4.11 CMV'nin serolojik tanıya bağlı dağılımı	73
Şekil 4.12 CMV'nin cinsiyete bağlı dağılımı.....	74
Şekil 4.13 CMV'nin yaşa bağlı dağılımı.....	74
Şekil 4.14 RT-qPCR yük toksoplazma kontrolü için amplifikasyon grafiği.....	75
Şekil 4.15 <i>Toxoplasma gondii</i> 'nin serolojik tanıya bağlı dağılımı	76
Şekil 4.16 Parazitin cinsiyete bağlı dağılımı	77
Şekil 4.17 Parazitin yaşa bağlı dağılımı.....	77

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1	HBV sınıflandırılması (Ali <i>et al.</i> 2021)	15
Çizelge 2.2	HCV sınıflandırması (Ali <i>et al.</i> 2021)	18
Çizelge 2.3	CMV sınıflandırması (Arvin <i>et al.</i> 2007)	21
Çizelge 2.4	Toksoplazma sınıflandırması (Balcha <i>et al.</i> 2020)	24
Çizelge 3.1	Çalışmada kullanılan cihaz ve ekipmanlar	28
Çizelge 3.2	Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler	29
Çizelge 3.3	Kan DNA ekstraksiyon kiti bileşenleri	38
Çizelge 3.4	Viral nükleik asit ekstraksiyon kiti bileşenleri	39
Çizelge 3.5	HBV kantifikasyonu içerik kiti	41
Çizelge 3.6	Liyofilize reaktifi	43
Çizelge 3.7	Kontrol konsantrasyonları I	43
Çizelge 3.8	Kalibratörler HCV (HEX/Sarı) I	43
Çizelge 3.9	HBV için gerçek zamanlı PCR programı	44
Çizelge 3.10	HCV kantifikasyon içerik kiti	45
Çizelge 3.11	Kontrol konsantrasyonları II	47
Çizelge 3.12	Kalibratörler HCV (HEX/Sarı) II	47
Çizelge 3.13	HCV için gerçek zamanlı PCR programı	48
Çizelge 3.14	CMV nitel içerik kiti	49
Çizelge 3.15	TaqMan PCR negatif kontrol hazırlığı	50
Çizelge 3.16	TaqMan PCR CMV deneme hazırlığı	51
Çizelge 3.17	TaqMan PCR pozitif kontrol hazırlığı	51
Çizelge 3.18	CMV TaqMan PCR programı	51
Çizelge 3.19	Analiz sonuçlarının yorumlanması (CMV)	51
Çizelge 3.20	<i>Toxoplasma gondii</i> nitel içerik kiti	52
Çizelge 3.21	TaqMan PCR negatif kontrol hazırlığı	53
Çizelge 3.22	TaqMan PCR <i>Toxoplasma gondii</i> testi hazırlanması	53
Çizelge 3.23	TaqMan PCR pozitif kontrol hazırlığı	54
Çizelge 3.24	<i>Toxoplasma gondii</i> TaqMan PCR programı	54
Çizelge 3.25	Analiz sonuçlarının yorumlanması (<i>Toxoplasma gondii</i>)	54
Çizelge 4.1	HBV, HCV, CMV, <i>Toxoplasma gondii</i> ve kontrollerin sıklığı	60
Çizelge 4.2	Enfeksiyonlar arasında demir, TIBC, Serum ferritin	61
Çizelge 4.3	Çalışılan grupların karaciğer fonksiyon sonuçları	63

1. GİRİŞ

Talasemi, globin proteinindeki bir mutasyonun neden olduğu kalıtsal bir hastalıktır. Kırmızı kan hücrelerini yok eder, bozulana kadar aktivitelerini yeniden kazanmalarını zorlaştırır, kırmızı kan hücrelerini azaltır ve eritropoezise yol açar.

Bir veya daha fazla α -globin zincirinin eksikliği veya yetersiz sentezi ile karakterize alfa talasemi minör ve majör olmak üzere iki tip alfa talasemi vardır. Beta talaseminin, hemoglobin alt birimi beta (beta globin zinciri) sentezinin olmaması veya azalmasından kaynaklanan β -talasemi major ve β -talasemi intermedia olmak üzere iki önemli formu vardır (Al-Mosawy 2017).

Talasemi hastaları sık sık kan transfüzyonuna ihtiyaç duyar ve bu nedenle aşırı demir yükü artar. Bunu yaparken, birçok patojen donörlerden talasemi hastalarına bulaşır ve aşırı demir yükü, hepatik aşırı demir yükü gastrointestinal demir hiperabsorpsiyonu ve diğer hastalıklar dahil olmak üzere birçok komplikasyona yol açar (Faraj and Al-Abedy 2021).

Talasemi ve anormal hemoglobin teşhisi, otomatik hematoloji analizörü ile kırmızı kan hücrelerinin ölçümü, Hb analizi ve Hb A2 ve Hb F'nin miktar tayini dahil olmak üzere laboratuvar testlerinin bir kombinasyonunu gerektirir. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve kapiller bölge elektroforezi (CE) sistemi talasemi hastalıklarını ve taşıyıcılarını ayırt edebilir (Munkongdee *et al.* 2020).

Hepatit B (HBV), hepatit C (HCV), Sitomegalovirüs (CMV) ve diğerleri gibi donörden kan transfüzyonu yoluyla talasemi hastalarına aktarılan birçok virüs türü vardır.

Talasemi hastalarına bulaşan Hepatit B, C, CMV ve Toxoplasma gondii patojenleri, virüs içeren sık kan transfüzyonları nedeniyle maruz kalmaktadır.

Bu patojenler talasemi hastaları için birçok komplikasyona neden olmaktadır. İmmünolojik ve serolojik yöntemler bu patojenlerin tanısını koymaktadır, ancak moleküler tanı bu patojenler için en doğru yöntem olmaya devam etmektedir. Bu nedenle, talasemi hastalarına transfer edilmeden önce donör kanı doğrulanmalıdır.



2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Talasemi

Talasemi, globin proteinindeki bir mutasyondan kaynaklanan kalıtsal bir hastalıktır. Kırmızı kan hücrelerini yok eder, bozulana kadar aktivitelerini geri kazanmalarını zorlaştırır, kırmızı kan hücrelerini azaltır ve eritropoezise yol açar.

Bu bozukluk, kırmızı kan hücrelerinin oksijen taşıyan bileşeni olan hemoglobinin (HB) alfa ve beta zincirlerinin sentezinin azalmasına neden olur. Bu proteinlerin üretilmemesi oksijen taşınamaması ve çocukluktan itibaren kansızlık anlamına gelir (Bajwa 2023).

2.2 Talasemi Türleri

2.2.1 Alfa-talasemi (α -talasemi)

Alfa talasemi (α -talasemi), bir veya daha fazla α -globin zincirinin eksikliği veya yetersiz sentezi ile karakterizedir. α -globin genleri HBA1 ve HBA2 olmak üzere iki tipten oluşur ve 16p13.3 kromozomlarında bulunur. Suudi popülasyonunda keşfedilen HBA12 adında başka bir α -globin geni türü daha vardır. HBA12, Suudi nüfusunun %5,7'sinde HBA2'nin yerini almıştır. HBA12, HBA2 ve HBA1 gen dizilerinin gen dönüşümü ile oluşmuştur (Alhuthali *et al.* 2023).

Globinin alfa zincirlerinin üretiminin azalması veya kaybedilmesi, alfa-talasemi adı verilen bir anemi türünde genetik bir kusura yol açar (Galanello and Cao 2011).

Alfa talasemi, kırmızı kan hücrelerinde oksijen taşımaktan sorumlu protein olan hemoglobin üretiminin azalmasıyla karakterize genetik bir kan hastalığıdır. Hemoglobinin alfa globin zincirlerinin yapımı için talimatlar sağlayan genlerdeki mutasyonlardan kaynaklanır (Leung *et al.* 2008).

Normalde, 16. kromozomun her bir kopyasında iki tane olmak üzere dört alfa globin geni vardır. Alfa talaseminin şiddeti, etkilenen genlerin sayısına bağlıdır:

- Sessiz Taşıyıcı: Bu formda, dört alfa globin geninden biri eksik veya işlevsizdir. Sessiz taşıyıcı alfa talasemisi olan kişiler genellikle sağlıklıdır ve herhangi bir belirti yaşamazlar.
- Alfa Talasemi Minör: Dört alfa globin geninden ikisi eksik veya işlevsizdir. Alfa talasemi özelliği olan bireyler hafif anemiye sahip olabilir ve yorgunluk gibi hafif semptomlar yaşayabilir.
- Hemoglobin H Hastalığı: Dört alfa globin geninden üçü eksik veya işlevsizdir. Hemoglobin H hastalığı orta ila şiddetli anemiye neden olur ve bireyler soluk cilt, yorgunluk, halsizlik ve dalak büyümesi gibi daha önemli semptomlar yaşayabilir. Tedavi kan transfüzyonu ve folik asit takviyesini içerebilir.
- Alfa Talasemi Major: Dört alfa globin geninin tümü eksik veya işlevsizdir. Alfa talasemi majör, genellikle doğumdan önce veya erken bebeklik döneminde teşhis edilen durumun ciddi bir şeklidir. Hayatı tehdit eden anemiye, karaciğer ve dalak büyümesine, kemik deformitelerine ve diğer komplikasyonlara neden olabilir. Tedavi genellikle düzenli kan nakli ve diğer destekleyici önlemleri içerir.

Alfa talasemi, Güneydoğu Asya, Çin, Filipin ve Akdeniz kökenli bireyler gibi yüksek prevalansa sahip popülasyonlarda daha yaygın olarak görülür. Alfa talasemili çocuk sahibi olma riski taşıyan aileler için genetik danışmanlık ve doğum öncesi testler mevcuttur (Motiani *et al.* 2024).

2.2.2 Beta-talasemi (β -talasemi)

Beta-talaseminin iki önemli formu vardır: β -talasemi major ve β -talasemi intermedia, hemoglobin alt birimi beta (beta globin zinciri) sentezinin olmaması veya azalmasından kaynaklanır. β -talasemi majörlü bireyler 6 ay ile 2 yaş arasında şiddetli anemi, zayıf kilo, bodur büyüme, hafif sarılık ve hepatosplenomegali nedeniyle solukluk ile hastaneye başvururlar. Beslenme sorunları, ishal, sinirlilik ve tekrarlayan ateş nöbetleri görülebilir.

Düzenli kırmızı kan hücresi transfüzyonu ve demir şelasyon tedavisi ile tedavi, normal büyüme ve gelişmeyi sağlar ve prognozu iyileştirir. Aşırı demir yüklenmesiyle ilişkili uzun vadeli komplikasyonlar arasında büyüme geriliği, dilate kardiyomiyopati, karaciğer hastalığı ve endokrinopatiler yer alır.

β -talasemi intermediyalı bireyler, erken çocukluk döneminden itibaren düzenli kırmızı kan hücresi transfüzyonu gerektirmeyen daha hafif anemi nedeniyle daha değişken bir başvuru yaşına sahiptir. Ek klinik özellikler arasında sarılık, kolelitiazis, hepatosplenomegali, iskelet değişiklikleri (uzun kemik deformiteleri, kraniyofasiyal deformiteler ve osteoporoz), bacak ülserleri, pulmoner hipertansiyon, hiperplastik eritroid iliğinin ekstramedüller kitleleri ve artmış trombotik komplikasyon riski yer alabilir. β -talasemi intermediyalı bireyler, etkisiz eritropoezin neden olduğu demir metabolizması düzensizliğinin bir sonucu olarak artan bağırsak demir emilimi nedeniyle ikincil demir artışı riski altındadır.

α -talasemi eşit derecede heterojendir. Daha hafif formlar (α -talasemi 2 veya α^+ -talasemi olarak adlandırılır) bir α globin gen delesyonundan kaynaklanır ve homozigot durumlarında hafif anemi üretirler. α -talasemi 1 veya α^- talasemi 0 ise aynı kromozom üzerindeki iki α globin geninin delesyonu nedeniyle α globin zinciri sentezinin yokluğu ile ilişkilidir. Homozigot durumlarda, talaseminin en ağır formu olan Hb Bart hidrops fetalisi ile sonuçlanır. α -talasemi 2 ve α -talasemi 1 için bileşik heterozigot durumlar, şiddeti değişen Hb H hastalığı ile sonuçlanır; daha şiddetli uçta bir TDT olabilir.

Talasemi moleküler düzeyde son derece heterojendir; β -talasemili hastalarda β globin genlerinde 200'den fazla farklı mutasyon bulunmuştur ve α -talasemi moleküler patolojilerinde neredeyse aynı çeşitliliktedir. Bununla birlikte, küresel popülasyonun belirli bir bölgeye özgü birkaç yaygın mutasyonla birlikte değişen sayıda nadir mutasyon taşıdığı görülmektedir (Munkongdee *et al.* 2020).

2.3 Epidemiyoloji

Talasemi Yunanca deniz anlamına gelen “Thalassa” ve Latince kan anlamına gelen, -emia kelimesinden oluşmaktadır. Hastalık ilk olarak Akdeniz toplumunda tanımlanmış ve Akdeniz anemisi olarak adlandırılmıştır. Talasemi en yaygın hemoglobinopatidir ve dünya nüfusunun %5'inin talaseminin en az bir varyant alelini taşıdığı tahmin edilmektedir.

Talasemi genellikle otozomal resesif kalıtım paterni gösterse de bazı talasemi türleri nadiren dominant kalıtım paternine sahiptir.

Alfa-talasemi (α -talasemi) Akdeniz ülkeleri, Hint alt kıtası, Orta Doğu, Güney Çin ve Güneydoğu Asya'da yaygındır (Huang *et al.* 2019).

Talasemi prevalansı, Kuzey Amerika, Kuzey Avrupa, Avustralya ve Güney Kore de dahil olmak üzere diğer bölgelerdeki göçmen nüfusundaki artış nedeniyle son yıllarda artmıştır. Küresel nüfusun yaklaşık %7'sinin talasemi taşıyıcısı olduğu tahmin edilmektedir (Lee *et al.* 2021).

Suudi Arabistan'da orak hücreli anemi ve beta-talasemi sırasıyla 1000 nüfus başına 49,6 ve 13,6'dır (Alhuthali *et al.* 2023). α -talasemi de Kuzey bölgesinde %0,4'ten Doğu bölgesinde %5,9'a kadar değişen oranlarda yaygındır ve orak hücre hastalığı ve beta-talasemi ile birlikte kalıtılır (Alharbi *et al.* 2021).

Talasemi Akdeniz bölgesi, Kuzey ve Batı Afrika, Orta Doğu, Hint alt kıtası, güney Uzak Doğu ve güneydoğu Asya'da daha yaygındır. B-talasemi Doğu Akdeniz bölgesi insanlarında yaygın olarak görülmektedir. İran, β -talasemi mutasyonlarının sıklığının yüksek olduğu ülkelerden biridir ve 25000 β -talasemi major (β -TM) hastası bulunmaktadır. Talasemi mutasyonlarının en yüksek prevalansı (yaklaşık %10) kuzey ve güney İran'dan bildirilmiştir. Diğer bölgelerdeki prevalansının %4-8 olduğu tahmin edilmektedir. β -globin (HBB) geninde β -globin zincirlerinin sentezinin azalmasına veya

hiç sentezlenmemesine neden olan mutasyonlar tanınmıştır, popülasyon çalışmaları bu alellerden 40'ının dünyadaki çoğu β -talasemi vakasından sorumlu olduğunu göstermektedir.

α -talasemi sendromlarına yol açan en yaygın mutasyonlar delesyonel varyantlardır, nokta mutasyonları ve küçük insersiyonlar/delesyonlar ise nadiren ortaya çıkabilir. Dünya çapında 750'den fazla farklı α -globin geni varyantı rapor edilmiştir (Khedri *et al.* 2020).

2.4 Patofizyoloji

Talasemi, alfa globin ve beta globin arasındaki dengenin bozulduğu bir hastalık grubudur. Bu dengesizlik bir veya daha fazla globin geninin üretimindeki azalmadan kaynaklanır. Azalan globin zinciri, eritrosit öncüllerinde çökelen (etkisiz eritropoez) veya nihayetinde dolaşımda yok olan (hemoliz) kalan globinlerin eşleşmemesine neden olur (Longo *et al.* 2021) Sonuç olarak, hastalarda değişen derecelerde anemi ve ekstramedüller hematopoez görülür. Beta talasemi genellikle nokta mutasyonları ile gelişirken, alfa talasemi çoğunlukla delesyonel mutasyonlarla gelişir (Bajwa 2023). Beta talasemide mutasyon “missense” mutasyon ise bu durum β^+ olarak adlandırılan beta globin zincir sentezinin azalmasına neden olur. “Nonsense” mutasyonlarda ise β^0 , beta globin sentezinin olmadığı bir fenotiptir. Eğer iki beta globin geninden biri mutasyon taşıyorsa, bu bireyler talasemi taşıyıcısı veya talasemi minörü olarak adlandırılır ve genellikle klinik olarak asemptomatiktir. Beta globin geninde homozigot veya bileşik heterozigot talasemi mutasyonu olan bireyler talasemi majör veya talasemi intermedia fenotipi ile ortaya çıkabilir. Talasemi majör ve intermedia arasında ayırım yapmak için çeşitli klinik ve laboratuvar bulguları göz önünde bulundurulmalıdır (Şekil 2.1).

	□ - talasemi majör	□ - talasemi intermedia
Başlangıç (yıl)	<2	>2
Hemoglobin (gr/dL)	<7	8-10
Hepatosplenomegali	Şiddetli	Hafif ile Orta
HbF (%)	>50	10-50
HbF: Fetal hemoglobin		

Şekil 2.1 Talasemi majör ve Talasemi intermedia arasındaki laboratuvar ve klinik farklılıklar

2.5 Talasemi Hastalarında Kan Transfüzyonu

Talasemi hastaları için kan transfüzyonu ve demir şelasyonu, hastayı mümkün olduğunca uzun süre hayatta tuttuğu için talasemi hastaları için en önemli unsurlar arasındadır. Talasemi hastaları için daha büyük risk oluşturan virüsler gibi bazı patojen türlerinin transferidir (Ragab *et al.* 2013).

Çoğu araştırmada kabul edilen kan transfüzyonundan kaynaklanan en önemli komplikasyonlardan biri, periyodik kan transfüzyonu alan talasemi hastalarında demir depolarının birikiminin artmasıdır. Bu birikimin dalak üzerinde doğrudan bir etkiye sahip olmak gibi başka etkileri de olabilir, bu nedenle bazılarının zaman zaman demiri geri çekmesi gerekir (Patterson *et al.* 2022).

Hepatositler, demirin emilim yoluyla duodenumdan, makrofajlardan ve hepatositlerden plazmaya girmesini önleyerek düzenlenmesinde rolü olan bir hepsidin hormonu üretir.

Demir yüklü anemi, eritrosit aşırı yükünün etkilerine karşı koyarak hepsidin tarafından kontrol edilir.

Kronik kan transfüzyonu yapılan hastalarda, artan demir depoları veya kırmızı kan hücrelerinin etkisizliği nedeniyle hepsidin konsantrasyonu transfüzyon yapılmayan hastalara göre daha yüksektir (Bhowmik *et al.* 2023).

2.6 Talasemi Tanısı

Hemoglobin, talasemi tanısı için esastır, kırmızı kan hücresi belirteçlerinin ölçümü de dahil olmak üzere birçok anormal laboratuvar testi, otomatik kan analizörleri ve hemoglobin, hemoglobin A2 ve hemoglobin F analizi ile gerçekleştirilir. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve kapiler elektroforez (CE) sistemleri, talasemi ve taşıyıcıları arasında ayırım yapabilir ve manuel yöntemlere alternatif olarak yaygın şekilde kullanılır.

Bu sistemler hemoglobin miktarını ve kalitesini yüksek doğrulukla tahmin eder ve birden fazla kez tekrarlanabilir. Bu sistemler, spesifik talasemi mutasyonlarının doğumdan önce ve sonra teşhis edilmesini sağlar. talasemi DNA ile tespit edilebilir ve mutasyonları tespit etmek için çeşitli teknikler kullanılır. Ek olarak, talasemi genotiplemesi gerçek zamanlı dizileme (PCR) ve ardından bir erime eğrisi ile gerçekleştirilir.

Son zamanlarda, nükleer genetik tarama ile genetik dizileme talasemi tanısına uygulanmıştır (Munkongdee *et al.* 2020).

Transfüzyona bağımlı olmayan talasemi (NTDT) olarak adlandırılan beta talasemi intermedia (BTI)'da, HbA azalır, HbF ve HbA2 artar, hastalar düzenli bir transfüzyon rejimine ihtiyaç duymaz; bir yıl içinde beş kereden az transfüze edilir. Ebeveynler de hemoglobin elektroforezi ile talasemi taşıyıcılığı açısından taranmalıdır, ancak nadir durumlarda moleküler tanı yapılabilir.

Beta talasemi major (BTM) hastaları transfüzyona bağımlıdır. Laboratuvar özellikleri Beta talasemi intermedia ile benzerdir. Ancak HbA sentezi BTI'ye göre azalır, hemoglobin elektroforezinde HbA görülmez ve HbF total hemoglobinin %80'inden fazladır (Aksu 2021).

Talasemi, kırmızı kan hücrelerinin ölçülmesiyle anemiye dayalı olarak teşhis edilir ve göstergeleri talasemi olasılığını gösterir. Bu nedenle, moleküler tanı, ebeveynlerin

kromozomlarını inceleyerek veya fetüsün doğumundan önce durumun ortaya çıkmadan önce teşhis edilmesinde önemli bir role sahiptir. Talasemi ve hemoglobinopatiler için kriterler Şekil 2.2’de özetlenmiştir.

		β -TM	β -TI	H β E / β Thal	HbH
Hb düzeyleri		<5g/dL	-7 - 10 gr/dL	Hafif Orta/Siddetli Haşin	9-12 gr/dL 6-7 gr/dL 4-5 gr/dL
KAN LEKELERİ	Düşük Hb Üretimi	Kırmızı hücre hipokromi mikrositoz, Hedef hücreler			
	hemoliz	Düzensiz şekilde çentiklenmiş kırmızı kan hücreleri, artan retikülositler [5 - 10%]			
	Etkisiz eritropoez	Çekirdekli alyuvarlar, bazofilik çizgili hücreler			
	Özel Özellikler	+Çok sayıda F hücresi/Asit elüsyonu	+F-hücreleri/Asit Elüsyonu	+DCIP boyama [HbE] +F hücreleri/Asit Elüsyonu	HbH kapsayıcılık organları
Hemoglobin çalışması		HbF %100 HbA2'ye kadar↑	HbF 10 - 50% [en fazla %100] HbA2 > %4	HbE [%40-60] HbF [%60-40] +HbA [□-thal ile] HbA2↑	Değişken HbH [0,8-40%] HbA2 ↓ a-varyantlarının varlığı örneğin Hb CS, Hb PS vb.
DNA analizi		- Hem 30 hem de □ - thal mutasyonlarının bilinen yaygın mutasyonları Popülasyona özgü setlerde PCR tabanlı yöntemlerle tarama yapılabilir. - Nadir veya alışılmadık mutasyonlar için doğrudan dizileme veya dizi analizi gereklidir □-TI için diğer analizler arasında α- ve □- globin düzenlemeleri, Xmn I polimorfizmi ve γ-globin ekspresyonu için diğer QTL'ler yer aldı			7 yaygın a-thal delesyonu için Gap-PCR ve delesyonsuz mutasyonlar için RDB geliştirildi. Bilinmeyen mutasyonlar için MLPA analizi ve dizileme gereklidir

Şekil 2.2 Talasemi kriterleri

2.7 Talasemi Sendromunun Hastalıkla İlişkili Komplikasyonları

- Pulmoner hipertansiyon, Ekokardiyografi yapıldığında pulmoner hipertansiyon ve sağ ventrikül sistolik basıncının 36 mmHg'nin üzerinde olması (Kanwar *et al.* 2021).
- Kalp yetmezliği, Framingham kriterlerine göre kalp yetmezliğinin belirti ve bulguları olarak tanımlanmaktadır.
- Diyabetes mellitus, Açlık plazma glikozunun 126 mg/dL olması olarak tanımlanır.
- Hematopoez, kan hücresi üretimi olarak tanımlanır, klinik olarak üretimlerindeki herhangi bir değişiklik kan sorunlarına yol açar ve hastada klinik semptomların görülmesine neden olur ve ultrasonografi, bilgisayarlı tomografi taraması (BT taraması) veya manyetik rezonans görüntüleme (MRG) ile teşhis edilir.
- Safra kesesi taşları talasemi hastalarını etkileyen bir komplikasyondur ve ultrasonla teşhis edilir.

- Hipotiroidizm, kanda TSH düzeyinin artması olarak tanımlanır ve talasemi hastalarını da etkileyen bir komplikasyondur.
- Osteoporoz, tahmini T-skoru $< 2,5$ SD t olan kemik yoğunluğunun azalmış seviyesi olarak tanımlanır ve talasemi hastalarında en önemli komplikasyonlardan biri olarak kabul edilir (Sözen *et al.* 2017).
- Tromboz, belirtileri klinik olarak bazı klinik göstergelerle ortaya çıkan ve bilgisayarlı tomografi anjiyogramı (BT anjiyogram), bilgisayarlı tomografi taraması (BT taraması), venografi, anjiyografi, doppler ultrasonografi veya manyetik rezonans görüntüleme (MRG) dahil olmak üzere çeşitli tekniklerle teşhis edilen bir trombüs veya pıhtı varlığı olarak tanımlanır.
- Talasemi hastalarında, özellikle sürekli kan transfüzyonları ile kendilerine geçen ve kan ve beyin-omurilik sıvısını enfekte eden bazı patojenlerle enfeksiyona bağlı olarak bazı komplikasyonlar ortaya çıkabilmektedir.
- Bacak ülseri, bacaklarda kronik venöz ülserlerin varlığıdır (Chuncharunee *et al.* 2019).

2.8 Talasemi Tedavisi

Talasemi hastalarında hafif kansızlık şikâyeti olanlar için düzenli takip dışında bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır. Bazı durumlarda kan nakline ihtiyaç duyulur.

Bazen akut talasemi intermedia tedavisinde bazı komplikasyonların ve mekanik bozuklukların da eşlik ettiği hipersplenizm görülmekte, bu durum bazen splenektomiye yol açmaktadır (Ali *et al.* 2021).

2.8.1 Splenektomi

Talasemi major ve intermedia'da şiddetli hemolizi indükler ve erken yaşta dalağın büyümesini önler. Düzenli kan transfüzyonundan sonra, kan transfüzyonu gereksinimlerini, hemoglobin seviyelerini ve demir birikimini azaltarak kötü sağlık ve

gecikmiş büyümeden korunmak için beş ile on yaş arasındaki çocuklarda hipersplenizm gelişimi meydana gelebilir.

Transfüzyon gereksinimleri %70 hematokrit ile 200-220 mL RBC/kg'dan ve yılda %60 hematokrit ile 250-275 mL/kg paketlenmiş RBC'den daha fazladır (Pecorari *et al.* 2008).

Dalak alınmadan önce meningokok ve pnömoni gibi bazı hastalıklara karşı aşılardan ve penisilin gibi bazı antibiyotiklerin alınması önerilir (Ikeda *et al.* 2005).

2.8.2 Demir şelasyon tedavisi

Demir şelatörleri, kan transfüzyonlarını yönetmek için önemlidir, çünkü her kırmızı kan hücresi (RBC) (200 mg) demir içerir ve bunun sonucunda günde 0,3-0,6 mg/kg demir birikimi olur. Üç sınıf demir şelatörü arasında deferasiroks (DFX), deferipron (DFP) ve deferoksamin (DFO) bulunur. *Streptomyces pilosus*'tan türetilen deferoksamin, karaciğer parankimal hücrelerine girer ve demiri şelatlar. Önerilen dozaj, transfüzyondan sonra aşırı yüklenen demir miktarına bağlı olarak değişir. Yapay bir bileşik olan deferipron, plazmada 1,5-4 saatlik bir yarı ömre sahiptir ve günlük 75 mg/kg önerilir. Biyoakümülatif bir şelatör olan deferasiroks (DFX), bağırsağa batırılır ve transfüzyon aşırı yükü olan kişilere günde bir kez oral olarak önerilir (Reddy *et al.* 2022).

2.8.3 Kemik iliği nakli

Kemik iliği transplantasyonu talasemi hastaları için ana etkili tedavidir. Operasyon başarılı kabul edilir ve ölüm oranı %3'e ulaşmıştır, ancak insan lökosit antijenlerine sahip uyumlu bir donör gerektirdiğinden iliğin bağışıklık sistemi tarafından reddedilmesi gibi bazı sorunlar yaşanabilir ve reddetme oranı %23, ölüm oranı ise %7'dir.

Düşük ekonomik düzeye sahip ülkelerde, etkili tedavinin sürekli kırmızı hücre transfüzyonuna ek olarak fazla demirden kurtulmak olduğu bir gerçektir (Reddy *et al.* 2022).

2.8.4 Kan nakli

β -talasemi majörde transfüzyon rehabilitasyonu plazma hemoglobin düzeylerini korumayı ve endojen eritropoezden kaynaklanan anemiye düzeltmeyi amaçlar. Kan transfüzyonu tedavisi, ciddi anemi vakalarında tanıdan sonra başlatılmalıdır. $Hb > 7$ g/dL olan bireyler büyüme geriliği, splenomegali, yüz değişiklikleri ve kemik genişlemesini izlemelidir. Çoklu kırmızı hücre antikorlarının gelişmesi ve uygun donör bulma zorluğu nedeniyle düzenli kan iletimi ikinci-üçüncü yıldan sonra gerçekleşmelidir. Kan transfüzyonunun sıklığı hematokrit ve hemoglobin düzeyleri gibi faktörlere bağlıdır (Ali *et al.* 2021).

2.8.5 Gen terapisi

FDA betibeglogeni onayladı Ağustos 2022'de β -talasemi için ilk hücre bazlı gen tedavisi olan autotemcel (beti-cel). Bu tek seferlik tedavi, β -globin ($\beta A-T87Q$) gen mutasyonları olan 5-50 yaş arası transfüzyona bağımlı β -talasemi hastalarını hedef alır. Tedavi, periferik kan hematopoietik kök hücrelerini harekete geçirmeyi, CD34+ hücreleri izole etmeyi ve bunları bir lentivirüs vektörüyle dönüştürmeyi içerir. Hastalar miyeloablatif şartlandırmaya tabi tutulur ve intravenöz olarak beti-cel alırlar. Tedavi, şiddetli demir yüklenmesi olan hastalarda araştırılmamıştır (Arya and Sahi 2023).

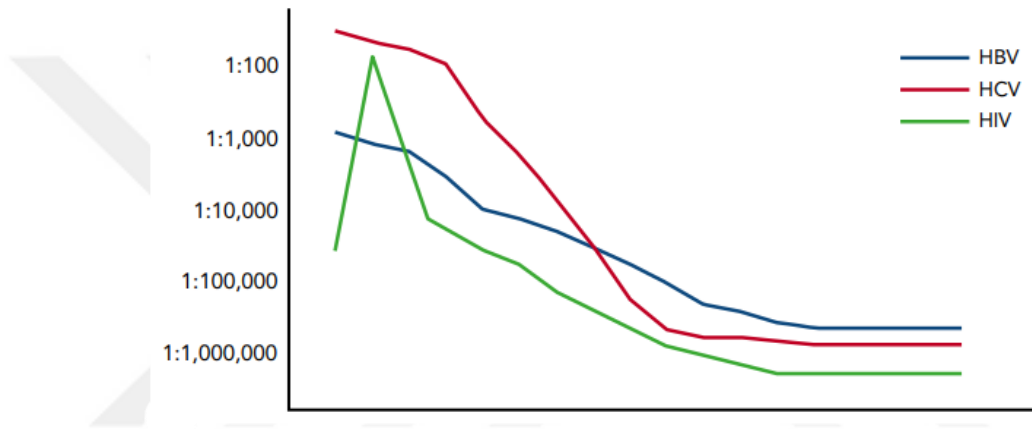
2.8.6 Hematopoietik kök hücre nakli

β -talasemi majörde transfüzyon rehabilitasyonu, plazma hemoglobin düzeylerini korumayı ve endojen eritropoezin neden olduğu anemiye düzeltmeyi amaçlar. Ağır anemi vakalarında tanı konulduktan sonra kan transfüzyonu tedavisine başlanmalıdır. $Hb > 7$ g/dL olan bireylerde büyüme geriliği, splenomegali, yüz değişiklikleri ve kemik büyümesi izlenmelidir. Çoklu kırmızı hücre antikorlarının gelişmesi ve uygun donör bulma zorluğu nedeniyle düzenli kan nakli ikinci-üçüncü yıldan sonra yapılmalıdır. Kan transfüzyonunun sıklığı hematokrit ve hemoglobin seviyeleri gibi faktörlere bağlıdır (Ali *et al.* 2021).

2.9 Virüslerin Kan Yoluyla Bulaşması

Birçok virüs, iğne yoluyla, doğrudan kan nakliyle ve ayrıca anneden plasenta veya emzirilen çocuk aracılığıyla fetüse bulaşabilir.

Kan yoluyla bulaşan virüslere örnek olarak HIV, viral hepatit B ve C tipleri, herpes tipleri, özellikle CMV ve diğer virüsler verilebilir (Busch *et al.* 2019) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3 1980-2018 yılları arasında HBV, HCV ve HIV için birim başına enfeksiyon riski

2.9.1 Hepatit

Viral hepatit, beş etkenin neden olduğu karaciğerle ilişkili sistemik bir hastalıktır: HAV, HBV, HCV, HDV ve HEV. Yetişkinlerde ve çocuklarda görülen akut vakalara öncelikle HAV, HBV, HCV, HDV veya HEV neden olur.

Sarı humma, sitomegalovirüs, Epstein-Barr, herpes simpleks, kızamıkçık ve enterovirüs gibi virüslerin neden olduğu sporadik hepatit, akut karaciğer iltihabı, ateş, gastrointestinal semptomlar ve sarılığa neden olur (Jawetz *et al.* 1977).

2.9.1.1 Hepatit tip B

HBV'nin sınıflandırılması Çizelge 2.1'de gösterimiştir.

Çizelge 2.1 HBV sınıflandırılması (Ali *et al.* 2021)

Alem	<i>Pararnavirae</i>
Filum	<i>Artvervircetes</i>
Sınıf	<i>Revraviricetes</i>
Ordo	<i>Blubervirales</i>
Familya	<i>Hepadnaviridae</i>
Cins	<i>Orthohepadnavirus</i>
Tür	<i>Orthohepadnavirus B</i>

Hepatit B'nin özellikleri; Hepatit B (HBV), özellikle bebeklerde kronik enfeksiyonlara neden olarak karaciğer hastalığına ve hepatoselüler karsinoma yol açar. Elektron mikroskobu üç morfolojik form ortaya koymaktadır: 22 nm'lik küresel partiküller, tübüler veya filamentöz formlar ve daha büyük, 42 nm'lik küresel virionlar. Dış yüzey HBsAg ve 27 nm'lik bir iç nükleokapsid çekirdeği içerir. Değişken kaldırma yoğunluklarına sahip genetik olarak heterojen partiküller gözlenir.

HBV, tamamlanmamış dairesel çift sarmallı DNA'ya sahip zarflı bir virüstür. Virion içinde DNA polimeraz kullanarak döl genom DNA'sı sentezler.

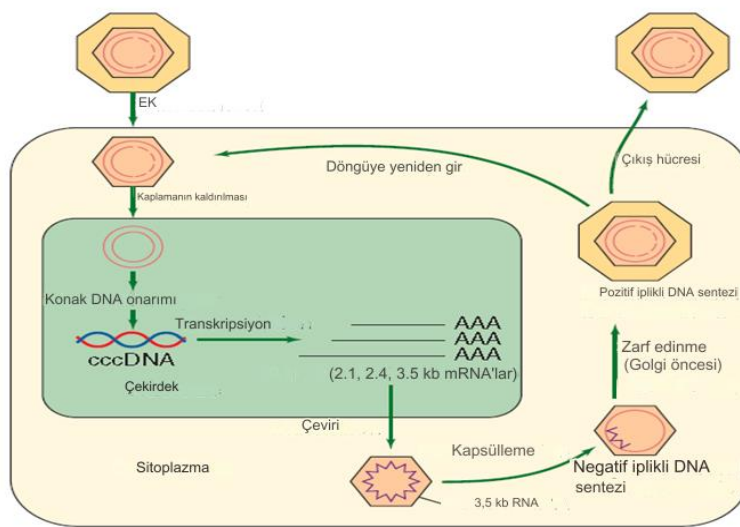
Hepatit B virüsü (HBsAg), yapısal proteinler, transkripsiyonel bir transaktivatör ve büyük bir polimeraz proteini dahil olmak üzere yedi polipeptidi kodlayan dört açık okuma çerçevesine sahiptir. S geni majör HBsAg'yi kodlarken, C geni HBcAg ve HBe proteinini kodlar. HBsAg partikülleri antijenik olarak karmaşıktır ve adw, ayw, adr ve ayr olmak üzere dört fenotipi vardır. Bu belirteçler epidemiyolojik araştırmalarda faydalıdır. HBsAg ve enfeksiyöz ajan -20°C'de 20 yıldan uzun süre stabildir ve 6 saate kadar 2,4 pH ile yok edilebilir.

Virüs zarfa bağlanır, zarfını kaybeder ve çift sarmallı genom kovalent olarak kapalı çift sarmallı dairesel DNA'ya dönüştürülür, bu da yeni sentezlenen HBcAg genomunun ön-RNA'sı da dahil olmak üzere viral kopyaların geri kalanı için bir şablon görevi görür.

Çekirdeğin içinde, polimeraz enzimi negatif sarmallı bir DNA kopyasının ters transkripsiyonu ile sentezlenir ve enzim pozitif bir DNA sarmalı sentezlemeye başlar, süreç tamamlanmaz, HBsAg içeren zarf çekirdekleri pre-Golgi membranlarından tomurcuklanır, bu süreç tekrarlanır virüs kan yoluyla, doğum sırasında ve cinsel yolla bulaşır (Jawetz *et al.* 1977).

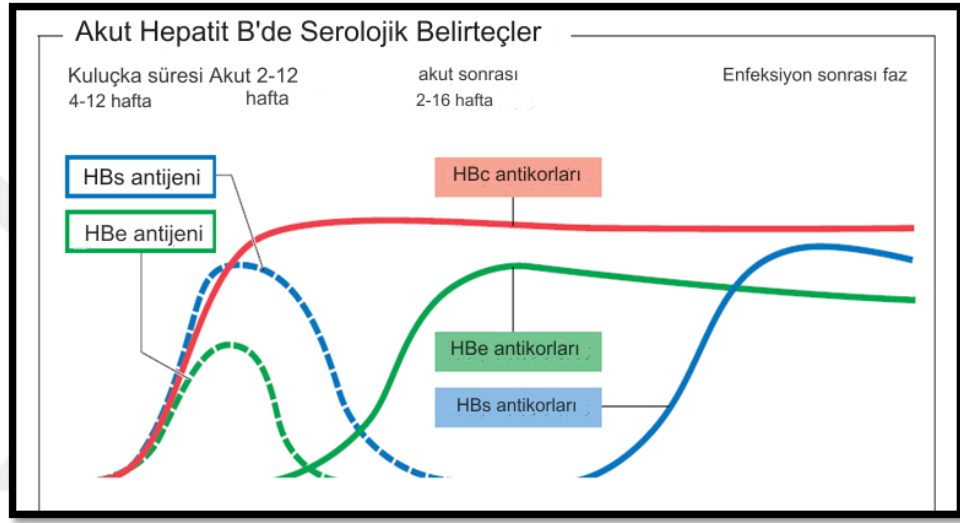
Patogenezi; Sitotoksik (CD8) T hücrelerinin immün saldırısına bağlı hepatoselüler hasar ve kronik taşıyıcılık durumu yetişkin enfeksiyonlarının %5'inde, yenidoğan enfeksiyonlarının ise %90'ında görülür. Çünkü yenidoğanlarda sitotoksik T hücresi aktivitesi zayıftır. Kronik taşıyıcılık durumu kronik hepatit, siroz ve hepatoselüler karsinoma yol açabilir.

Hepatoselüler karsinom, viral DNA'nın bir kısmının hepatosit DNA'sına entegrasyonu ve ardından HBx proteininin sentezi ile ilişkili olabilir. Antijen-antikor kompleksleri artrit, döküntü ve glomerulonefrite neden olur (Şekil 2.4).



Şekil 2.4 Hepatit B virüsü (HBV) replikasyon döngüsü (Jawetz *et al.* 1977)

Hepatit B'nin laboratuvar tanısı; Hepatit B, çeşitli HBV antijenlerinin veya bunlara karşı yönlendirilmiş antikorların tanımlanmasıyla teşhis edilir. Hem antijenler hem de antikorlar, katı faz testi (enzim immünoassay) kullanılarak hastanın kanında tespit edilebilir. Bireysel bileşenler belirli desenlerde ortaya çıkar. Şekil 2.5, HBV enfeksiyonlarının laboratuvar tanısında yol gösterici ilkelerin dayandığı, komplikasyonsuz bir hepatit B enfeksiyonundaki fazların sırasını gösterir (Kayser *et al.* 2005).



Şekil 2.5 Akut Hepatit B'deki serolojik belirteçler

Serum veya plazmadaki çekirdek antijenin tespiti ve kantifikasyonu enzim bağlantılı immünosorbent analizi (EIA) kullanır. Bu, Avrupa'da yaygın olarak kullanılır ve özellikle hedef kararlılığı, basit enstrümantasyon ve maliyet nedeniyle kaynak sınırlı ortamlarda küresel olarak mevcuttur.

10 IU/mL aralığında çok düşük tespit limitlerine sahip hedef amplifikasyon teknikleri (transkripsiyon aracılı amplifikasyon [TMA] veya ters transkripsiyon gerçek zamanlı PCR [RT-gerçek zamanlı PCR]) yöntemleri kullanılarak ölçülebilir.

Hepatit B'nin talasemi ile ilişkisi; Hepatit B virüsü, talasemi hastalarının virüs içeren kan nakillerine sıkça maruz kalmaları nedeniyle maruz kaldıkları hastalıklardan biridir. Bu

virüsün beş formu vardır: akut HBV, kronik HBV, fulminat HBV, asemptomatik HBV ve gizli HBV enfeksiyonu (Amirhashchi *et al.* 2022).

Yapılan çalışmalar, viral hepatit B'ye karşı bağışıklamanın, donörler ve alıcılar arasında kan yoluyla virüsün bulaşma düzeyini azalttığını ve böylece özellikle talasemi hastalarında bu virüsle enfeksiyonu azalttığını göstermiştir (Al-Sharifi *et al.* 2019).

Son zamanlarda yapılan bazı çalışmalar, bu tanının yüzey ve çekirdek antijenlerinin varlığına bağlı olması ve bu nedenle yanlış pozitif sonuç alınabilmesi nedeniyle, ELISA ile onaylanmış tanıya ek olarak, doğrulayıcı tanı olarak donör kanının moleküler tanısının ve hepatit B virüsü ile enfekte olmadığından emin olunmasının gerekliliğini önermiştir. Bu nedenle, yüzey antijeninin (sHBV) PCR ile moleküler teşhisi belirleyicidir (Naz *et al.* 2023)

2.9.1.2 Hepatit tip C

HCV'nin sınıflandırılması Çizelge 2.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.2 HCV sınıflandırması (Ali *et al.* 2021)

Alem	<i>Orthornavira</i>
Filum	<i>Kitrinoviricota</i>
Sınıf	<i>Flasuviiricetes</i>
Ordo	<i>Amarilloviral</i>
Familya	<i>Flaviviridae</i>
Cins	<i>Hepacivirus</i>
Tür	<i>Hepacivirus B</i>

Hepatit C'nin özellikleri; Hepatit C; hepatosellüler karsinom ile ilişkilidir. HCV, Amerika Birleşik Devletleri'nde en yaygın kan yoluyla bulaşan patojendir. Tek zincirli, pozitif polariteli RNA'nın bir parçasına sahip zarflı virüs. Virionda polimeraz yoktur. HCV'nin birden fazla serotipi vardır. Bulaşmanın çoğu perinatal veya kan yoluyla. Cinsel bulaşma daha az yaygındır (Levinson 2018).

Hepatit virüsü pozitif yönlü bir RNA virüsü olup, RNA dizi analizleri sonucunda altı genotipe ve 100'den fazla alt tipe ayrıldığı belirlenmiştir. Nükleotid düzeyinde suşlar arasında %25-35 oranında, alt tipler arasında ise %15-25 oranında farklılık bulunmaktadır.

Genom, bir çekirdek proteini, bir zarf glikoproteini ve çeşitli yapısal olmayan proteinleri kodlar; cDNA transkriptlerinin ifade edilmesiyle Hepatit C'ye karşı antikorlar için serolojik testler geliştirilmiştir.

HCV bulaşması sonucu gelişen hepatit vakalarının büyük çoğunluğu (%70-90) kronik hepatite yol açmaktadır. Kronik aktif hepatit veya siroz geliştirme riski altında olan çok sayıda insan vardır (%10-20). HCV'li enfekte bireylerin (%1-5)'inde; hepatosellüler karsinom ve dünya çapında kansere neden olabilir.

Patogenez; Kronik HCV enfeksiyonu hepatik lezyonlara neden olur, Hepatositlerde lipid birikiminin neden olduğu bir lezyon olan steatoz, virüs kaynaklı steatozdan sorumlu olan HCV genotipi 3 ile bağlantılı tek lezyondur, diğer HCV genotipleriyle enfekte olmuş hastalarda ise bu lezyonun varlığı esas olarak ekzojen metabolik faktörlerle ilişkilidir. Transfekte HCV çekirdek proteininin doğal enfeksiyon sırasında steatozdaki rolü hala bilinmemektedir. Steatoz, karaciğer fibrozunun ilerlemesiyle bağlantılıdır, ancak bu esas olarak genotip 1 HCV hastalarında görülür.

Kronik hepatit C karaciğer hasarına öncelikle portal lenfoid infiltrasyon, fokal nekroz ve dejeneratif lobüler lezyonlar neden olur. Bu lezyonlar, spesifik T hücrelerinin birikmesiyle güçlendirilebilen lokal bağışıklık tepkisine atfedilir. Karaciğer lezyonlarının şiddeti, lokal Th1 sitokinleri ve CTL tepkileriyle bağlantılıdır (Pawlotsky 2004).

Hepatit C'nin laboratuvar tanısı;

- Tarama: Hepatit C virüsünün (HCV) taranması, HCV antikor (Ab) için serolojik test ile yapılır.

- Kesinleştirici: Kronik HCV tanısı için HCV viral yükü adı verilen HCV RNA'sının varlığı gerekir.
- Genotip: HCV RNA'sının mevcut olduğu belirlenir, genotip testi ile virüsün spesifik genotipi ve alt tipi işaretlenebilir.
- İlaç direnci: HCV'deki bazı proteinlerin mutasyonları, virüsün doğrudan etkili antivirallere (DAA'lar) karşı direnç göstermesine yol açabilir; bunlara yaygın olarak dirençle ilişkili varyantlar (RAV'ler) veya dirençle ilişkili polimorfizmler (RAP'ler) denir.

Hepatit C'nin talasemi ile ilişkisi; Hepatit C, diyaliz, talasemi ve benzeri kan nakli gerektiren hastalarda en tehlikeli ve ölümcül virüs türlerinden biridir.

Bu virüs, periyodik kan transfüzyonlarına bağlı olduğundan, dünya genelinde talasemi hastalarında en fazla morbidite ve mortaliteye neden olan virüstür (Kandi *et al.* 2021).

Son araştırmalar, Hepatit C'nin modern bir tanı yöntemiyle teşhis edilmesinin gerekliliğini ortaya koymaktadır. Çünkü bu sayede, virüsün donörden alıcıya geçme riski azalır.

Çalışmaya göre talasemi hastalarında viral hepatitlerin siroz, böbrek yetmezliği ve kardiyovasküler komplikasyonlara ek olarak başka komplikasyonlara da yol açtığı ve hastaların yaklaşık %40,5'inde morbiditeye neden olduğu belirtilmiştir (Moghimbeygi and Alavian 2020).

2.9.2 Sitomegalovirüs

CMV, insan hastalıklarının yaygın bir nedeni olan herpes virüsüdür. CMV, ciddi anormalliklere yol açabilen konjenital enfeksiyonun nedenidir. Belirsiz enfeksiyon çocukluk ve ergenlik döneminde yaygındır. Ciddi CMV enfeksiyonları sıklıkla bağışıklık sistemi baskılanmış yetişkinlerde görülür. CMV enfeksiyonları, CMV ile enfekte olmuş

hücrelerin intranükleer inklüzyon cisimcikleri ile büyük ölçüde büyüme eğiliminden kaynaklanan sitomegalik inklüzyon hastalığı olarak ortaya çıkabilir.

CMV sınıflandırması Çizelge 2.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 2.3 CMV sınıflandırması (Arvin *et al.* 2007)

Alem	<i>Orthornavira</i>
Filum	<i>Kitrinoviricota</i>
Sınıf	<i>Flasuviiricetes</i>
Ordo	<i>Amarillovirala</i>
Familya	<i>Flaviviridae</i>
Cins	<i>Hepacivirus</i>
Tür	<i>Hepacivirus B</i>

CMV'nin özellikleri; CMV, insan herpesvirüslerinin en büyük genetik içeriğine sahiptir. DNA genomu (240 kbp), HSV'ninkinden önemli ölçüde daha büyüktür. Virüs tarafından kodlanan birçok proteinden yalnızca birkaçı (~200) karakterize edilmiştir. Bir hücre yüzey glikoproteini olan Fc reseptörü olarak işlev gören ve spesifik olmayan bir şekilde bağlanabilen konsantrasyonu nedeniyle bilinen en güçlü güçlendiricilerden biridir.

Hücrel transkripsiyon faktörleri için bağlanma bölgelerini yabancı genlerin yüksek düzeyde ifadesini desteklemek için deneysel olarak kullanılır. İnsan popülasyonunda genetik olarak farklı birçok CMV suşu dolaşmaktadır. Ancak suşlar antijenik olarak yeterince ilişkilidir, bu nedenle suş antijenik farklılıkları muhtemelen insan hastalığında önemli belirleyiciler değildir. CMV'ler türe ve hücre tipine çok özgüdür. Hayvanları insan CMV'siyle enfekte etme girişimlerinin hepsi başarısız olmuştur. Hepsi türe özgü olan bir dizi hayvan CMV'si vardır.

İnsan CMV'si in vitro yalnızca insan fibroblastlarında çoğalır, ancak virüs genellikle konakçının epitel hücrelerinden izole edilir. CMV, kültürlenmiş hücrelerde yavaş çoğalır ve büyüme HSV'den daha yavaş ilerler. Çok az virüs hücresiz hale gelir; enfeksiyon öncelikle hücreden hücreye yayılır. Kültürlenmiş hücrelerin tüm bir tek katmanının dahil olması birkaç hafta sürebilir. CMV karakteristik bir sitopatik etki üretir.

Perinükleer sitoplazmik inklüzyonlar, herpesvir slere özgü intranükleer inkl zyonlara ek olarak oluşur. Çok  ekirdekli hücreler görülür. Etkilenen birçok hücre büyük ölçüde büyür. Inkl zyon taşıyan sitomegalik hücreler, enfekte bireylerden alınan örneklerde bulunabilir.

Patogene ; CMV, virüs taşıyan materyalle yakın temas gerektiren çeşitli yollarla kişiden kişiye bula abilir. Normal büyük çocuklarda ve yetişkinlerde viral maruziyetten sonra 4 ile 8 haftalık bir kuluçka dönemi vardır. Virüs sistemik bir enfeksiyona neden olur; akciğer, karaciğer, yemek borusu, kolon, böbrekler, monositler ve T ve B lenfositlerinden izole edilmiştir. Hastalık, enfeksiyöz mononükleoz benzeri bir sendrom olarak ortaya çıkabilir, ancak çoğu CMV enfeksiyonu subkliniklidir. Tüm herpesvir slere benzer şekilde, CMV yaşam boyu latent enfeksiyonlar oluşturur. Virüs, birincil enfeksiyondan aylarca veya yıllarca sonra aralıklı olarak farenksten ve idrar yoluyla yayılabilir. B bre in uzun süreli CMV enfeksiyonu normal kişilerde zararlı görünmemektedir. Tükürük bezi tutulumu yaygındır ve muhtemelen kroniktir. Hücre aracılı bağışıklık, birincil enfeksiyonlarda baskılanır ve bu, viral enfeksiyonun devam etmesine katkıda bulunabilir. Hücresel yanıtların iyileşmesi birkaç ay sürebilir.

CMV'nin laboratuvar tanısı; Akut maternal CMV enfeksiyonunun immünoglobulin (Ig)M ve düşük aviditeli IgG'nin varlığı ile tanısı, tipik olarak amniyon sıvısında CMV için polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) testleri kullanılarak gerçekleştirilen fetal enfeksiyonun do rulanmasını gerektirir. Yaşamın ilk iki haftası içinde elde edilen idrar ve t k r  n viral kültürü, konjenital olarak enfekte bebeklerin tanısı için altın standart olmaya devam etmektedir. Yenido anlardan alınan kurutulmuş kan lekelerinin PCR testlerinin, evrensel tarama amaçları için konjenital CMV enfeksiyonu olan çoğu yenidoğanın tanımlanması için yeterli duyarlılıktan yoksun olduğu gösterilmiştir. Ancak, tükürük PCR testleri  u anda konjenital CMV enfeksiyonu için yararlı bir tarama yöntemi olarak değerlendirilmektedir. Ba ı ıklık sistemi baskılanmış konakta, fosfoprotein 65 antijenemisi ve kan veya plazmanın CMV gerçek zamanlı PCR'si gibi daha yeni hızlı tanı testleri   nleyici tedaviye izin vererek morbidite ve mortaliteyi azaltmıştır. Ancak, standardize edilmiş gerçek zamanlı PCR protokollerinin eksikliği, farklı merkezlerden gelen verilerin kar ıla tırılmasını ve immün sistemi baskılanmış bireylerde invaziv CMV

enfeksiyonlarının yönetimi için tek tip kılavuzların geliştirilmesini engellemektedir (Ross *et al.* 2011).

PCR analizleri kan, BOS ve idrarda dolaşan virüsü tespit etmek için kullanılır. PCR analizleri, immün sistemi baskılanmış hastalarda CMV hastalığını tahmin etmek için kullanılabilen kantitatif viral yük verileri sağlayabilir. Viral antijenlere karşı monoklonal antikorlar, hastalardan virüs pozitif lökositleri tespit etmek için kullanılabilir.

Birçok test türü, geçmiş enfeksiyonu (ve yeniden aktivasyona uğrama potansiyelini) gösteren CMV IgG antikorlarını tespit edebilir. Viral IgM antikorlarının tespiti, yakın zamanda bir enfeksiyonu gösterir. Serolojik testler, bağışıklık sistemi baskılanmış hastalar için bilgilendirici değildir. Ayrıca, serolojik teknikler klinik izolatlar arasındaki suş farklılıklarını ayırt edemez (Jawetz *et al.* 1977).

CMV'nin talasemi ile ilişkisi; Talasemi hastalarında yüksek düzeyde saptanan virüslerden biri de CMV'dir; ancak talasemi hastalarının kanındaki antikor oranının normal insanlara göre daha yüksek olduğu saptanmıştır.

Bunun nedeni, sık kan transfüzyonu yapılması ve bu transfüzyonun donörlerden antikor geçişine neden olmasıdır (Al-Hamadany 2020)

CMV normal insanlarda asemptomatik olduğundan virüs latent kalmakta ve talasemi hastaları gibi bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda inflamatuvar semptomları ortaya çıkmaktadır. Virüs hem doğuştan hem de edinilmiş bağışıklık sistemini harekete geçirmektedir. Yapılan çalışmalarda virüsün vücudun virüse karşı savunması olarak kabul edilen interlökinler gibi birçok inflamatuvar sitokini uyardığı gösterilmiştir (Abbas and Zaman 2018).

Bazı çalışmalar, yüksek demir yüklenmesinin bir belirtisi olarak yüksek ferritin düzeyleri olan talasemi hastalarında veya splenektomi yapılan hastalarda CMV antikorlarının bol miktarda bulunduğunu göstermiştir.

Kemik iliği nakli yapılan hastalarda ilik naklinin reddedilmesine neden olma olasılığı yüksektir (Aws *et al.* 2021).

2.9.3 *Toxoplasma gondii*

Toksoplazmanın sınıflandırılması Çizelge 2.4’de verilmiştir.

Çizelge 2.4 Toksoplazma sınıflandırması (Balcha *et al.* 2020)

Alem	<i>Protista</i>
Alt Krallık	<i>Protozoa</i>
Filum	<i>Apicomplexa</i>
Sınıfla	<i>Conoidasida</i>
Takımı	<i>Eucoccidiorida</i>
Alt Takım	<i>Eimeriorina</i>
Familya	<i>Sarcocystidae</i>
Alt Familya	<i>Toxoplasmatinae</i>
Cins	<i>Toxoplasma</i>
Tür	<i>Toxoplasma gondii</i>

Toxoplasma gondii’nin özellikleri; Bir protozoa parazit olan *Toxoplasma gondii*, toksoplazmoza ve üreme düşüklerine neden olur, oldukça zoonotik bir hastalıktır. Toksoplazmanın bazı özellikleri: Konak ölçeğinde, insanlar, kuşlar ve memeliler dahil olmak üzere sıcakkanlı hayvanları enfekte eder. Toksoplazma, kirlenmiş yiyecek veya suyun yutulması ve enfekte kedi dışkısının elle tutulması yoluyla bulaşabilir, Kediler, *T. gondii*’nin son konağı olarak kabul edilir ve toprak ve suyun kontaminasyonunun ana kaynağıdır veya organ nakli veya kan transfüzyonu yoluyla bulaşır (Abdul Hafeez *et al.* 2022).

Kedilerde eşeyli üreme, kemirgenler ve insanlar gibi ara konaklarda ise eşeysiz üremeyi içeren karmaşık bir yaşam döngüsü olan eşeyli döngü, kedi bağırsağıyla sınırlıdır (Martorelli Di Genova *et al.* 2019).

Toksoplazma beyin girişinde endotel hücrelerini geçerek doku kistleri oluşturur, nöronların içinde doku kistleri oluşturur ve ara konaklarının diğer organlarının

gelişmesiyle sonuçlanan doku hasarına neden olur ve konakçının ömrü boyunca orada kalabilir. Sağlıklı bireylerde, toksoplazmoz genellikle hiçbir belirtiye neden olmaz veya sadece (Wohlfert *et al.* 2018) hafif grip benzeri belirtilere neden olur. Ancak, hamilelik sırasında kapılırsa, bağışıklık sistemi zayıflamış bireylerde ve fetüslerde ciddi komplikasyonlara neden olabilir. Hamilelik sırasında, enfeksiyon anneden doğmamış bebeğe geçerek bebek için nörolojik sorunlar ve görme bozukluğu gibi ciddi sağlık sorunlarına yol açar, bu nedenle hamile kadınlar enfeksiyon riskini azaltmak için kedi kumu kutularını ellemekten kaçınmalı ve eti iyi pişirmelidir. Erken teşhis hem anne hem de bebek için komplikasyon riskini azaltmaya yardımcı olur (Al-Hadraawy and Hadi 2017).

Toxoplasma gondii'nin laboratuvar tanısı; Toksoplazma tanısı serolojik testler, spesifik DNA dizilerinin çoğaltılması (PCR), histolojik inceleme, immünolojik testler ve parazitin tanısında kullanılan diğer birçok yöntemle konur.

T. gondii'ye karşı spesifik antikorların gösterilmesi için serolojik testlerin kullanılması tanının ilk ve birincil yöntemidir. Farklı serolojik testler, enfeksiyondan sonra zamanla artış ve azalış gösteren benzersiz desenlere sahip farklı antikorları ölçer.

Bir bireyin uzak geçmişte enfekte olup olmadığını veya yakın zamanda enfekte olup olmadığını belirlemek için genellikle serolojik testlerin bir kombinasyonu gerekir. Klinik laboratuvarlar bu sorunlara aşina olmalı ve ihtiyaç duyulursa referans laboratuvarlara danışmalıdır.

Son zamanlarda, yakın zamanda edinilen ve uzak enfeksiyonlar arasında ayırım yapmaya yardımcı olmak için *Toxoplasma* IgG antikorlarının aviditesi için çeşitli testler tanıtıldı. Spesifik IgG antikorlarının işlevsel afinitesinin, birincil antijenik meydan okumadan sonra başlangıçta düşük olduğu ve antijenle yönlendirilen B hücresi seçimiyle sonraki haftalarda ve aylarda arttığı gözlemlenmiştir.

Avidite sonucu, üre uygulanmış ve uygulanmamış numunelerin antikor titrasyon eğrilerinin oranları kullanılarak belirlenir.

IgM antikorları, IgG antikorlarına göre daha erken ortaya çıkabilir ve daha hızlı düşebilir. IgM antikor ölçümünde en sık kullanılan testler IgM-ELISA kitleri, IFA testi ve immunosorbent aglütinasyon testidir.

IgM antikorlarını ölçmek için kullanılan ticari testlerin yaygın bir şekilde dağıtılmasına rağmen, bunların özgüllüğü genellikle düşüktür ve bildirilen sonuçların yanlış yorumlanması sıklıkla görülmektedir. Çoğu laboratuvar tarafından hala bir IgM testi kullanılmaktadır (Montoya 2002)

T. gondii enfeksiyonunu tespit etmek için yetersizdir ve bu nedenle polimeraz zincir reaksiyonu yoluyla tespit etmek için moleküler tanı, vücut sıvılarında ve dokularda DNA'yı tespit etmek için en doğru yöntem olarak kabul edilir ve toksoplazmoz teşhis etmek için başarıyla kullanılmıştır. PCR, erken teşhis yapılmasını sağlayarak *T. gondii* enfeksiyonunun teşhisinde önemli bir ilerleme sağlamıştır (Ji *et al.* 2023).

Histolojik olarak, Akut enfeksiyonların tanısında kullanılan vücut sıvısı (beyin omurilik sıvısı, amniyon sıvısı) kesitlerinde veya yaymalarında takizoitlerin gösterilmesi geleneksel olarak boyanmış dokuda takizoitlerin gösterilmesi çoğu zaman zordur (Montoya 2002).

İmmünoperoksidaz tekniği *T. gondii*'ye karşı antiserumlar kullanır ve hem duyarlı hem de özgül olduğu kanıtlanmıştır. Parazitin merkezi sinir sisteminde varlığını göstermek için başarıyla kullanılan immünoperoksidaz yöntemi fiksasyonsuz veya formalinle fikse edilmiş parafine gömülmüş doku kesitlerine uygulanır (Montoya 2002).

İnflamatuvar nekrotik lezyonun yakınında çok sayıda doku kisti bulunması muhtemelen akut enfeksiyon veya latent enfeksiyonun yeniden aktif hale gelmesi tanısını koyar.

Toksoplazmanın talasemi ile ilişkisi; Yapılan araştırmalar, talasemi hastalarının fırsatçı patojenlere karşı en savunmasız gruplardan biri olduğunu ortaya koymaktadır. Toksoplazma, kedilerin bulaştırdığı fırsatçı bir patojen olarak bilinir ve bu nedenle bu patojenler toplumda bol miktarda bulunur. Talasemi hastaları periyodik kan transfüzyonlarına ihtiyaç duydukları için Toksoplazma bulaşmasına karşı hassastırlar (Hanifehpour *et al.* 2019).

Bu parazitin tespiti antikorların tespiti ile yapılmıştır. Bazı çalışmalar, özellikle talasemi gibi kan nakli hastalarında ve özellikle enfeksiyon varlığında, sadece immünolojik tespitin yeterli olmadığını göstermiştir. Bu nedenle, talasemi hastalarına kan nakli yapılırken moleküler doğrulama gereklidir (Abd El-Latif *et al.* 2023).

3. MATERİYAL VE METOT

3.1 Materyal

3.1.1 Cihaz ve ekipman

Laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılan ekipman, alet ve kimyasal malzemeler Çizelge 3.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan cihaz ve ekipmanlar

Ekipman	Şirket	Ülke
Başlık	Lab Tech	Kore
Vorteks karıştırıcı	Syan	Belçika
İnkübatör	Hysc	Kore
Steril eldivenler	China	Çin
Jel tüpleri, EDTA tüpleri	China	Çin
Tek kullanımlık şırıngalar	China	Çin
Eppendorf tüpü 1,5 mm	Eppendorf	Çin
Mikropipet (10 µ-1000µ)	Afco	Japonya
Gilson pipet uçları 1000 UL, 100UL, 10UL	Watson	Çin
Raflar	HS	Çin
Su banyosu	Gemmyco	Tayvan
Filtre kâğıdı	China	Çin
Damıtma cihazı	Gfl	Almanya
CFX96 gerçek zamanlı sistem	Bio- Rad	Singapur
Dijital kamera	Rohs	Japonya
Yüksek hızlı soğutma santrifüjü	Hermle	Almanya
Cam Şişeler, 1000 mL	Isolab	Almanya
Buzdolabı	Concord	Lübnan
Derin dondurucu	Arston	Çin
Mikrotiter plaka okuyucu ve yıkayıcı	Bio-tek	ABD
Çok kanallı pipet	Gilson	Fransa
Otoklav	Hirayama	Japonya
Mikrofüj santrifüjü	Beckman	Almanya
Plaka yıkayıcı	Human	Almanya
Hassas pipetler (2,5 µL ve 10 µL)	Cyan	Almanya
Raflar	HS	Çin
Reflotron R plus sistemi	Roch	Almanya
Güvenlik kabini tipi II	Nove	Türkiye
Çalkalayıcı	Rotal	İngiltere
Spektrofotometre	Cecil E1021	İngiltere
Steril eldivenler	China	Çin
Termo mikser	Eppendorf	Almanya
UV Sterilizasyon Kabini	UV4PCR	İngiltere
Vorteks mikser	Syan	Belçika
ABX Micros ES 60 HORIBA	Lab Tech	Almanya

3.1.2 Kimyasal ve biyolojik malzemeler

Bu çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler Çizelge 3.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler

Malzeme Türü	Üretim	Kökeni
CMV IgG ELISA Kiti ELISA Kiti	Sunlong	Çin
CMV IgM ELISA Kiti ELISA Kiti	Sunlong	Çin
CMV TaqMan PCR Kiti	NORGEN	Kanada
DNA ekstraksiyonu ReliaPrep	Promega	Amerika
Hepatit B virüsü çekirdek IgG ELISA Kiti	Sunlong	Çin
Hepatit B virüsü çekirdek IgM ELISA Kiti	Sunlong	Çin
İnsan Hepatit C virüsü IgG ELISA Kiti	Sunlong	Çin
İnsan Hepatit C virüsü IgM ELISA Kiti	Sunlong	Çin
Demir Kiti	Linear	İspanya
Nükleaz İçermeyen Su	Bioneer	Kore
Reflotron ALP reaktif şeritleri	Roche	Almanya
Reflotron GOT (AST) reaktifi	Roche	Almanya
Reflotron GPT (ALT) reaktifi	Roche	Almanya
Reflotron TSB reaktif şeritleri	Roche	Almanya
TIBC (toplam demir bağlama kapasitesi) kiti	Linear	İspanya
VIDAS Ferritin Kiti	Biomerieux	Fransa
Toxoplasma gondii IgG ELISA Kiti	Sunlong	Çin
Toxoplasma gondii IgM ELISA Kiti	Sunlong	Çin
Toxoplasma gondii Taq Man PCR Kiti	NORGEN	Kanada
Viral DNA/RNA Ekstraksiyon spin Kiti	Genaid	Tayvan
Viral yük HBV Miktar Belirleme Kiti	Sacace	Türkiye
Viral yük HCV Miktar Belirleme Kit	Sacace	Türkiye
Etanol (%96, %70)	Malaysia	Malezya

3.2 Yöntem

3.2.1 Çalışma grupları

Bu çalışmanın amacı Talasemi hastalarında HBV, HCV, CMV ve *Toxoplasma gondii* arasındaki ilişkiyi belirlemektir.

Çalışma vaka-kontrol çalışması tasarımına göre gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma için seçilen denekler, β -talasemi majörlü 317 hastadan toplanan serum örneklerini içermektedir ve 144 tedavi gören hastayı içermektedir. Hastalar gruplara ayrılmıştır:

- Hepatit C'li β -talasemik majör 72 hasta
- Hepatit C'si olmayan β -talasemik majör 245 hasta
- Hepatit B'li β -talasemik majör 23 hasta
- Hepatit B'si olmayan β -talasemik majör 294
- CMV'nin dahil olduğu β -talasemik majör 295 hasta
- CMV içermeyen β -talasemik majör 22 hasta dahil
- Toksoplazma içeren β -talasemik majör 40 hasta
- Toksoplazma içermeyen β -talasemik majör 277 hasta

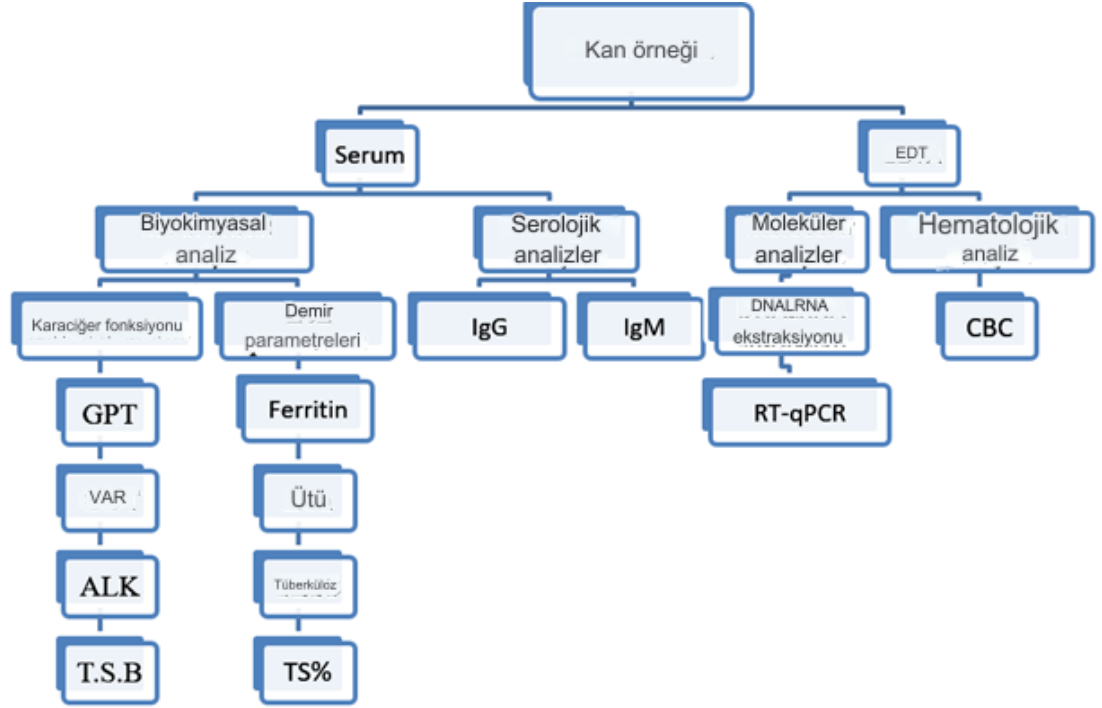
β -talasemi tanısı klinik semptomlar, hematolojik indeksler, aşırı demir yükü ve hemoglobin elektroforezine göre tespit edilmiştir. Çalışmaya katılmadan önce sözlü onay hastalardan ve ebeveynlerden alınmış ve örnekler farklı popülasyonlarından rastgele seçilmiştir.

3.2.2 Kan örneklerinin toplanması

Mevcut çalışma örneklerine katılan her bir (β talasemi majör) hastadan venöz ponksiyon yoluyla beş ml venöz kan alınmış ve 2 mL'si etilendiamintetraasetik asit (EDTA) tüplerine, 3 mL'si ise kan tüplerine olacak şekilde bölünmüştür. Tüm örnekler hazırlanmış ve etiketlenmiştir. Her katılımcıdan alınan örnek serumu ayırmak için 4000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten birkaç dakika sonra oda sıcaklığında (25°C) pıhtıya bırakılmış ve ardından serum -20°C'de saklanmıştır.

Serum mikropipet ile aktarılmış ve test tüplerinde eşit fraksiyonlara bölünmüş, mevcut ticari kitlere göre aşağıdaki biyokimyasal parametrelerin belirlenmesi, serolojik (IgG, IgM) antikorların tespiti için kullanılmış, serumlar test yapılana kadar -20°C'de saklanmıştır.

EDTA tüplerindeki serum, ABX Micros ES 60 HORIBA Almanya kullanılarak tam kan sayımı (CBC) yapmak için kullanılmıştır. EDTA'lı kanın yaklaşık 200 μ L'si DNA ekstraksiyonu ve moleküler tanı için saflaştırma amacıyla kullanılmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 Çalışma tasarımı

3.2.3 Laboratuvar çalışmaları

3.2.3.1 Hematolojik analiz

Tam kan sayımı, kontrol ve kalibratör reaktiflerinden oluşan eksiksiz bir sistem olan ABX Micros ES 60 (HORIBA, Almanya) ile Al Kut Kadın ve Çocuk Hastanesi Talasemi Hematoloji Merkezi'nde tam kan sayımını tespit etmek için kullanılmıştır.

3.2.3.2 Biyokimyasal analiz

Karaciğer fonksiyonu; Testler, Serum ALT, AST, ALP ve TSB parametrelerine özel Reflotron Kiti ile Roche Diagnostic GmbH ile yapılmıştır.

Test prosedürü:

- Strip açılmış ve Reflotron pipeti ile örnekten 32 µl çekilmiştir.

- Örnek, kırmızı uygulama bölgesinin ortasına bir damla konmuştur.
- Kayar kapak veya flap açılarak test şeridi 15 saniye içinde kılavuza yerleştirilmiş ve ardından kayar kapak kapatılmıştır.
- 37°C'de, oluşan renk derinliği 642 nm'de 2 dakika beklendikten sonra ölçülmüş ve okuma kaydedilmiştir.

Demir parametresi; Demir ve TIBC (Toplam Demir Bağlama Kapasitesi), Liner Ferrozine (ASPAN) tarafından üretilen ticari bir kit (Kolorimetrik yöntem) kullanılarak belirlenmiştir.

Teepol ve guanidyum klorür ile serum ferritinine zayıf asitli bir ortamda bağlanan Fe^{+3} , hidroksilamin tarafından Fe^{+2} 'ye indirgenerek demir iyonu numunedeki demir konsantrasyonu ile orantılı renkli bir kompleks oluşturur.

TIBC için serum, transferrin üzerindeki demir bağlama bölgelerini doymak için fazla Fe^{+3} ile muamele edilir. Fazla Fe^{+3} adsorbe edilir ve çöktürülür ve TIBC'yi vermek için süpernatanttaki demir içeriği ölçülür. Transferrin saturasyonu (Tsat, %) serum demiri ve TIBC oranıdır ve serum demirinin ne kadarının bağlı olduğunu gösterir.

Transferrin doygunluğu (%) = $\frac{\text{Serum demiri} \times 100}{\text{serum TIBC}}$

Tüm spektrometrik okumalar Cecil E1021 spektrofotometre kullanılarak yapılmıştır.

Reaktifleri ve numuneleri oda sıcaklığına getirme ve etiketli test tüplerine pipetleme ve standart blank ve numune ekleyerek hazırlama prosedüründe her birinden 200 μ L çalışma reaktifine eklenir ve oda sıcaklığında 5 dakika bekledikten sonra 560 nm'de absorbansı okunur ve sonucu aşağıdaki denkleme göre hesaplanır.

TIBC prosedürü, 1 mL reaktif 1'e 500 μ numune eklendikten sonra karıştırılan ve oda sıcaklığında 5-20 dakika bekletilen üretim protokolüne bağlıdır.

Her tüpe yaklaşık 100 mg R2 eklenir ve 5 dakikalık aralıklarla kuvvetlice karıştırarak 30 dakika bekletilir. Berrak süpernatant ayrılır ve süpernatantın bir alikotundan demir tayini yapılır.

- Toplam demir bağlama kapasitesi (TIBC)
- $TIBC = \mu\text{g/dL süpernat} \times 3$ (Seyreltme Faktörü).
- Bağlanmamış demir bağlama kapasitesi (UIBC)
- TIBC-SI

VIDAS Ferritin (FER); VIDAS Ferritin, ELFA tekniği (Enzyme Linked Fluorescent Assay) kullanılarak insan serumu veya plazmasındaki insan ferritininin belirlenmesi için VIDAS ailesi cihazlarında kullanılmak üzere otomatik bir kantitatif testtir. Ferritini belirlemek için VIDAS ferritin kiti (Biomerieux-1006505140) ile serum kullanılmıştır.

Test prensibi, tek adımlı bir enzim immünoassay sandviç yöntemini son bir floresan saptama (ELFA) ile birleştirir. Katı Faz Alıcısı (SPR), katı fazın yanı sıra tahlil için pipetleme cihazı olarak da görev yapar. Tahlil için reaktifler kullanıma hazırdır ve kapalı reaktif şeritlerinde önceden dağıtılmıştır. Konjugat enzim, bu substratın hidrolizini, floresansı 450 nm'de ölçülen floresan bir ürüne (4-metil- umbelliferon) katalize eder. Testin sonunda sonuçlar, bellekte saklanan kalibrasyon eğrisine göre cihaz tarafından otomatik olarak hesaplanır ve ardından yazdırılır.

3.2.3.3 Serolojik analiz

ELISA tekniği ile HCV (IgG) antikorlarının tespiti; Bu ELISA kiti yöntem olarak Sandviç-ELISA kullanır. Bu kitte sağlanan Mikro Elisa şerit plakası HCV-IgG'ye özgü bir antijen ile önceden kaplanmıştır. Standartlar veya numuneler uygun Mikro Elisa şerit plaka kuyucuklarına eklenir ve spesifik antijen ile birleştirilir. Ardından her bir Micro Elisa strip plaka kuyucuğuna HCV-IgG'ye spesifik bir Horseradish Peroxidase (HRP)-konjuge antijen eklenir ve inkübe edilir. Serbest bileşenler yıkanarak uzaklaştırılır. TMB substrat çözeltisi her bir kuyucuğa eklenir. Yalnızca HCV-IgG ve HRP-konjuge HCV

antijeni içeren kuyucuklar mavi renkte görünecek ve ardından durdurma solüsyonu eklendikten sonra sarıya dönecektir. Optik yoğunluk (OD) 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür. HCV-IgG varlığı, kesme değeri ile karşılaştırılarak belirlenir.

ELISA tekniği ile HCV (IgM) antikorlarının tespiti; Bu ELISA kiti yöntem olarak Sandwich-ELISA kullanır. Bu kitte sağlanan Mikro Elisa şerit plakası HCV-IgM'ye özgü bir antijen ile önceden kaplanmıştır. Standartlar veya numuneler uygun Mikro Elisa şerit plaka kuyucuklarına eklenir ve spesifik antijenle birleştirilir. Ardından her bir Micro Elisa strip plaka kuyucuğuna HCV-IgM'ye spesifik bir Horseradish Peroxidase (HRP)-konjuge antijen eklenir ve inkübe edilir. Serbest bileşenler yıkanarak uzaklaştırılır. TMB substrat çözeltisi her bir kuyucuğa eklenir. Yalnızca HCV-IgM ve HRP-konjuge HCV antijeni içeren kuyucuklar mavi renkte görünecek ve ardından durdurma solüsyonu eklendikten sonra sarıya dönecektir. Optik yoğunluk (OD) 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür. OD değeri HCV-IgM konsantrasyonu ile orantılıdır. Numunelerdeki HCV-IgM konsantrasyonunu, numunelerin OD değerini standart eğriyle karşılaştırarak hesaplanır.

ELISA tekniği ile HBV (IgG) antikorlarının tespiti; ELISA, kalitatif enzim immunoassay tekniğine dayanmaktadır. Bu kitte sağlanan Mikroplaka, HBc-IgG'ye özgü bir antijen ile önceden kaplanmıştır ve katı faz antijeni haline getirilmiştir. Örnekler Mikroplaka kuyucuklarına eklenir ve spesifik antijenle birleştirilir. Daha sonra her bir Mikroplaka kuyusuna HBc'ye spesifik bir Horseradish Peroxidase (HRP)-konjuge antijen eklenir ve inkübe edilir, böylece antijen-antikor-enzim işaretli antijen kompleksi oluşur. Bağlanmamış reaktifi uzaklaştırmak için bir yıkamanın ardından her bir kuyucuğa TMB substrat çözeltisi eklenir. Yalnızca HBc-IgG ve HRP-konjuge HBc antijeni içeren kuyucuklar mavi renkte görünecek ve ardından durdurma çözeltisinin eklenmesinden sonra sarıya dönecektir. Optik yoğunluk (OD) 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür. HBc-IgG'nin kalitatif tayini, cutoff değeri ile karşılaştırılarak belirlenir.

ELISA tekniği ile HBV (IgM) antikorlarının tespiti; ELISA, kalitatif enzim immunoassay tekniğine dayanmaktadır. Bu kitte sağlanan Mikroplaka, HBc-IgM'ye özgü bir antijen ile

önceden kaplanarak katı faz antijeni haline getirilmiştir. Örnekler Mikroplaka kuyucuklarına eklenir ve spesifik antijen ile birleştirilir. Ardından her bir Mikroplaka kuyucuğuna HBc-IgM'ye spesifik bir Horseradish Peroksidaz (HRP)-konjuge antijen eklenir ve inkübe edilir, böylece antijen-antikor-enzim etiketli antijen kompleksi oluşur. Bağlanmamış reaktifi uzaklaştırmak için bir yıkamanın ardından her bir kuyucuğa TMB substrat çözeltisi eklenir. Yalnızca HBc-IgM ve HRP konjuge HBc antijeni içeren kuyucuklar mavi renkte görünecek ve ardından durdurma çözeltisinin eklenmesinden sonra sarıya dönecektir. Optik yoğunluk (OD) 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür. HBc-IgM'nin kalitatif tayini cutoff değeri ile karşılaştırılarak belirlenir.

ELISA tekniği ile *Toxoplasma gondii* (IgG) antikorlarının tespiti; ELISA, kalitatif enzim immunoassay tekniğine dayanmaktadır. Bu kitle sağlanan Mikro plaka, Toxo-IgG'ye özgü bir antijen ile önceden kaplanmış ve katı faz antijeni haline getirilmiştir. Örnekler Mikro plaka kuyularına eklenir ve spesifik antijenle birleştirilir. Daha sonra her bir Mikro plaka kuyusuna Toxo-IgG'ye spesifik bir Horseradish Peroxidase (HRP)-konjuge antijen eklenir ve inkübe edilir, böylece antijen-antikor-Enzim etiketli antijen kompleksi oluşur. Bağlanmamış reaktifi uzaklaştırmak için bir yıkamanın ardından, her bir kuyucuğa TMB substrat çözeltisi eklenir. Sadece Toxo-IgG ve HRP konjuge Toxo antijeni içeren kuyucuklar mavi renkte görünecek ve ardından durdurma çözeltisinin eklenmesinden sonra sarıya dönecektir. Optik yoğunluk (OD) 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür.

ELISA tekniği ile *Toxoplasma gondii* (IgM) antikorlarının tespiti; Bu ELISA kiti yöntem olarak Sandwich-ELISA kullanır. Bu kitle sağlanan Microelisa şerit plakası Toxo-IgM'ye özgü bir antijen ile önceden kaplanmıştır. Standartlar veya numuneler uygun Microelisa stripplate kuyucuklarına eklenir ve spesifik antijenle birleştirilir. Ardından her bir Microelisa stripplate kuyucuğuna Toxo-IgM'ye spesifik bir Horseradish Peroxidase (HRP) konjuge antijen eklenir ve inkübe edilir. Serbest bileşenler yıkanarak uzaklaştırılır. TMB substrat çözeltisi her bir kuyucuğa eklenir. Yalnızca Toxo-IgM ve HRP konjuge Toxo-IgM antijeni içeren kuyucuklar mavi renkte görünecek ve ardından durdurma solüsyonu eklendikten sonra sarıya dönecektir. Optik yoğunluk (OD) 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür. OD değeri Toxo-IgM konsantrasyonuyla

orantılıdır. Numunelerdeki Toxo-IgM konsantrasyonunu, numunelerin OD değerini standart eğriyle karşılaştırarak hesaplanabilir.

ELISA tekniği ile Sitomegalovirüs (IgG) antikorlarının tespiti; ELISA, kalitatif enzim immunoassay tekniğine dayanmaktadır. Bu kitle sağlanan Mikro plaka, anti-CMV-IgG'ye özgü bir antijen ile önceden kaplanmıştır ve katı faz antijeni haline getirilmiştir. Örnekler Mikro plaka kuyularına eklenir ve spesifik antijen ile birleştirilir. Daha sonra her bir Mikroplaka kuyusuna anti-CMV-IgG'ye spesifik bir Horseradish Peroksidaz (HRP)-konjuge antijen eklenir ve inkübe edilir, böylece antijen-antikor-enzim etiketli antijen kompleksi oluşur. Bağlanmamış reaktifi uzaklaştırmak için bir yıkamanın ardından her bir kuyucuğa TMB substrat çözeltisi eklenir. Sadece anti-CMV-IgG ve HRP-konjuge CMV antijenleri içeren kuyucuklar mavi renkte görünecek ve ardından durdurma solüsyonunun eklenmesinden sonra sarıya dönecektir. Optik yoğunluk (OD) 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür. Kalitatif belirleme anti-CMV-IgG, cutoff değeri ile karşılaştırılarak belirlenir.

ELISA tekniği ile Sitomegalovirüs (IgM) antikorlarının tespiti; ELISA, kalitatif enzim immunoassay tekniğine dayanmaktadır. Bu kitle sağlanan mikroplaka, Anti-CMV IgM'ye özgü bir antijen ile önceden kaplanmış ve katı faz antijeni haline getirilmiştir. Örnekler Mikroplaka kuyucuklarına eklenir ve spesifik antijen ile birleştirilir. Daha sonra her bir Mikroplaka kuyusuna Anti-CMV IgM'ye spesifik bir Horseradish Peroksidaz (HRP)-konjuge antijen eklenir ve inkübe edilir, böylece antijen-antikor-enzim etiketli antijen kompleksi oluşur. Bağlanmamış reaktifi uzaklaştırmak için bir yıkamanın ardından her bir kuyucuğa TMB substrat çözeltisi eklenir. Sadece Anti-CMV IgM ve HRP konjuge CMV antijeni içeren kuyucuklar mavi renkte görünecek ve ardından durdurma çözeltisinin eklenmesinden sonra sarıya dönecektir. Optik yoğunluk (OD) 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür. Kalitatif belirleme Anti-CMV IgM, CUTOFF değeri ile karşılaştırılarak belirlenir.

3.2.3.4 İmmünolojik tespit

İmmünolojik tespit, başta virüsler olmak üzere birçok mikroorganizmanın teşhisi için onaylanmış yöntemlerden biridir.

Bu çalışmada benimsenen immünolojik tespit yöntemlerinden biri, antijen-antikor etkileşimi ilkesine dayanan enzime bağlı immünosorbent testidir (ELISA).

Bu çalışmada, dolaylı iki aşamalı bir immünolojik teste dayanan ticari bir kit kullanılmıştır.

Test prosedürü:

- Ön numune seyreltici hazırlanması: Örnek seyreltici hazırlanması için ön örnek plakalarına 90 µL ön örnek seyreltici ve 10 µL örnek (serum) eklenerek iyice karıştırılır ve bu aşamada renk (mor-mavi) mavi-yeşile dönüşür.
- Kuyucuklara 100 µL pozitif, negatif kontrol ve kalibratör eklenir.
- Ana plakaya 90 µL örnek seyreltici ve 10 µL ön örnek plakaları eklenir (son oran 1:100) iyice karıştırılır ve koruyucu filmle örtülür.
- Plakalar 37°C'de 30 dakika inkübe edilir.
- Yıkayıcıyı şişe içindeki distile suyla (oran 1:24) seyrelterek yıkama solüsyonu hazırlanır.
- İnkübasyon süresi sona erdikten sonra kuyucuklar yıkama solüsyonu ile dört kez yıkanır (fazla su kalıntısı plakanın temiz bir filtre kâğıdı ile silinmesiyle giderilir).
- 100 µL konjugat kuyucuklara eklenir ve koruyucu film ile kapatılır.
- 37°C'de 30 dakika inkübe edilir ve altıncı adım tekrarlanır.
- Daha sonra kuyucuklara 100 µL TMB - substrat eklenir, bu süre zarfında renk maviye dönüşür.
- Karanlık bir yerde 24°C'de 20 dakika inkübe edilir.
- Son inkübasyondan sonra kuyucuklara 150 µL durdurma reaktifi eklenir.
- Mikroplaka okuyucu hazırlanarak sonuçlar 450 nm'de okunur.

3.2.4 Moleküler analiz

3.2.4.1 Nükleik asit ekstraksiyonu

Toxoplasma nükleik asit ekstraksiyonu;

A) DNA İzolasyonu: Moleküler çalışmalar için EDTA antikoagülanlı tüplerde toplanan tam taze kandan izole edilen genomik DNA, ReliaPrep Promega (ABD) genomik DNA saflaştırma kitleri tablosu kullanılarak uygulanmıştır (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3 Kan DNA ekstraksiyon kiti bileşenleri

Bileşen	Miktar
ReliaPrep TM bağlayıcı kolonlar (50/paket)	2 paket
Toplama tüpleri (40/paket)	10 paket
Hücre lizis tamponu (CLD)	22 mL
Proteinaz K (PK) çözeltisi	1,1 mL
Bağlayıcı tampon (BBA)	27,5 mL
Kolon yıkama çözeltisi (CWD)	165 mL
Nükleazsız su	50 mL

Protokol:

- Kan numunesi oda sıcaklığında bir çalkalayıcıda en az 10 dakika karıştırılmıştır. Kan dondurulmuşsa 10 dakika karıştırmadan önce tamamen çözündürülür.
- 1,5 ml'lik bir mikrosantrifüj tüpüne 20 µL Proteinaz K alikotu eklenmiş ve Proteinaz K (PK) Solüsyonu içeren tüpe 200 µL kan eklenmiş ve karıştırılmıştır.
- Tüpe 200 µL'lik bir alikot Hücre Lizis Tamponu eklenmiştir. Kapak kapatılır ve en az 10 saniye boyunca vorteksle karıştırılır. Bu vorteksleme adımı iyi verim elde etmek için gereklidir ve 56°C'de 10 dakika inkübe edilmiştir.
- Kan numunesi inkübe edilirken, boş bir Toplama Tüpüne bir ReliaPrep bağlama Kolonu yerleştirilmiştir.

- Tüp ısıtma bloğundan çıkarılmış ve 250 µL Bağlama Tamponu (BBA) eklenerek, tüp kapatılmıştır. Ardından, vorteks karıştırıcı ile 10 saniye boyunca vorteksle karıştırılmıştır.
- Tüm içerik ReliaPrep Bağlama Kolonu tüpüne eklenmiş, maksimum hızda 1 dakika santrifüj edilmiştir. Lizatın membrandan tamamen geçtiğinden emin olmak için bağlama kolonu kontrol edilmiştir.
- Akış içeren toplama tüpü çıkarılmış ve sıvı tehlikeli atık olarak atılmıştır.
- Kolona 500 µL hacminde kolon yıkama solüsyonu (CWD) eklenmiş ve maksimum hızda 3 dakika santrifüj edilerek akış atılmıştır.
- Yıkama adımı tekrarlanmıştır.
- Kolona 100 µL nükleaz içermeyen su eklenmiş ve maksimum hızda 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- DNA -20°C'de dondurucuda saklanmıştır.

B) Viral nükleik asit ekstraksiyonu: Viral Nükleik Asit Ekstraksiyon Kiti, serum, plazma, vücut sıvıları ve viral enfekte hücre kültürlerinin süpernatantı gibi hücresiz örneklerden viral DNA ve viral RNA'nın etkili bir şekilde saflaştırılması için özel olarak tasarlanmıştır. Etkili cam elyaf spin kolon sistemi HBV, CMV, HCV ve HIV gibi çok çeşitli DNA ve RNA virüslerinden nükleik asit saflaştırması için optimize edilmiştir. Saflaştırılan viral DNA/RNA doğrudan qPCR ve qRT-PCR deneylerinde kullanılabilir (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4 Viral nükleik asit ekstraksiyon kiti bileşenleri

Bileşen	Miktar
VB lizis tamponu	60 mL
AD arabellek (Etanol ekleyin)	8 mL (60 mL)
W1 arabellek	50 mL
Yıkama tamponu (Etanol ekleyin)	25 mL (100 mL)
RNase içermeyen su	6 mL
VB Sütunları	100
2 mL Toplama tüpleri	200

Adım 1: Lizis; Hücresiz numuneler için (serum, plazma, vücut sıvıları)- 200 µL numuneyi 1,5 mL'lik bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılır.

NOT: Numune 200 µL'den azsa, numune hacmini PBS ile 200 µL'ye ayarlanır.

- Numuneye 400 µL VB Lizis Tamponu eklenir ve vorteksle karıştırılır
- Oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilir.

Adım 2: Nükleik Asit Bağlama;

- Örnek lizatına 450 µL AD Tamponu (etanol eklendiğinden emin olun) eklenir.
- Karıştırmak için tüpü kuvvetlice çalkalanır.
- Bir VB Kolonunu 2 mL'lik bir Toplama Tüpüne yerleştirilir.
- 600 µL lizat karışımını VB Kolonuna aktarılır
- 14-16,000 x g'de 1 dakika santrifüjlenir
- Akış suyunu atılır, ardından VB Kolonunu 2 mL Toplama Tüpüne geri yerleştirilir.
- Kalan karışımı VB Kolonuna aktarılır.
- 14-16,000 x g'de 1 dakika santrifüjlenir.
- Akış suyunu içeren 2 mL Toplama Tüpünü atılır.
- VB Kolonunu yeni bir 2 mL Toplama Tüpüne aktarılır.
- Adım 3 Yıkama; VB Kolonuna 400 µL W1 Tamponu eklenir ve ardından 30 saniye boyunca 14-16,000 x g'de santrifüjlenir.

Adım 3: Yıkama;

- VB Kolonuna 400 µl W1 Tamponu eklenir ve ardından 30 saniye boyunca 14-16,000 x g'de santrifüjlenir.
- Akış suyunu atılır, ardından VB Kolonunu 2 mL Toplama Tüpüne geri yerleştirilir.
- VB Kolonuna 600 µL Yıkama Tamponu (etanol eklendiğinden emin olun) eklenir.
- 14-16,000 x g'de 30 saniye santrifüjlenir.
- Akış suyunu atılır ve VB Kolonunu 2 mL Toplama Tüpüne geri yerleştirilir.

- Kolon matrisini kurutmak için 14-16,000 x g'de 3 dakika santrifüjlenir.

Adım 4: Nükleik Asit Elüsyonu;

- Kurutulmuş VB Kolonunu temiz bir 1,5 mL mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilir.
- VB Kolon matrisinin merkezine 50 µL RNaz içermeyen Su eklenir.
- RNaz içermeyen Suyun matris tarafından emildiğinden emin olmak için en az 3 dakika bekletilir.
- Saflaştırılmış nükleik asidi elüe etmek için 14-16,000 x g'de 1 dakika santrifüjlenir.

3.2.4.2 İnsan plazmasında hepatit B virüsünün kantitatif tespiti için gerçek zamanlı PCR

HBV Kantifikasyon Kiti: HBV Real-TM Quant Dx kiti, insan plazmasında Hepatit B virüsü DNA'sının Kantitatif tespiti için bir Gerçek Zamanlı Amplifikasyon testidir. HBV Real-TM Quant Dx Real-Time testi HBV için kan, plazma, serum veya doku donörlerinin taranması için veya HBV enfeksiyonunun varlığını doğrulamak için tanısal bir test olarak kullanılmaz. Hücresiz örnekler (serum, plazma, vücut sıvıları) için 200 µL örneği 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarın (NOT: Eğer numune 200 µL'den az ise , numune hacmini PBS ile 200 µL'ye tamamlayın). Numuneye 400 µL VB Lizis Tamponu ekleyin ve vorteksle karıştırın. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edin (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5 HBV kantifikasyonu içerik kiti

Bileşen	Miktar
Liyofilize amplifikasyon reaktifleri	96 Şişe (0,2 mL)
Liyofilize reaktif HBV-IC-L	4 şişe
Liyofilize reaktif HBV-Pos1-L C+	4 şişe
Liyofilize reaktif HBV-Pos2-L C+	4 şişe
Negatif Kontrol	4 şişe
KAL1	4 şişe
KAL2	4 şişe

Test Prensipleri; Kit HBV Real-TM Quant Dx, Hepatit B Virüsünün Kantitatif tespiti için bir Gerçek Zamanlı PCR testidir. HBV DNA plazmadan ekstrakte edilir, gerçek zamanlı amplifikasyon kullanılarak amplifiye edilir ve HBV'ye özgü floresan raportör boya problemleri kullanılarak ve HBV'ye özgü bir Dahili Kontrolün (IC) eş zamanlı tespiti, çift renk ile tespit edilir. Termal döngünün her turu sırasında, amplifikasyon ürünleri yüksek sıcaklıkta tek iplikçiklere ayrışır ve sıcaklık düşürüldükçe primer tavlama ve uzamasına izin verir. Ürünün üstel amplifikasyonu, yüksek ve düşük sıcaklıklar arasında tekrarlanan döngü yoluyla elde edilir ve hedef dizilerin bir milyar kat veya daha fazla amplifikasyonu ile sonuçlanır. Her iki hedefin (HBV ve IC) amplifikasyonu aynı reaksiyonda eş zamanlı olarak gerçekleşir. Gerçek Zamanlı sırasında floresan yoğunluklarının izlenmesi, gerçek zamanlı amplifikasyondan sonra reaksiyon tüpünü yeniden açmak zorunda kalmadan biriken ürünün tespit edilmesini ve miktarının belirlenmesini sağlar. Dahili Kontrol (IC), ayrı ayrı işlenen her numune için bir ekstraksiyon ve amplifikasyon kontrolü olarak ve olası inhibisyonu tanımlamak için hizmet eder. IC, HBV DNA dışındaki bir kanalda tespit edilir. HBV-ICL liyofilize bir Dahili Kontrolüdür ve nükleik asit ekstraksiyonundan PCR amplifikasyon tespitine kadar tüm analiz adımları boyunca taşınan rekombinant DNA içeren yapıyı temsil eder. HBV IC'nin varlığı sadece ekstraksiyon prosedürünün izlenmesine ve olası PCR inhibisyonunun kontrol edilmesine değil, aynı zamanda ekstraksiyon prosedürü sırasında DNA'nın olası kayıplarının doğrulanmasına ve böylece HBV viral yükünün tam olarak hesaplanmasına olanak tanır.

Reaktiflerin hazırlanması; Herhangi bir HCV Real-TM Quant Dx protokolüne başlamadan önce aşağıdaki reaktifler hazırlanır:

- İstenen miktarda liyofilize kontrol ve kalibratör seçilir ve kısa bir süre santrifüjlenir.
- Çizelge 3.6'da belirtildiği gibi Negatif Kontrol eklenir.

Çizelge 3.6 Liyofilize reaktifi

Liyofilize reaktifi	Kontrol (µL)
CAL 1	1200
CAL 2	1200
KONTROL 1	12**
KONTROL 2	1200
KONTROL INT.	300

- Tüpleri kapatın ve tüm tüpleri oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edin. Periyodik olarak vorteksleyin.
- Tüpleri 5 saniye boyunca santrifüjleyin.
- Çözünmüş reaktifler 2-8°C'de saklanmalı ve 30 güne kadar daima ışıktan korunmalıdır (Çizelge 3.7) (Çizelge 3.8).

Çizelge 3.7 Kontrol konsantrasyonları I

Kontrol	Konsantrasyonlar IU/mL	Log Ortalama Değer
Kontrol 1	$5,02 \cdot 10^5$ - $5,02 \cdot 10^6$	6,20
Kontrol 2	$3,23 \cdot 10^2$ - $3,23 \cdot 10^3$	3,01

Çizelge 3.8 Kalibratörler HCV (HEX/Sarı) I

Kalibratörler	Konsantrasyonlar IU/mL	Log IU/mL
CAL1-HCV	1588530	6,20
CAL2-HCV	1020	3,01

Test kalibrasyonu: Numunelerin ve kontrollerin HBVDNA konsantrasyonunu ölçmek için bir kalibrasyon eğrisi gereklidir. Bir kalibrasyon eğrisi (HBV konsantrasyonuna karşı reaktif floresan sinyal seviyesinin tespit edildiği eşik döngüsü [Ct] oluşturmak için iki tahlil kalibratörü üç tekrarlı olarak çalıştırılır. Kalibrasyon eğrisi eğimi ve kesişme noktası hesaplanır ve cihazda saklanır. Bir numunedeki HBV DNA konsantrasyonu saklanan kalibrasyon eğrisinden hesaplanır. Kantitatif standartlar CAL1 ve CAL2 hasta numuneleri ile aynı şekilde muamele edilmelidir. Yeni bir HBV Real-TM Quant Dx lotunun ilk kullanımından önce, bir kalibrasyon eğrisi oluşturmak için DNA ekstraksiyon

prosedüründen başlayarak 6 kalibratör çalışması yapılmalıdır (iki kalibratör üç replikat halinde çalıştırılır):

- Her kalibrasyon çalışması için CAL1 için 3 örnek hazırlama tüpü, CAL2 için 3 tüp hazırlanır.
- Her tüpe 10 µL KONTROL INT eklenir.
- DNA saflaştırma kitinin kılavuzunda belirtilen miktarda CAL1 ve CAL2'yi uygun tüplere eklenir.

Gerçek zamanlı PCR kalibrasyon prosedürü;

- Ekstrakte edilen kalibratörlerin PCR'ını gerçekleştirmek için liyofilize reaktiflerle 6 reaksiyon tüpü hazırlanır.
- 6 kalibratörün DNA saflaştırmasından elde edilen elüe edilmiş örneklerden 50 µL eklenir.

Gerçek zamanlı PCR örnek prosedürü;

- Ekstrakte edilen numunelerin ve kontrollerin PCR'ını gerçekleştirmek için liyofilize reaktiflerle istenen miktarda reaksiyon tüpü hazırlanır.
- DNA saflaştırma adımından elde edilen elüe edilmiş örneklerden 50 µL eklenir.
- Tüpleri kapatılır ve Gerçek Zamanlı PCR cihazına aktarılır (Çizelge 3.9).

Çizelge 3.9 HBV için gerçek zamanlı PCR programı

No.	Adımlar	Sıcaklık	Zaman	Floresan Tespiti	Döngü Tekrarı
1	Tutma	95°C	15 dk	—	1
2	Döngü 1	95C	5 sn	—	5
		60°C	20 sn	—	
		72°C	15 sn	—	
3	Döngü 2	95°C	5 sn	—	40
		60°C	30 sn	FAM, JOE/HEX/Cy3	
		72°C	15 sn	—	

Sonuçların yorumlanması; Dahili Kontrol (IC) FAM/Yeşil kanalda, HBV DNA ise Joe/Sarı/HEX kanalında tespit edilir. Her DNA amplifikasyonu, FAM/Yeşil kanalda (IC için) veya Joe/Sarı/HEX kanalında (HBV DNA için) ölçülebilen bir floresan sinyali oluşumuyla ilişkilendirilir ve sigmoid bir büyüme eğrisi (log ölçeği) ile sonuçlanır. Veri analizi, ilgili yazılım kullanılarak ve el kitabındaki tavsiyeler dikkate alınarak üreticinin talimatlarına göre (Kullanım kılavuzu Rotor-Gene™ 6000/Q, Qiagen ve Cihaz Kılavuzu SaCycler-96™, Sacace) gerçekleştirilir. Çalışmanın geçerli olduğundan emin olmak ve sonuçları yorumlamak için elde edilen sonuçları kontrol edin. HBV DNA, CT değerlerine ve kantitasyon standartlarının analizinden elde edilen bir standart eğriye göre belirlenir. HBV DNA konsantrasyonu IU/ml cinsinden ifade edilir. Sonuç 100,000.000 IU/ml'den fazlaysa, 100,000,000 IU HBV/ml'den fazla sonucu olarak gösterilir. Sonuç doğrusal ölçüm aralığından fazlaysa, numune 10x seyreltmeden sonra analiz edilebilir ve elde edilen sonuç 10 ile çarpılmalıdır. Sonuç, 1 mL'den ekstraksiyon yapılması durumunda 7 IU/mL'den az ise, sonuç 7 IU HBV/mL'den az olarak görüntülenecektir.

3.2.4.3 İnsan plazmasında hepatit C virüsünün kantitatif tespiti için gerçek zamanlı PCR

HCV kantifikasyon kiti; HCV Real-TM Quant Dx kiti, insan plazmasında Hepatit C virüsü RNA'sının Kantitatif tespiti için bir Gerçek Zamanlı Amplifikasyon testidir. HCV Real-TM Quant Dx Gerçek Zamanlı test kan, plazma, serum veya doku donörlerinin HCV açısından taranması veya HCV enfeksiyonunun varlığını doğrulamak için tanısal bir test olarak kullanılması için değildir (Çizelge 3.10).

Çizelge 3.10 HCV kantifikasyon içerik kiti

Bileşen	Miktar
Liyofilize amplifikasyon reaktifleri	96 Şişe (0,2 mL)
Liyofilize reaktif HCV-IC-L	4 şişe
Liyofilize reaktif HCV-Pos1-L C+	4 şişe
Liyofilize reaktif HCV-Pos2-L C+	4 şişe
Negatif Kontrol	4 şişe
KAL1	4 şişe
KAL2	4 şişe

Test Prensipleri; HCV RNA plazmadan ekstrakte edilir, gerçek zamanlı amplifikasyon kullanılarak amplifiye edilir ve HCV'ye özgü floresan raportör boya problemleri ve HCV'ye özgü bir Dahili Kontrolün (IC) eşzamanlı tespiti kullanılarak çift renk tespiti ile tespit edilir. Termal döngünün her turu sırasında, amplifikasyon ürünleri yüksek sıcaklıklarda tek iplikçiklere ayrışır ve sıcaklık düşürüldükçe primer tavlama ve uzamasına izin verir. Ürünün üstel amplifikasyonu, yüksek ve düşük sıcaklıklar arasında tekrarlanan döngü yoluyla elde edilir ve hedef dizilerin bir milyar kat veya daha fazla amplifikasyonu ile sonuçlanır. Her iki hedefin (HCV ve IC) amplifikasyonu aynı reaksiyonda eş zamanlı olarak gerçekleşir. Gerçek Zamanlı sırasında floresan yoğunluklarının izlenmesi, gerçek zamanlı amplifikasyondan sonra reaksiyon tüpünü yeniden açmak zorunda kalmadan biriken ürünün tespit edilmesini ve miktarının belirlenmesini sağlar. Dahili Kontrol (IC), ayrı ayrı işlenen her numune için bir ekstraksiyon ve amplifikasyon kontrolü olarak ve olası inhibisyonu tanımlamak için hizmet eder. IC, HCV RNA dışındaki bir kanalda tespit edilir. HCV-IC-L liyofilize bir Dahili Kontrolüdür ve nükleik asit ekstraksiyonundan PCR amplifikasyon tespitine kadar tüm analiz adımları boyunca taşınan rekombinant RNA içeren yapıyı temsil eder. HCV IC'nin varlığı sadece ekstraksiyon prosedürünün izlenmesine ve olası PCR inhibisyonunun kontrol edilmesine değil, aynı zamanda ekstraksiyon prosedürü sırasında olası RNA kayıplarının doğrulanmasına ve böylece HCV viral yükünün tam olarak hesaplanmasına olanak tanır.

Reaktiflerin hazırlanması;

HCV Real-TM Quant Dx protokolü aşağıdaki reaktifleri hazırlar:

- İstenen miktarda liyofilize kontrol ve kalibratör seçilir ve santrifüjlenir.
- Negatif Kontrolü aşağıdaki tabloda gösterildiği gibi eklenir.
- Tüpler kapatılır ve tüm tüpler oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edilir. Periyodik olarak vortekslenir.
- Tüpler 5 saniye santrifüjlenir.
- Çözünmüş reaktifler 2-8°C'de saklanmalı ve 30 güne kadar daima ışıktan korunmalıdır (Çizelge 3.11) (Çizelge 3.12).

Çizelge 3.11 Kontrol konsantrasyonları II

Kontrol	Konsantrasyonlar IU/mL	Log Ortalama Değer
Kontrol 1	$4,17 \cdot 10^5$ - $4,17 \cdot 10^6$	6,12
Kontrol 2	$7,72 \cdot 10^2$ - $7,72 \cdot 10^3$	3,39

Çizelge 3.12 Kalibratörler HCV (HEX/Sarı) II

Kalibratörler	Konsantrasyonlar IU/mL	Log IU/mL
CAL1-HCV	1317980	6,12
CAL2-HCV	2440	3,39

Deney kalibrasyonu; Numunelerin ve kontrollerin HCV RNA konsantrasyonunu nicelleştirmek için bir kalibrasyon eğrisi gereklidir. Kalibrasyon eğrisi (HCV konsantrasyonu ile reaktif floresan sinyal seviyesinin tespit edildiği eşik döngüsü [Ct] arasındaki karşılaştırma) oluşturmak için iki deney kalibratörü üçlü tekrarlar halinde çalıştırılır.

Kalibrasyon eğrisi eğimi ve kesişimi hesaplanır ve cihazda saklanır. Bir numunedeki HCV RNA konsantrasyonu saklanan kalibrasyon eğrisinden hesaplanır. Kantitatif standartlar CAL1 ve CAL2 hasta numuneleriyle aynı şekilde işlenmelidir.

Yeni bir HCV Real-TM Quant Dx partisinin ilk kullanımından önce, kalibrasyon eğrisi oluşturmak için RNA ekstraksiyon prosedüründen başlayarak 6 kalibratör çalışması yapılmalıdır (iki kalibratör üçlü tekrarlar halinde çalıştırılır):

- Her kalibrasyon çalışması için CAL1 için 3 adet, CAL2 için 3 adet numune hazırlama tüpü hazırlanır.
- 10 µL CONTROL INT eklenir.
- Manuel RNA saflaştırma kitinde belirtilen miktarda CAL1 ve CAL2'yi uygun tüplere eklenir.

Gerçek zamanlı PCR kalibrasyon prosedürü:

- Çıkarılan kalibratörlerin PCR'ını gerçekleştirmek için liyofilize reaktiflerle 6 adet reaksiyon tüpü hazırlanır.
- 6 kalibratörün DNA saflaştırmasından elde edilen elüsyon örneklerinden 50 µL eklenir.

Gerçek zamanlı PCR örnek prosedürü:

- Ekstrakte edilen numunelerin ve kontrollerin PCR'ını gerçekleştirmek için liyofilize reaktiflerle talep edilen miktarda reaksiyon tüpü hazırlanır.
- DNA saflaştırma adımından elde edilen elüsyonlu örneklerden 50 µL eklenir.
- Tüpler kapatılır ve Real-Time PCR cihazına aktarılır (Çizelge 3.13).

Çizelge 3.13 HCV için gerçek zamanlı PCR programı

No.	Adımlar	Sıcaklık	Zaman	Floresan Tespiti	Döngü Tekrarı
1	Tutma	50°C	15 dk	—	1
2	Tutma	95°C	15 dk	—	1
3	Döngü 1	95°C	5 sn	—	5
		60°C	20 sn	—	
		72°C	15 sn	—	
4	Döngü 2	95°C	5 sn	—	40
		60°C	30 sn	FAM, JOE/HEX/Cy3	
		72°C	15 sn	—	

Sonuçların yorumlanması: Dahili Kontrol (IC) FAM/Green kanalında ve HCV RNA Joe/Yellow/HEX kanalında tespit edilir. Her DNA amplifikasyonu, FAM/Green kanalında (IC için) veya Joe/Yellow/HEX kanalında (HCV RNA için) ölçülebilen bir floresan sinyalinin üretilmesiyle ilişkilidir ve sigmoid büyüme eğrisi (log ölçeği) ile sonuçlanır. Elde edilen sonuçları kontrol ederek çalışmanın geçerli olduğundan emin olun ve sonuçları yorumlayın. HCV RNA, CT değerlerine ve kantitasyon standartlarının analizinden elde edilen standart eğriye dayanarak belirlenir. HCV RNA konsantrasyonu IU/ml olarak ifade edilir. Sonuç 100,000,000 IU/ml'den fazlaysa, 100,000,000 IU

HCV/ml'den fazla sonuç olarak görüntülenir. Sonuç doğrusal ölçüm aralığından fazla ise, numune 10x seyreltme sonrasında analiz edilebilir ve elde edilen sonuç 10 ile çarpılmalıdır. 1 ml'den ekstraksiyon durumunda sonuç 13 IU/ml'den az ise, sonuç 13 IU HCV/ml'den az olarak gösterilir.

3.2.4.4 İnsan plazmasında CMV'nin kalitatif tespiti için gerçek zamanlı PCR

Ürün açıklaması; Sitomegalovirüs (CMV) TaqMan PCR Kiti, TaqMan teknolojisinin kullanımına dayalı gerçek zamanlı PCR'de CMV'ye özgü DNA'nın tespiti için tasarlanmıştır. Bu kit yalnızca araştırma amaçlı olarak tasarlanmıştır ve tanı prosedürlerinde kullanılmamalıdır. CMV'ye özgü DNA'nın tespiti, CMV enfeksiyonunun tespiti için basit, güvenilir ve hızlı bir sonuç sağlayan TaqMan PCR'ye dayanmaktadır. Norgen'in Sitomegalovirüs (CMV) TaqMan PCR Kiti, PCR inhibisyonunu izlemek ve numunenin kalitesini ve tespit sonucunu doğrulamak için bir PCR kontrolü içerir. CMV TaqMan PCR Kiti, hedef ve PCR kontrol tespiti için Ana Karışım, Primer ve Prob Karışımı ve ayrıca kit reaktiflerinin bütünlüğünü doğrulamak için bir pozitif kontrol ve bir negatif kontrol (nükleaz içermeyen su) içerir (Çizelge 3.14).

Çizelge 3.14 CMV nitel içerik kiti

Bileşen	Miktar
MDx TaqMan 2X PCR ana karışımı	2 x 700 µL
CMV primer ve prob karışımı	280 µL
CMV pozitif kontrol	150 µL
Nükleaz içermeyen su (Negatif kontrol)	1,25 mL
Ürün ek parçası	1

TaqMan PCR testi hazırlanması;

- Kullanmadan önce, tüm TaqMan PCR bileşenlerinin uygun miktarları oda sıcaklığında tamamen çözölmeli, hafifçe vortekslenerek veya pipetleme yoluyla karıştırılmalı ve kısa bir süre santrifüj edilmelidir.
- Buz üzerinde hızlı çalışılmalıdır.

- MDx TaqMan 2x PCR Master karışımının miktarı 128 PCR reaksiyonuna (96 örnek PCR, 16 pozitif kontrol PCR ve 16 şablonsuz kontrol PCR) kadar yeterlidir.
- Sonuçların doğru yorumlanması için her TaqMan PCR çalışması için CMV Pozitif Kontrol içeren bir reaksiyon ve şablon kontrolü olmayan bir reaksiyon eklenmelidir.
- TaqMan PCR çalışması başına önerilen minimum test edilen DNA örneği sayısı 6'dır.
- TaqMan PCR testini hazırlarken herhangi bir kontaminasyonu önlemek için, Negatif Kontrol, Tespit Testi ve Pozitif Kontrol'ü hazırlamak için aşağıdaki adımlar izlenmelidir.

PCR negatif kontrolünün hazırlanması (Çizelge 3.15)

PCR CMV analizinin hazırlanması (Çizelge 3.16)

PCR pozitif kontrolünün hazırlanması (Çizelge 3.17)

Kontaminasyonu daha da önlemek için, bileşenleri PCR tüplerine aşağıdaki tablolarda gösterilen sırayla eklenir: 1) Nükleaz içermeyen su; 2) MDx TaqMan 2X PCR Master Mix; 3) Primer ve Prob Mix; ve 4) Örnek DNA veya Pozitif Kontrol.

Her TaqMan PCR seti için, Çizelge 3.15'te gösterildiği gibi bir şablonsuz kontrol PCR hazırlanır:

Çizelge 3.15 TaqMan PCR negatif kontrol hazırlığı

PCR Bileşenleri	Hedef tespiti (MDx TaqMan 2x PCR Maseter Mix ile)
Nükleaz içermeyen su	8 µL
MDx TaqMan 2x master mix ile	10 µL
CMV primer ve prob karışımı	2 µL
Toplam hacim	20 mL

Numune tespiti için PCR reaksiyonunu Çizelge 3.16'da gösterildiği gibi hazırlanır.

Çizelge 3.16 TaqMan PCR CMV deneme hazırlığı

PCR Bileşenleri	Hedef tespiti (MDx TaqMan 2x PCR Master Mix ile)
Nükleaz içermeyen su	5 µL
MDx TaqMan 2x master mix ile	10 µL
CMV primer ve prob karışımı	2 µL
Örnek DNA	3 µL
Toplam hacim	20 L

Her PCR seti için, Çizelge 3.17’de gösterildiği gibi bir pozitif kontrol PCR hazırlanır:

Çizelge 3.17 TaqMan PCR pozitif kontrol hazırlığı

PCR Bileşenleri	Hedef tespiti (MDx TaqMan 2x PCR Maseter Mix ile)
MDx TaqMan 2x PCR master karışımı	10 µL
CMV primer ve prob karışımı	2 µL
CMV Pozitif kontrol (PosC)	8 µL
Toplam hacim	20 L

CMV TaqMan PCR testi programlama;

- Termosiklet Çizelge 3.18’de gösterilen programa göre programlanır.
- TaqMan PCR testini çalıştırılır (Çizelge 3.19).

Çizelge 3.18 CMV TaqMan PCR programı

PCR Döngüsü	Aşama	Sıcaklık	Süre
Döngü 1	1. adım	50°C	30 dk.
Döngü 2	1. adım	95°C	3 dk.
Döngü 3	1. adım	95°C	15 s
	2. adım	60°C	40 s

Çizelge 3.19 Analiz sonuçlarının yorumlanması (CMV)

FAM (Hedef tespiti)	HEX (PCR doğrulaması)	Sonuç
+	+	Olumlu
—	+	Negatif
—	—	PCR engellendi

3.2.4.5 İnsan plazmasında *Toxoplasma gondii*'nin kalitatif tespiti için gerçek zamanlı PCR

Ürün açıklaması; *Toxoplasma gondii* TaqMan PCR Kiti, TaqMan teknolojisinin kullanımına dayalı gerçek zamanlı PCR'de *Toxoplasma gondii*'ye özgü DNA'nın tespiti için tasarlanmıştır. Bu kit yalnızca araştırma amaçlı tasarlanmıştır ve tanı prosedürlerinde kullanılmamalıdır. *Toxoplasma gondii*'ye özgü DNA'nın tespiti, *Toxoplasma gondii* enfeksiyonunun tespiti için basit, güvenilir ve hızlı bir sonuç sağlayan TaqMan PCR'ye dayanmaktadır. *Toxoplasma gondii* TaqMan PCR Kiti, PCR inhibisyonunu izlemek ve numunenin kalitesini ve tespit sonucunu doğrulamak için bir PCR kontrolü içerir. *Toxoplasma gondii* TaqMan PCR Kiti, hedef ve PCR kontrol tespiti için bir Ana Karışım, Primer ve Prob Karışımı ve ayrıca kit reaktiflerinin bütünlüğünü doğrulamak için bir pozitif kontrol ve bir negatif kontrol (nükleaz içermeyen su) içerir (Çizelge 3.20).

Çizelge 3.20 *Toxoplasma gondii* nitel içerik kiti

Bileşen	Miktar
MDx TaqMan 2X PCR ana karışımı	2 x 700 µL
CMV primer ve prob karışımı	280 µL
CMV pozitif kontrol	150 µL
Nükleaz içermeyen su (Negatif kontrol)	1,25 mL
Ürün ek parçası	1

TaqMan PCR testi hazırlanması;

- Kullanmadan önce, tüm TaqMan PCR bileşenlerinin uygun miktarları oda sıcaklığında tamamen çözölmeli, hafifçe vortekslenerek veya pipetleme yoluyla karıştırılmalı ve kısa bir süre santrifüj edilmelidir.
- Buz üzerinde hızlı çalışılmalıdır.
- MDx TaqMan 2X PCR Master Mix miktarı 128 PCR reaksiyonuna (96 örnek PCR, 16 pozitif kontrol PCR ve 16 şablonsuz kontrol PCR) kadar yeterli olacaktır.
- Sonuçların doğru yorumlanması için her TaqMan PCR çalışması için *Toxoplasma gondii* Pozitif Kontrol içeren bir reaksiyon ve şablon kontrolü olmayan bir reaksiyon eklenmelidir.

- TaqMan PCR çalışması başına önerilen minimum test edilen DNA örneği sayısı 6'dır.
- TaqMan PCR testini hazırlarken herhangi bir kontaminasyonu önlemek için, Negatif Kontrol, Tespit Testi ve Pozitif Kontrol'ü hazırlamak için aşağıdaki sıra izlenmelidir:

PCR Negatif Kontrolünün hazırlanması (Çizelge 3.21)

PCR *Toxoplasma gondii* Testinin hazırlanması (Çizelge 3.22)

PCR Pozitif kontrolünün hazırlanması (Çizelge 3.23)

Her TaqMan PCR seti için, Çizelge 3.21’de gösterildiği gibi bir şablonsuz kontrol PCR hazırlanır:

Çizelge 3.21 TaqMan PCR negatif kontrol hazırlığı

PCR Bileşenleri	Hedef tespiti (MDx TaqMan 2x PCR Maseter Mix ile)
Nükleaz içermeyen su	8 µL
MDx TaqMan 2x master mix ile	10 µL
<i>Toxoplasma gondii</i> primer ve prob karışımı	2 µL
Toplam hacim	20 mL

Numune tespiti için PCR reaksiyonunu Çizelge 3.22’de gösterildiği gibi hazırlanır.

Çizelge 3.22 TaqMan PCR *Toxoplasma gondii* testi hazırlanması

PCR Bileşenleri	Hedef tespiti (MDx TaqMan 2x PCR Maseter Mix ile)
Nükleaz içermeyen su	5 µL
MDx TaqMan 2x master mix ile	10 µL
<i>Toxoplasma gondii</i> primer ve prob karışımı	2 µL
Örnek DNA	3 µL
Toplam hacim	20 mL

Her PCR seti için, Çizelge 3.23’te gösterildiği gibi bir pozitif kontrol PCR hazırlanır:

Çizelge 3.23 TaqMan PCR pozitif kontrol hazırlığı

PCR Bileşenleri	Hedef tespiti (MDx TaqMan 2x PCR Maseter Mix ile)
MDx TaqMan 2x PCR master karışımı	10µL
<i>Toxoplasma gondii</i> primer ve prob karışımı	2 µL
<i>Toxoplasma gondii</i> pozitif kontrol (PosC)	8 µL
Toplam hacim	20 mL

Toxoplasma gondii TaqMan PCR testi programlama;

- Termosiklet Çizelge 3.24’de gösterilen programa göre programlanır
- TaqMan PCR testini çalıştırılır.

Çizelge 3.24 *Toxoplasma gondii* TaqMan PCR programı

PCR Döngüsü	Aşama	Sıcaklık	Süre
Döngü 1	1. adım	95	3 dk.
Döngü 2	1. adım	95	15 s
	2. adım	60	30 s

Çizelge 3.25 Analiz sonuçlarının yorumlanması (*Toxoplasma gondii*)

FAM (Hedef tespiti)	HEX (PCR doğrulaması)	Sonuç
+	+	Olumlu
—	+	Negatif
—	—	PCR engellendi

3.3 İstatistiksel Analiz

Çalışmanın tüm verileri IBM SPSS paket programı (versiyon 26.0) kullanılarak Ki-kare testi kullanılarak istatistiksel olarak analiz edilmiş ve elde edilen sonuçların anlamlılığı %5 düzeyinde değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Talasemi major, en yaygın otozomal tek gen talasemi bozukluklarından biridir. Dünya çapında 150 milyona varan taşıyıcı nüfusu ile 60'tan fazla ülkede yaygındır. Şiddetli aneminin komplikasyonlarını azaltmak için erken ve düzenli kan transfüzyonu tedavisi zorunludur. Bu çalışmada, Wasit ilinde yaşayan Iraklı beta-talasemi majör hastalarında HBV, HCV, CMV ve *Toxoplasma gondii* prevalansı ve risk faktörleri araştırılmıştır.

Çalışma popülasyonu 500 beta-talasemi majör hastasından oluşmuştur. Bunlardan 317'si viral, 144'ü enfeksiyonu olmayan ve 39'u kan transfüzyonu olmayan talasemi hastalarını içermektedir. Hastaların %67'si erkek, %33'ü kadın olup yaşları 5±50 yıl arasında değişmektedir.

Çizelge 4.1'e göre, HBs-IgM (%2,2) dört erkek (%1,3) ve üç kadında (%0,94) pozitif, HBs-IgG (%5,05) dokuz erkek (%2,8) ve yedi kadında (%2,2) pozitif bulunmuştur. HCV-IgM 16 erkek (%5,04) ve 10 kadın (%3,2) olmak üzere toplam 26 hastada (%8,2) pozitifken, HCV-IgG 27 (%8,5) erkek ve 19 (%6) kadın olmak üzere 46 hastada (%14,5) pozitifdir. CMV 314 (%99) hastada pozitif olup, CMV IgM 47 (%14,8) hastada pozitifdir. Bu 47 hastanın, 17'si (%5,4) erkek ve 30'u (%9,5) kadın olarak dağılım göstermiştir. CMV IgG (%267) pozitif olan hastaların 128'i (%40,4) erkek ve 139'u (%43,8) kadındır. Son olarak, *Toxoplasma gondii* IgG'si 40 (%12,6) hastada pozitif olup dağılımı 22 (%6,9) erkek ve 18 (%5,7) kadındır. IgM'de ise hiçbir hastada tespit edilmemiştir.

Tekrarlanan kan ve kan nakli süreci ürünleri, başta talasemi hastaları olmak üzere kan ihtiyacı olan hastalara hepatit B, hepatit C virüsü bulaştırma yöntemlerinden biridir. HCV-Ab ve HBsAg testleri bağışlanan kanı taramak için zorunlu hale gelmeden önce, hepatit B ve C virüsleri uzun süreli enjeksiyon alan hastalarda kan transfüzyonlarını takiben hepatitin ana nedenidir.

Günümüzde hepatit B virüsü aşılama ile önemli ölçüde kontrol altına alınmıştır. Bununla birlikte, talasemi hastalarının pencere döneminde toplanan kan yoluyla hepatit C edinme riski bulunmaktadır (Mukherjee *et al.* 2017).

Talasemi hastalarında bağışıklık sistemini zayıflatan faktörler de göz önünde bulundurulmalıdır; örneğin sık kan nakli, demir hastaları, düşük çinko seviyeleri ve hastane ortamından enfeksiyon kapma olasılığı. Ancak, “güvenli kan transfüzyonunda” bir ihlal olduğunda bu hastalar özellikle HCV, HBV ve HIV enfeksiyonları başta olmak üzere transfüzyonla bulaşan hastalıklar şeklinde yeni klinik zorluklarla karşı karşıya kalırlar.

Seropozitiflik prevalans oranı transfüzyon ünitelerinin sayısı ile artmaktadır (Sinha *et al.* 2019).

Çalışmamızın sonuçlarına göre, bazı talasemi hastaları HBsAg açısından pozitifdir, bu da Wasit ilindeki Irak Halkı arasında beta-talasemi majör hastaları arasında hepatit B virüsü prevalansının (%1,6) olduğunu göstermektedir. Bu durum, HBsAg testlerinin kan taramasındaki etkinliğinden ve ayrıca ülkedeki kapsamlı hepatit B aşılama programından kaynaklanmaktadır (Mirzaei *et al.* 2021).

Birbirini izleyen uzun süreli transfüzyonlar, B-TM'li hastaları hepatit de dahil olmak üzere çok çeşitli patojenlerle enfeksiyon riskine maruz bırakmaktadır. Son yıllarda, etkili aşılama ve tarama prosedürleri kan ürünleri yoluyla hepatit B virüsü (HBV) bulaşmasını önemli ölçüde azaltmıştır. Ancak, hepatit C virüsüne (HCV) hala kan alıcılarının nispeten yüksek bir oranında rastlanmaktadır. HCV, dünya genelinde transfüzyonla ilişkili A ve B dışı hepatit enfeksiyonlarının %90'ından sorumludur (Bazi *et al.* 2016).

Çalışmamızın sonuçları, pozitif HCV antikoru için yaş ortalamasının negatif HCV antikorundan anlamlı derecede yüksek olduğunu göstermiştir. Bu sonuç, tekrarlayan kan transfüzyonu nedeniyle HCV enfeksiyonuna daha fazla maruz kalınması nedeniyle beklenmektedir. Gözlemlerimiz, talasemik hastalar arasında HCV enfeksiyonu edinimi

için ana risk faktörü olarak kan transfüzyonunu güçlü bir şekilde göstermiş ve viral bulaşmanın önlenmesi veya azaltılmasında donör taramasının belirgin etkinliğini doğrulamıştır.

İtalya ve ABD'de yapılan kohort çalışmaları da kan donörü taramasının etkinliğini belgelemiştir. Hasta yaşlandıkça kan transfüzyonu insidansı artar; bu da HCV enfeksiyonu insidansını ve HBsAg pozitifliğini artırır. Bu nedenle, talasemik popülasyonda HCV enfeksiyonu insidansını azaltmak için güvenli kan sağlamak önemlidir. Çalışmamızda HCV seropozitifliği prevalansının yüksek olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte, hastalarla yapılan görüşmelerde, hastaların neredeyse tamamında transfüzyon öncesi HCV antikor taramasının garanti edilmediği başka merkezlerden kan transfüzyonu yapıldığı öğrenilmiştir. Ayrıca, hastalarımızın çoğunun ebeveynleri, transfüze edilen kanda HCV antikor taramasının öneminin farkında değildir (Dahl *et al.* 2020).

Şiddetli aneminin komplikasyonlarını azaltmak için erken ve düzenli kan transfüzyonu tedavisi zorunludur.

Talasemi hastaları aşırı demir yükü ve HBV, HCV ve CMV gibi TTI'lar açısından risk altındadır.

Irak'ta kan bağışçıları için HCV antikorları, HBsAg ve HIV antikorları tarama testleri bulunmaktadır. Ayrıca, son zamanlarda bazı kan bankaları CMV antikorları ve sifiliz antikorlarını da kan bağışçısı taramasına eklemiştir.

Bu testler, ulusal ve resmi kan bankalarında ELISA veya immünofluoresans temelli yöntemlerle yapılmakta olup yüksek hassasiyet ve özgüllüğe sahiptir. Bununla birlikte, birçok sivil toplum kuruluşu ve özel hastane, kan bağışçısı taraması için bazen daha düşük hassasiyet ve özgüllüğe sahip hızlı ve ucuz immünokromatografik yöntemler kullanmakta ve bu da TTI oranlarının artmasına katkıda bulunmaktadır.

1990'ların başında HCV ve HBV için rutin kan bağışçısı tarama testleri, bir kohort çalışmasında HCV'nin kan alıcılarına transfüzyonunda yaklaşık %70'lik bir azalmaya yol açmıştır.

Ayrıca, RT-PCR gibi gelişmiş tarama yöntemlerinin kullanılmaya başlanması, transfüzyonla ilişkili viral hepatitlerin daha da azalmasına yol açmıştır.

RT-PCR teknolojileri viremiyi mevcut tarama testlerinden daha erken tespit edebilmektedir. Amerika Birleşik Devletleri gibi bazı gelişmiş ülkelerdeki kan merkezleri, 1999 yılından bu yana tüm kan bağışları için RT-PCR'yi rutin olarak uygulamaktadır.

Bu strateji, HCV tespiti için pencere dönemini 50-60 gün azaltmış ve HCV bulaşma riskini 103.000'de 1'den 2.000.000 transfüzyon ünitesinde 1'e düşürmüştür (Mahmoud *et al.* 2016).

Sağlıklı konaklarda *T. gondii* enfeksiyonu nadiren semptomatiktir, ancak bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde ortaya çıkan toksoplazmoz yüksek hastalık riskine neden olabilir.

Seropozitiflik düzeyi dünyanın farklı bölgelerinde değişiklik göstermekte olup çoğu ülkede %30 ile %60 arasında değişmektedir. Hücresel istiladan sonra, *T. gondii* konak hücrelerin plazma zarından taklit edilen bir vakuol içinde ikamet eder.

Bu kistler parazitin adaptif konakçı bağışıklığından kaçmasına izin verir. Doku kistleri yırtıldığında, serbest kalan sakin kistler konakçı bağışıklık sistemi tarafından öldürülür.

β -talasemi hastalarında olduğu gibi kan transfüzyonu enfeksiyonlarına çok az ilgi gösterilmektedir.

Toksoplazmoz, özellikle akut evredeki seropozitif asemptomatik bireylerden transfüzyonla bulaşabilen bir enfeksiyon olarak kabul edilir. *T. gondii* birçok sistemi etkileyen fırsatçı bir parazit olduğu için bu enfeksiyon talasemi hastalarına ekstra yük getirmektedir.

Bildiğimiz kadarıyla bu çalışma, Irak'ta talasemi hastaları arasında toksoplazmozü gösteren ilk çalışmadır (Mousa, N. M. and Nahab 2020).

Sitomegalovirüs enfeksiyonu, özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış hastalara yapılan transfüzyonlarda, kan transfüzyonu alıcıları için endişe kaynağıdır (Eivazi-Ziaei *et al.* 2013).

Seropozitif hastalarda CMV hastalığı ya önceden var olan bir suşun reaktivasyonu ya da yeni bir suşla yeniden enfeksiyon yoluyla ortaya çıkabilir. CMV seropozitif hastalarda CMV bulaşmasının önemini değerlendirmek zordur ve bir enfeksiyonun sonucu, hastanın virüse karşı mevcut bağışıklık durumundan güçlü bir şekilde etkilenmektedir.

Yeni edinilmiş HCMV enfeksiyonunun tanısı genellikle spesifik immünoglobulin (Ig) M antikorlarının saptanmasına, serokonversiyona veya spesifik IgG antikor konsantrasyonlarında önemli bir artışa dayanmaktadır. En güvenilir serolojik belirteç olan serokonversiyon ve IgG titrelerindeki artış nadiren gösterilebildiğinden, HCMV'ye özgü IgM antikorlarının saptanması akut enfeksiyonun teşhisinde en sık kullanılan serolojik prosedür olmuştur.

Bazı raporlar, IgG antikorlarının aviditesinin, HCMV enfeksiyonları da dahil olmak üzere, yeni primer enfeksiyonları uzun süreli enfeksiyonlardan ayırt etmek için bir belirteç olarak kullanılabileceğini göstermiştir (Mohammad *et al.* 2022).

4.1 Demografik Bulgular

Bu çalışmada yaş 5 ile 50 arasında değişmektedir. HBV (19,6), HCV (20,95), CMV (18,95) ve Toxoplasma (20,85) ile β -talasemi majörün ortalama yaş, erkek ve kadın hastalardaki sıklığı ve yüzdeleri Çizelge 4.1’de gösterilmiştir.

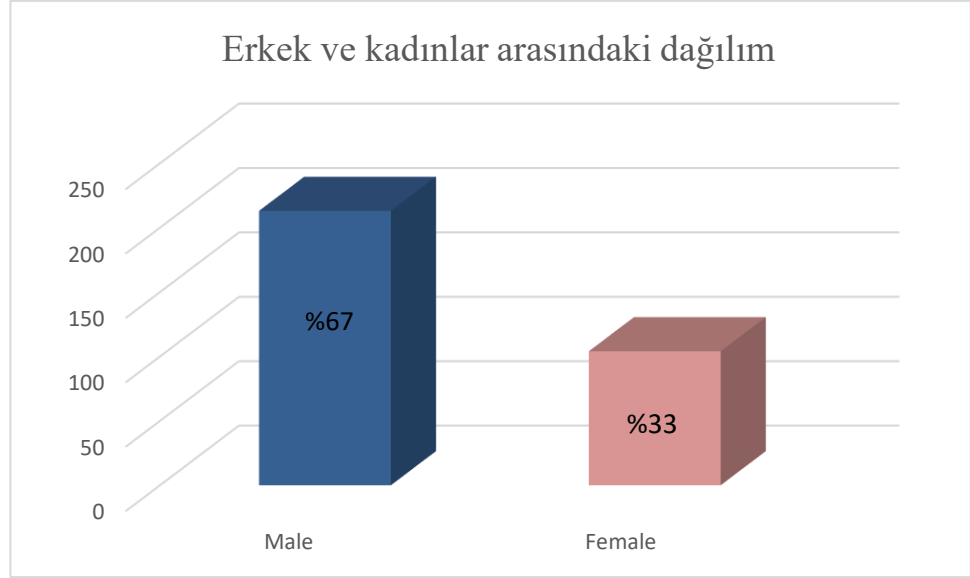
Çizelge 4.1 HBV, HCV, CMV, *Toxoplasma gondii* ve kontrollerin sıklığı

Tanı	Sıklık	Yüzde (%)	Erkek N (%)	Kadın N (%)
HBV(IgM)	7	2,2	4 (1,3)	3 (0,94)
HBV(IgG)	16	5,05	9 (2,8)	7 (2,2)
HBV Ag	5	1,6	3 (0,94)	2 (0,63)
HCV(IgM)	26	8,2	16 (5,04)	10 (3,2)
HCV(IgG)	46	14,5	27 (8,5)	19 (6)
HCV Ag	20	6,3	12 (3,8)	8 (2,5)
CMV (IgM)	47	14,8	17 (5,4)	30 (9,5)
CMV (IgG)	267	84,2	128 (40,4)	139 (43,8)
CMV Ag	28	8,8	16 (5,04)	12 (3,8)
<i>Toxoplasma</i> (IgM)	0	-	0	0
<i>Toxoplasma</i> (IgG)	40	12,6	22 (6,9)	18 (5,7)
<i>Toxoplasma</i> Ag	0	-	0	0

4.2 Erkek ve Kadınlar Arasındaki Dağılım

Yüzdeler, Şekil 4.1’de gösterildiği gibi erkekler ve kadınlar arasında değişiklik göstermiş olup, HBV’de erkeklerin görülme sıklığı kadınlardan biraz daha yüksektir.

İmmünolojik inceleme (IgM) moleküler tanıya (Ag) yakinken, (IgG) immünolojik inceleme özellikle erkeklerde daha yüksek enfeksiyonlar göstermiştir.



Şekil 4.1 Erkek ve kadınlar arasındaki dağılım

Bu sonuçlar, akut enfeksiyonda (IgM) %53,3'ünün (48/90) erkek ve %46,6'sının (42/90) kadın olduğunu belirten Amirhashchi *et al.* (2022) ile uyumludur ve kadınların erkeklerden daha fazla enfeksiyon geçirdiğini belirten Al-Sharifi *et al.* (2019) ile uyuşmamaktadır (%49, %51).

4.3 Biyokimyasal Sonuçlar

4.3.1 Demir parametreleri

Demir parametreleri (Serum Demir, TIBC (toplam demir bağlama kapasitesi), Serum Ferritin ve Transferrin saturasyonu) HBV, HCV ile BT'de tespit edilen değerlerden oluşmaktadır (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2 Enfeksiyonlar arasında demir, TIBC, Serum ferritin

Öge	Ortalama±SD BT HBV ile N(50)	Önemli (0,000) HCV'li BT N(50)	BT viral olmadan	P değeri
DEMİR/ µg/dL	346,10±84.298	293,8±91,130	330,66±97,690	<0,05
TIBC/ µg/dL	142,64±51,231	128,02±42,537	130,60±45,911	<0,05
SF ng/mL	3418,46±2116,506	4327,24±3180,191	3963,34±3026,491	<0,05

TIBC: Toplam demir bağlama kapasitesi, SF: Serum ferritin

Çizelge 4.2, sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında talasemi hastalarında serum demir seviyesinin önemli ölçüde arttığını göstermektedir. Bu, talasemi hastalarında demir seviyesinin talasemi olmayan kişilere göre daha yüksek olduğunu belirten Faraj and Al-Abedy (2021) ile uyumludur.

Öte yandan Faranoush *et al.* (2023) talasemi hastalarında kan transfüzyonu sıklığına bağlı olarak artan demir seviyelerini tanımlamaktadır. Serum demir seviyeleri konsantrasyonlarında kontrollere kıyasla hastalar arasında oldukça anlamlı bir fark vardır. Bu sonuç, kronik hepatit C hastalarında serum demirinin kontrole kıyasla önemli ölçüde daha yüksek olduğunu tespit eden Mohamed *et al.* (2019) ile uyumludur.

Demir depoları, belirtildiği gibi talasemi hastalarında yüksek demir konsantrasyonunu belirlemek için önemli bir göstergedir (Faraj and Al-Abedy 2021). Bu çalışma, Rujeerapaiboon *et al.* (2021)'in çalışmasında bahsedilene göre, HCV'li TB ve HBV'li TB'de önemli ölçüde daha yüksek ferritin seviyeleri göstermiştir, ikisi arasında fark yoktur. Bu çalışma, HBV'ye kıyasla HCV ile enfeksiyonun oldukça önemli olduğunu göstermiştir, bu da Qassim Welli *et al.* (2015) ile hemfikir, HBV'ye kıyasla HCV ile enfeksiyon oranında net bir artış göstermiştir.

Talasemi hastalarında kandaki demir seviyesinin artması, akut faz proteini olan ferritin seviyesinde de artışa neden olmaktadır.

Bu çalışma, viral hepatit C ($4327,24 \pm 3180,191$) ile enfekte olan hastalarda ferritin seviyesinin B tipine ($3418,46 \pm 2116,506$) kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğunu göstermiştir; bu, HCV hastalarında serum ferritininin anlamlı derecede yüksek olduğunu belirten Faraj and Al-Abedy (2021) ve viral hepatitin serum ferritin seviyelerini önemli ölçüde etkilediğini gösteren Rujeerapaiboon *et al.* (2021) ile uyumludur.

Yüksek TIBC seviyeleri demir eksikliği anemisinde, düşük TIBC seviyeleri ise hemolitik anemi, pernisiyöz anemi, orak hücreli anemi ve talasemide görülür (Faraj and Al-Abedy 2021). Çalışmamız, HCV'li TB veya TB'li HBV'de anlamlı olmayan bir TIBC seviyesi

göstermiştir, bu sonuç, karaciğer enzimlerindeki artışın bir sonucu olarak TIBC'de aynı sonuçları gösteren Mirzaei *et al.* (2021) ile uyumludur.

4.3.2 Karaciğer fonksiyon testi

Karaciğer fonksiyon testleri (ALT, AST, ALP ve TSB) BT hastaları ile HCV ve HBV'li BT hastaları karşılaştırıldığında oldukça anlamlı bir fark bulunmuştur.

Çizelge 4.3 Çalışılan grupların karaciğer fonksiyon sonuçları

Öge	Ortalama $\pm$ SD BT HBV ile N (50)	Önemli (0,000) HCV'li BT N (50)	BT viral olmadan	P değeri
ALT	75,60 $\pm$ 36,489	89,00 $\pm$ 39,421	29,54 $\pm$ 11,445	<0,05
AST	65,48 $\pm$ 23,403	88,64 $\pm$ 41,048	32,14 $\pm$ 11,434	<0,05
ALP	280,60 $\pm$ 91,638	324,20 $\pm$ 155,462	179,76 $\pm$ 74,388	<0,05
TSB	2,606 $\pm$ 1,0641	3,248 $\pm$ 1,7756	1,230 $\pm$ 0,1972	<0,05

AST: Aspartat aminotransferaz, ALT: Alanin aminotransferaz, ALP: Alkalen fosfataz, TSB: Toplam serum bilirubini

Aşırı demir yüklenmesinin en önemli komplikasyonlarından biri, karaciğerde enzimlerinde dengesizliğe yol açan bir işlev bozukluğudur. Bu çalışmanın sonuçları ALT, AST, ALP ve TSB'de gözle görülür bir artış olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar, ALT, AST, ALP ve TSB için sırasıyla 91.13, 94.5, 205.17, 2.5 değerlerinden bahseden Faraj and Al-Abedy (2021) ile uyumludur. Ayrıca Madhi *et al.* (2021), hepatit C virüsü olan hastalarda karaciğer fonksiyon testlerinde kontrole kıyasla farklılıklar olduğunu göstermiştir. Salama *et al.* (2015) talasemi hastalarında çoklu kan transfüzyonuna bağlı olarak karaciğer enzimlerinde artış olduğunu belirtmiştir.

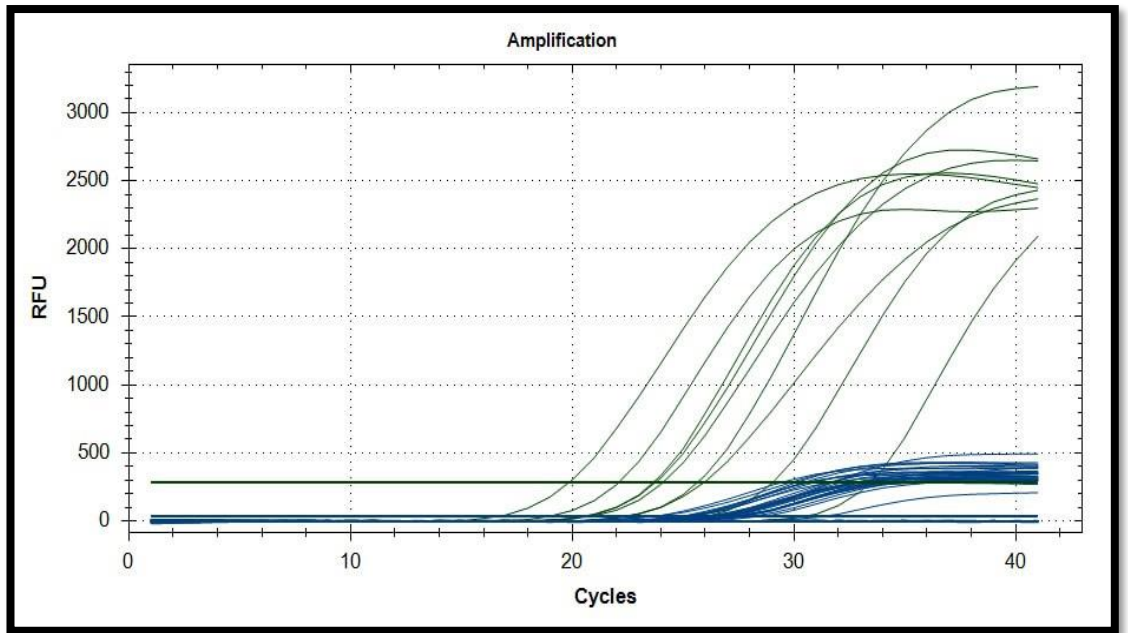
Bu çalışmada, hepatit B tipi talasemi hastalarında karaciğer enzimlerinin seviyesinin kontrole kıyasla biraz daha yüksek olduğunu belirlenmiştir. Ortalama sonuçların ALT, AST, ALP ve TSB'nin sırasıyla (75.60, 65.48, 280.60 ve 2.606) aldığı değerler (Amirhashchi *et al.* 2022, Wahidiyat *et al.* 2017) ile aynı fikirde değildir. Çalışmalarda hepatit B vakalarında karaciğer fonksiyon testi seviyesinin hepatit C'den daha fazla arttığı belirtilmiştir.

Bilirubin seviyesindeki artış, talasemi hastalarında, özellikle de hepatit B ve C'ye sahip olanlarda artan ferritin seviyesinden kaynaklanmaktadır ve bu, uzun süreli enjeksiyon alan hastalarda kan transfüzyonlarını takiben hepatitin ana nedenine işaret eder (Mirzaei *et al.* 2021, Madhi *et al.* 2021).

4.4 Hepatit B Virüsü için Viral Yük Sonuçları

Bu çalışmadaki çalışma popülasyonunda viral 317 beta-talasemi hastası belirlenmiştir. Bu sonuçlar tüm talasemi hastalarının ELISA tekniği ile pozitif olduğunu ortaya koymuştur.

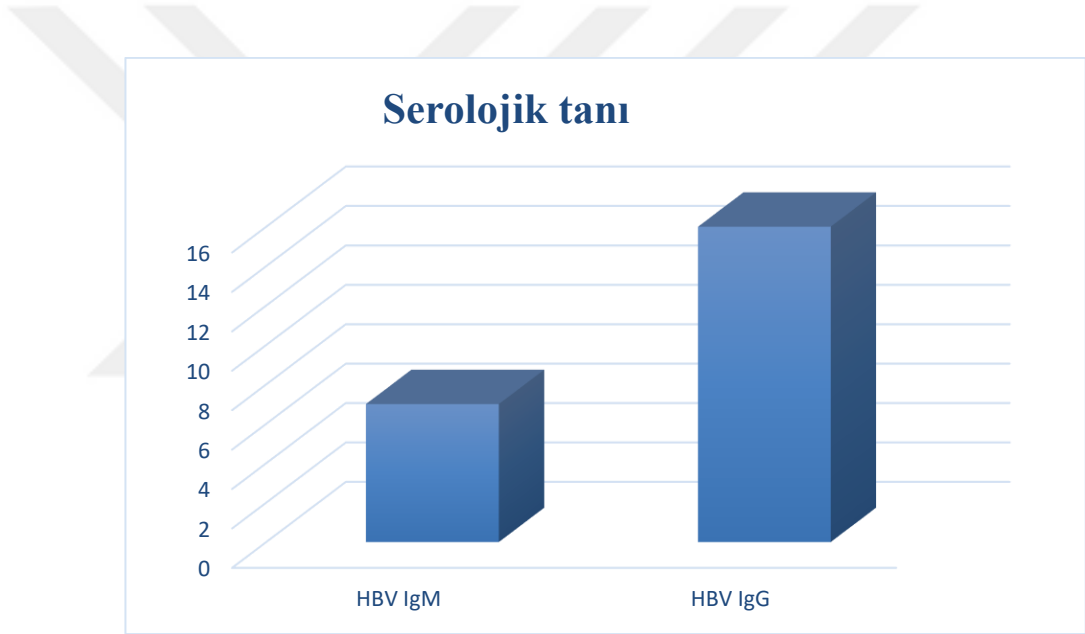
BT HCV ve HBV hastalarının HBV'sinin gerçek zamanlı PCR seviyeleri, hastaların 68'inde (%21) viremi olduğunu ve 1025-769806 kopya arasında değişen viral yük olduğunu ortaya koymuştur. Bu sonuçlar, Madhi *et al.* (2021) çalışmasında 28'inin (%42,4) HBV için pozitif sonuç verdiğini ve Faraj and Al-Abedy (2021) seropozitif hastaların 81'inin (%81) HBV için pozitif sonuç verdiğini tespit eden çalışmalarla uyumluluk göstermiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 Hepatit B virüsü için viral yük sonuçları

4.5 HBV'nin Serolojik Tanıya Bağlı Dağılımı

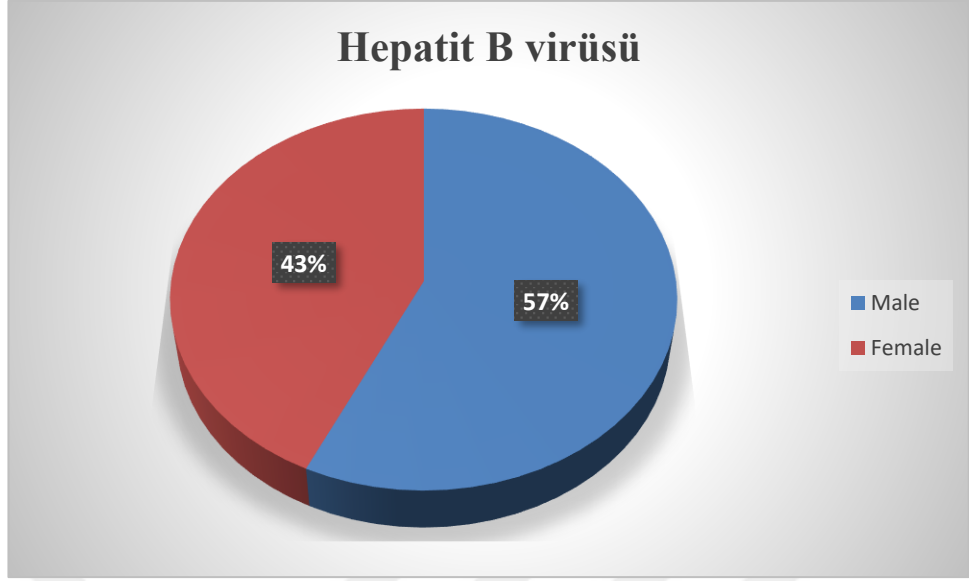
Serolojik tanıya bağlı olarak bu sonuç, immünoglobulin M'nin (IgM) immünoglobulin G'ye (IgG) kıyasla çok az olduğunu göstermektedir. İstatistiksel olarak, IgM ve moleküler tanı arasında anlamlı bir fark yoktur. Ancak, pozitif vakalarda moleküler tanının doğrulanması tercih edilirken, IgG ile moleküler tanı arasında anlamlı bir fark vardır. Viral olmayan hastalarla karşılaştırıldığında, enfekte kişilerin sayısının çok düşük olması enfeksiyona karşı aşılardan kaynaklanıyor olabilir. Bu sonuç birçok araştırmayla uyumluluk göstermiştir (Khounvisith *et al.* 2023, Ehsan *et al.* 2020, Khan *et al.* 2017) (Şekil 4.3).



Şekil 4.3 HBV'nin serolojik tanıya bağlı dağılımı

4.6 HBV'nin Cinsiyete Göre Dağılımı

Mevcut çalışmada, erkeklerin ve kadınların yüzdesi sırasıyla %57 ve %43'tür, bu sonuçlar Uppal *et al.* (2022) ve erkeklerin %53,38 ve kadınların %46,62 olduğunu belirten Bhuyan *et al.* (2021) ile uyumludur. Çoğu çalışma, erkeklerin yüzdesinin kadınlardan daha fazla olduğunu göstermiştir (Şekil 4.4).

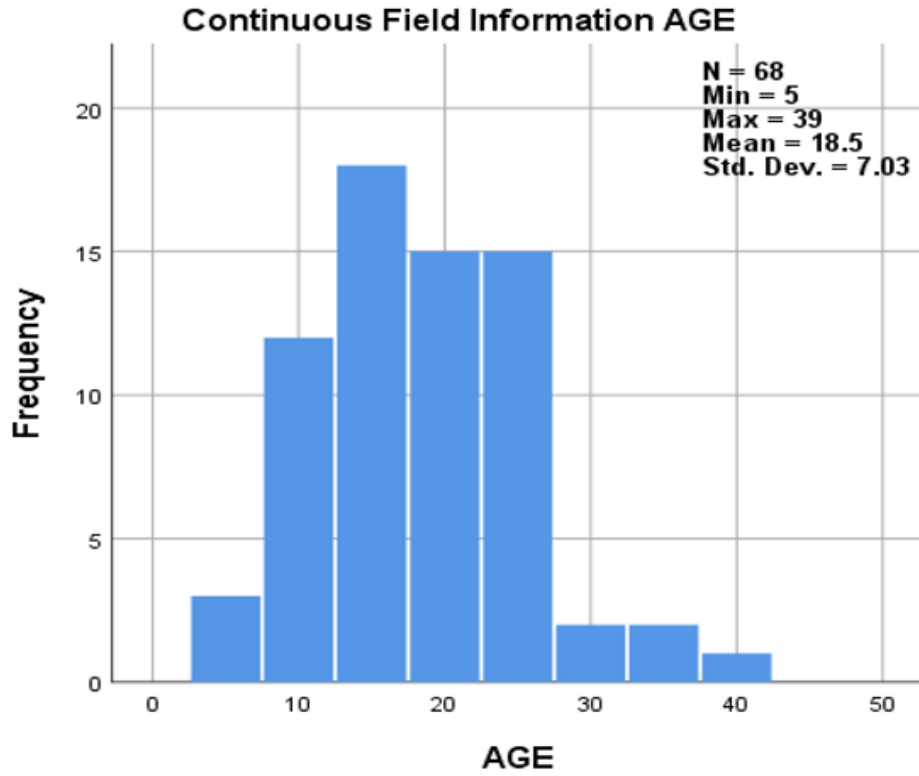


Şekil 4.4 HBV'nin cinsiyete göre dağılımı

4.7 HBV'nin Yaşa Bağlı Dağılımı

HBV'li hastalarda bu çalışmalarda yaş ortalaması $18,5 \pm 7,03$ olup yaş aralığı 5 ile 39 arasında değişmekte olup, bu sonuç $17,15 \pm 9,33$ olarak gösterilen yaş ortalaması ile örtüşmektedir (Bhuyan *et al.* 2021).

Bu sonuçlar, ortalama yaşın $20 \pm 9,5$ olduğunu açıklayan Mirzaei *et al.* (2021) ve $20 \pm 2,83$ olduğunu belirten Jallab and Easa (2020) çalışmaları ile uyumludur (Şekil 4.5).

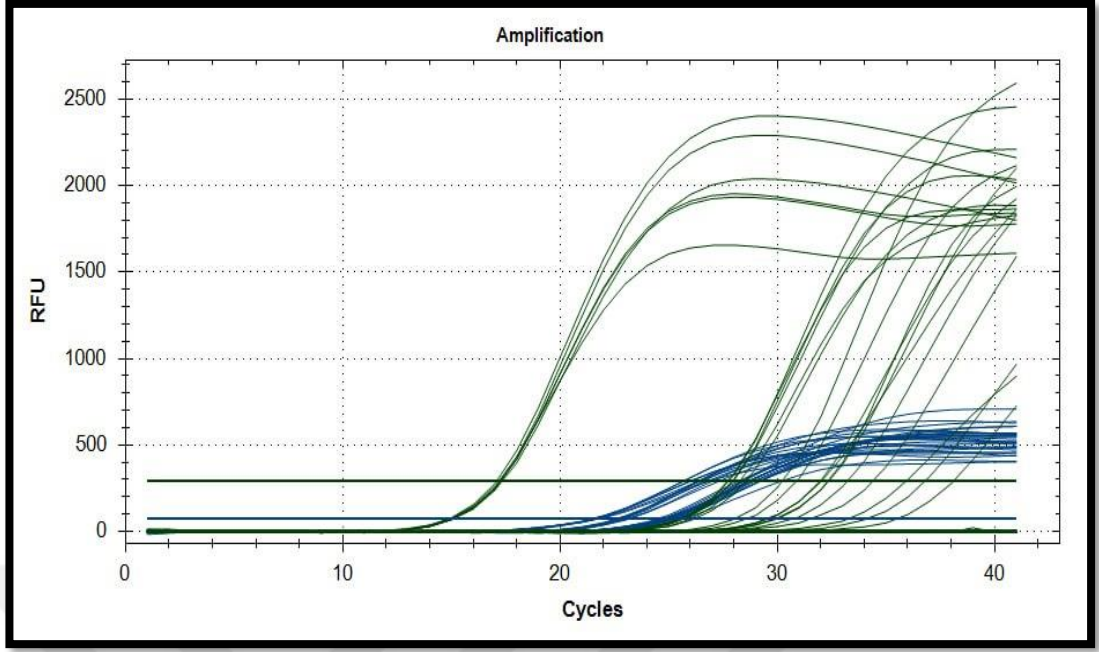


Şekil 4.5 HBV'nin yaşa bağlı dağılımı

4.8 Hepatit C Virüsü için Viral Yük Sonuçları

Serolojik tanıyı doğrulamak ve HCV hastalarının kanındaki viral yükleri (konsantrasyonları) ölçmek için Real-Time PCR ile moleküler kantitatif teknik kullanılmıştır. Bu durum talasemi hastalarının sağlığının bozulmasına, morbidite ve ölümlerin artmasına neden olmaktadır (Mobin-Ur-Rehman and Jan 2011).

Çalışma popülasyonunda bulunan 317 viral beta-talasemi hastasından, BT HCV ve HCV hastalarının HCV RNA'sının gerçek zamanlı PCR seviyeleri, hastaların 125'inin (%39) viremiye sahip olduğunu ve yüzdeleri 250-410,475 kopya arasında değişen viral yüke sahip olduğunu ortaya koymuştur. Madhi *et al.* (2021) çalışmasında 28 (%42,4) HCV RNA için pozitif sonuç verirken Faraj and Al-Abedy (2021), seropozitif hastaların 81'inde (%81) HCV RNA için pozitif sonuç vermiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6 RT-qPCR viral yük HCV için amplifikasyon grafiği

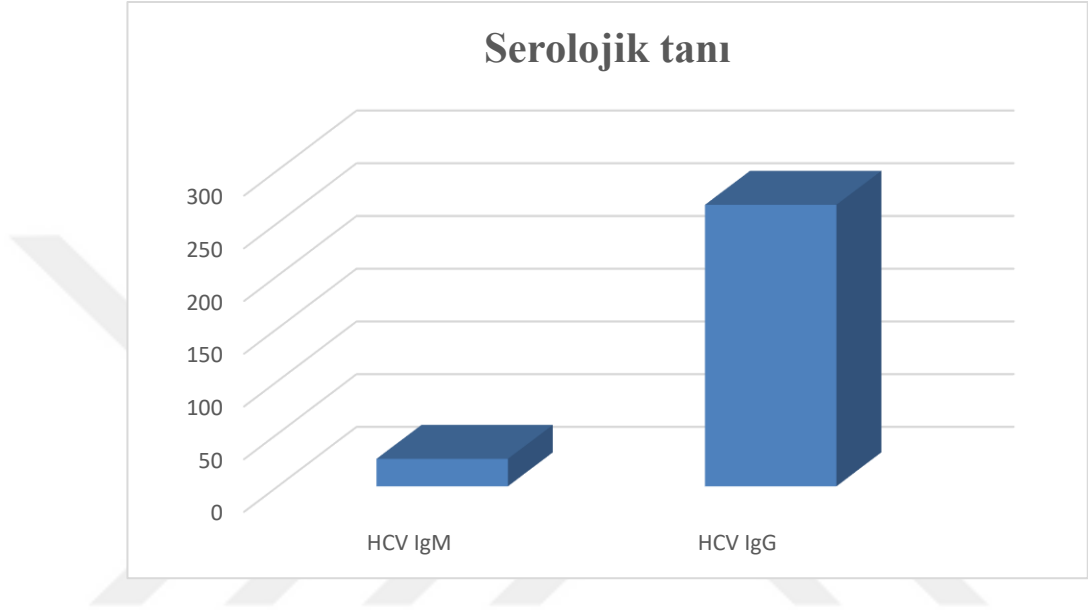
4.9 HCV'nin Serolojik Tanıya Bağlı Dağılımı

HCV'nin serolojik testlerdeki sonuçları karşılaştırıldığında, kronik enfeksiyon IgG'nin akut enfeksiyon IgM'den daha şiddetli olduğu ortaya çıkmaktadır.

Moleküler tanı sonuçları ile karşılaştırıldığında, akut enfeksiyon ile antijenin varlığı arasında önemli bir fark vardır. İmmünolojik testlerin sonuçlarında sapmalar vardır. Bununla birlikte, doğrulayıcı bir moleküler tanı tercih edilir. Ancak çoğu araştırmacı tarafından yapılmaz. Sinha *et al.* (2019) tarafından yapılan çalışmada uygulanan moleküler tanı ile immünolojik testlerin negatif sonuç verdiğini doğrulayan başka bir yeni çalışma yapılmamıştır.

Bu çalışmaya göre, hepatit C varlığı önceki yıllara kıyasla azalmıştır. Bunun nedeni, sağlık kurumlarında bağışçıların kanları için moleküler tanının doğrulanması ve böylece talasemi hastalarına bulaşmasının azaltılması olabilir.

Bu sonuç, Mohammad *et al.* (2022) tarafından daha düşük (%5,66) olarak açıklanan sonuçla uyumludur. Al-Shabany *et al.* (2016) da araştırmasında IgG'nin tüm hastalarda mevcut olduğunu belirtmiştir, bu sonuç bizim sonuçlarımızla tutarlıdır. Khan *et al.* (2017) ise çalışmasında yüksek bir HCV IgM oranından (%45,96) bahsetmiştir ki bu bizim çalışmamızda bildirilenin tam tersidir (Şekil 4.7).



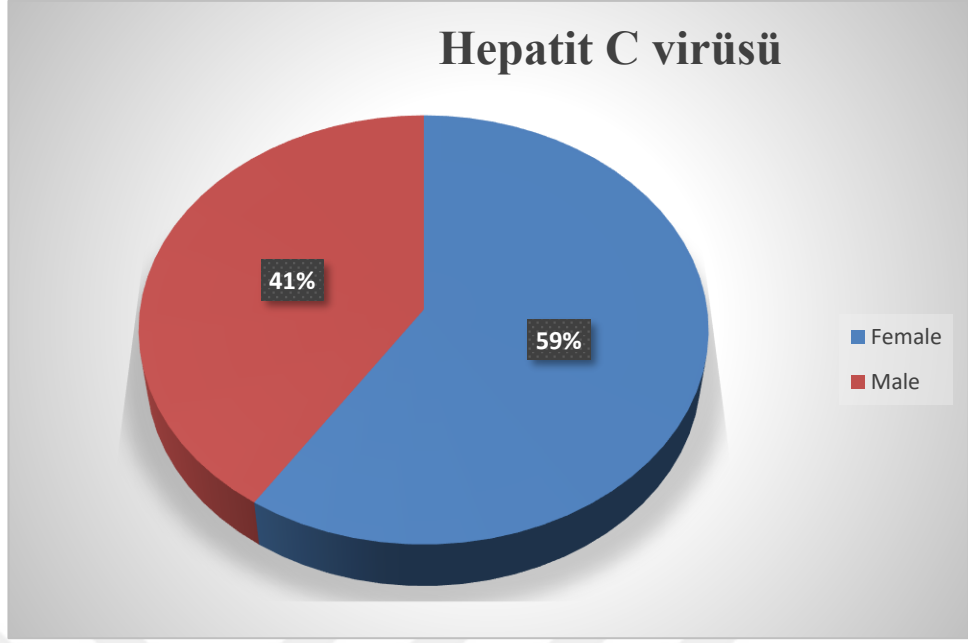
Şekil 4.7 HCV'nin serolojik tanıya bağlı dağılımı

4.10 HCV'nin Cinsiyete Göre Dağılımı

Mevcut çalışmada erkeklerin dağılımı 51 (%41) ve kadınların 74 (%59) idi, bu sonuçlar Wasit şehrinde kadın nüfusun erkeklerden daha yüksek olmasından kaynaklanmaktadır.

Bu sonuçlar Yousaf *et al.* (2021)'ın çalışmasında erkek hastalarda %47,54 olan prevalans oranına kıyasla kadınlarda %52,46 olan prevalans oranı ile uyumludur. Mohamed *et al.* (2023) HCV Ab prevalansının erkeklerde %44, kadınlarda ise %56 olduğunu belirtmiştir.

Bu sonuçlar, cinsiyete bağlı olarak seropozitif olan HCV enfeksiyonlarının yüzdesinden bahseden Abdulkadhim Sayah and Mohammed (2022) ile uyuşmamaktadır (Şekil 4.8).



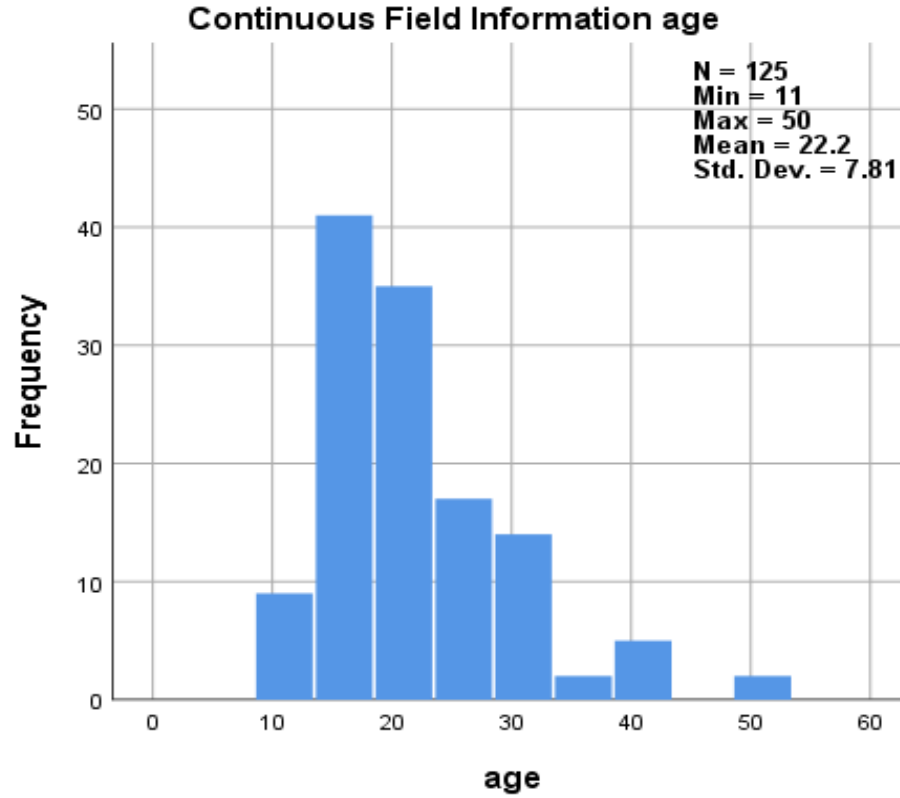
Şekil 4.8 HCV'nin cinsiyete bağlı dağılımı

4.11 HCV'nin Yaşa Bağlı Dağılımı

Çalışmaya katılan HCV hastalarının yaş ortalaması $24,09 \pm 8,248$ yıl ve yaş aralığı 11-50'dir (p-değeri 0,01). Sonuçlar, HCV pozitif talasemi hastalarının yaş ortalamasının $20,1 \pm 3,3$ olduğunu gösteren (Yousefi *et al.* 2017) ile uyumludur ve sonuçlar, yaş ortalamasının $21,5 \pm 8,9$ olduğunu gösteren Abdulkadhim Sayah and Mohammed (2022) ile uyuşmamaktadır ($P < 0,01$).

HCV-pozitif talasemi hastalarının yaş ortalamasını $20,1 \pm 3,3$ yıl olarak bildirmiştir. Khalil *et al.* (2016) yaş ortalamasının $10,30 \pm 4,65$ SD olduğunu belirterek çalışmamızla aynı fikirde değildir. Bu fark, hedef grubun genç yaşta HCV ile enfekte olmasından kaynaklanıyor olabilir.

Bu durum talasemi hastalarının sağlığının bozulmasına, morbidite ve ölümlerin artmasına neden olmaktadır (Mobin-Ur-Rehman and Jan 2011) (Şekil 4.9).

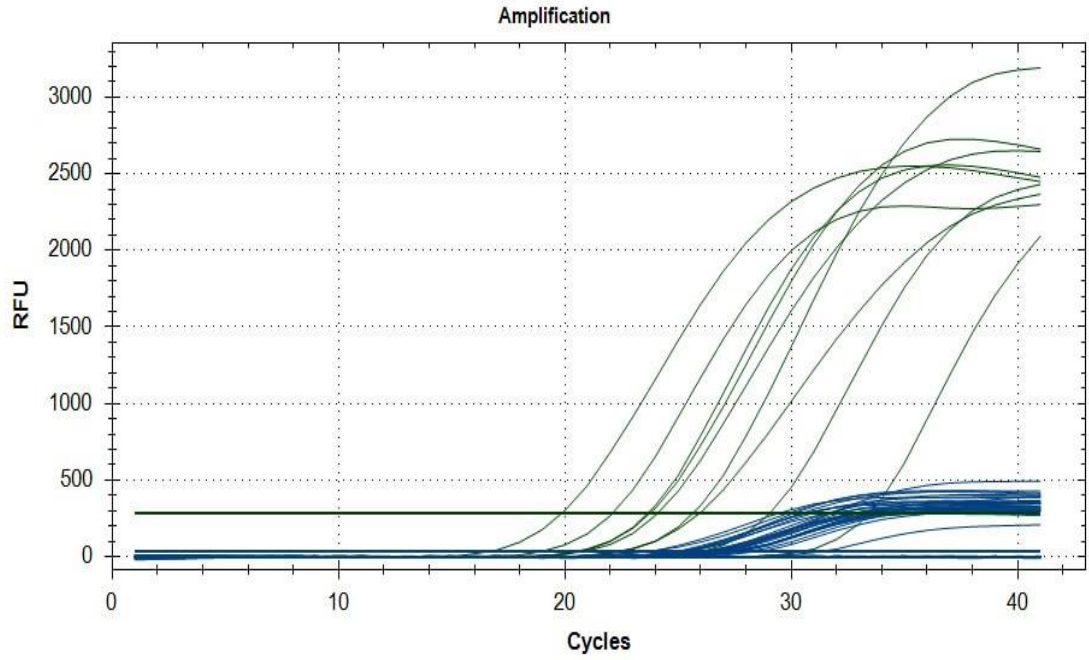


Şekil 4.9 HCV'nin yaşa bağlı dağılımı

4.12 CMV için Viral Yük Sonuçları

CMV hastalarının kanındaki viral yüklerin (konsantrasyonların) ölçümü ve serolojik tanının doğrulanması amacıyla Real-Time PCR ile moleküler kantitatif teknik kullanılmıştır.

BT CMV ve CMV hastalarının CMV'sinin gerçek zamanlı PCR düzeyleri, hastaların 47'sinin (%15) CMV'ye sahip olduğunu göstermektedir. Bu, talasemi hastalarının %12,79'unda CMV olduğunu gösteren (Aws *et al.* 2021, Yasir *et al.* 2013) ile uyumludur (Şekil 4.10).



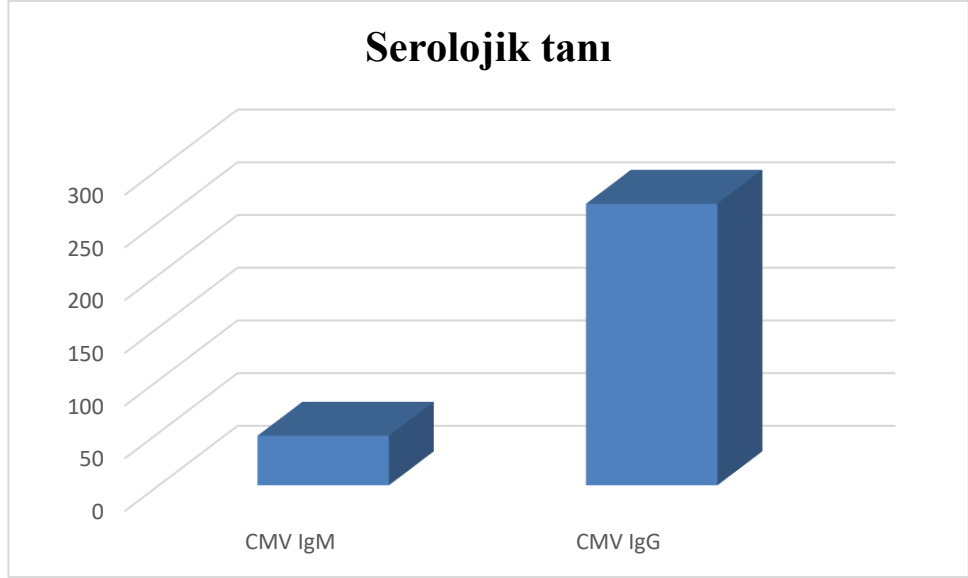
Şekil 4.10 RT-qPCR viral yük CMV için amplifikasyon grafiği

4.13 CMV'nin Serolojik Tanıya Bağlı Dağılımı

Serolojik tanıya bağlı olarak sonuçlar, immünoglobulin M'nin (IgM) immünoglobulin G'ye (IgG) kıyasla çok az olduğunu göstermektedir

Önceki çalışmalarla karşılaştırıldığında bu oran mantıklı bir orandır ve kadınların erkeklerden daha fazla olması, belki de kadınların bağışıklık aktivitesinin erkeklerden daha az olmasından kaynaklanmaktadır.

Bazı çalışmalar, akut enfeksiyonda önemli bir fark olmadığını göstermiştir. Khan *et al.* (2017) çalışmasında, insanların enfeksiyondan kaçınmanın gerekliliği konusundaki entelektüel farkındalığının oluştuğunu belirtmiştir. Ayrıca Noviar (2017) kronik enfeksiyonun akut enfeksiyondan daha fazla olduğunu tespit etmiştir. Bu çalışmanın sonucu Aws *et al.* (2021) tarafından yapılan çalışmanın sonuçlarıyla uyumluluk göstermiştir (Şekil 4.11).

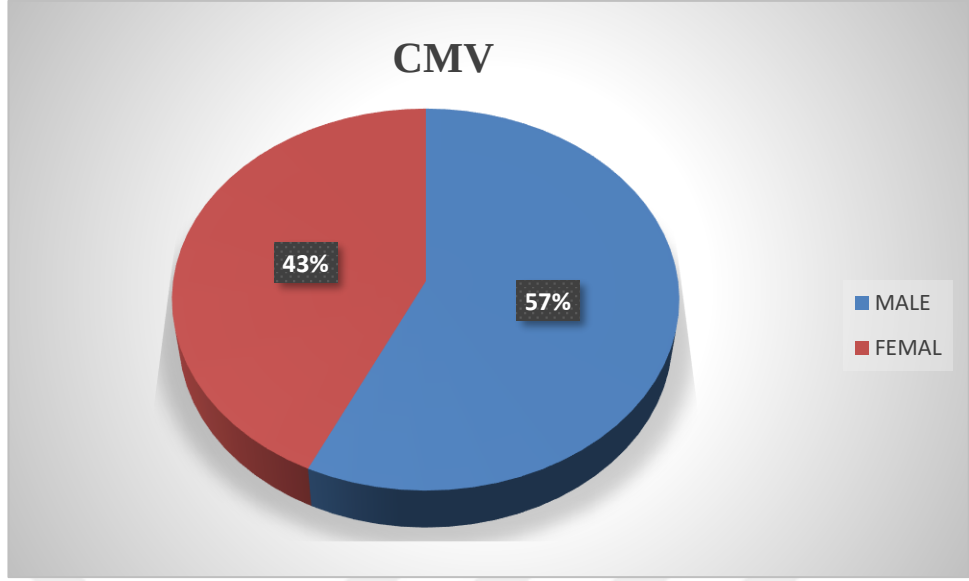


Şekil 4.11 CMV'nin serolojik tanıya bağlı dağılımı

4.14 CMV'nin Cinsiyete Göre Dağılımı

Bu çalışma, cinsiyete göre, erkeklerin sayısının (sırasıyla 16 (%57) ve 12 (%43)) kadınlardan daha fazla olduğunu göstermiştir.

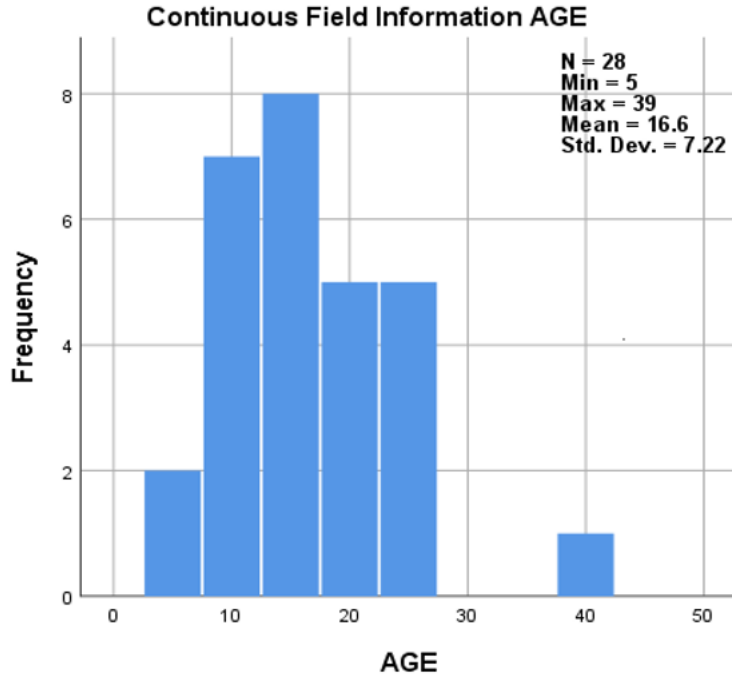
Bu sonuç Alsayab *et al.* (2023)'ın 43 (58,9) erkek ve 30 (41,1) kadın olduğunu belirttiği çalışmayla örtüşmektedir. Dolayısıyla, erkeklerin yüzdesi de 55 (%42) erkek ve 43 (36.1) kadından daha fazla olduğunu tespit eden Saleh and Al-Numan (2019) çalışması ile de uyumludur. Ancak, Di Benedetto *et al.* (2019) çalışmasında kadınların erkeklerden (%18,1) daha fazla olduğu belirtilmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12 CMV'nin cinsiyete bağlı dağılımı

4.15 CMV'nin Yaşa Bağlı Dağılımı

CMV'nin yaşa göre dağılımı ortalama 16.6 ± 7.2 yıl ve yaş aralığı 5-39 yıl (p-değeri 0,01) olarak belirlenmiştir (Şekil 4.13).



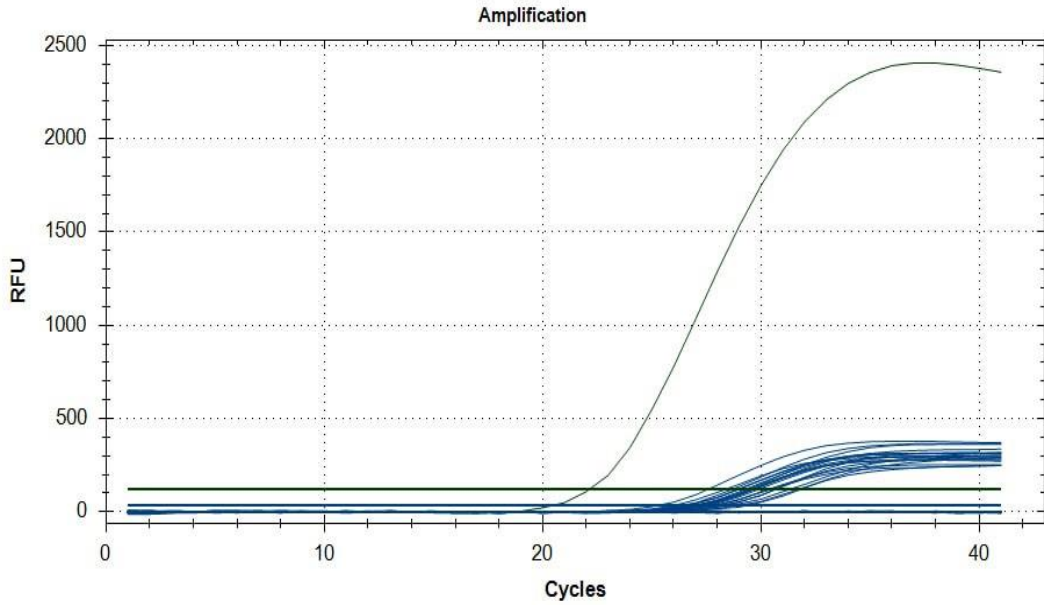
Şekil 4.13 CMV'nin yaşa bağlı dağılımı

İki farklı çalışmada, Saleh and Al-Numan (2019) ve Yasir *et al.* (2013) orta yaştın diğerlerinden daha sık değerlere sahip olduğunu belirtmiştir.

Elde ettiğimiz sonuçlar, ortalama $9,8 \pm 4,4$ aralığından bahseden Alsayab *et al.* (2023) ile uyuşmamaktadır.

4.16 *Toxoplasma gondii*'nin Moleküler Tanısı

Bu çalışmada, moleküler tanı üzerine parazit ile enfeksiyona ilişkin herhangi bir sonuç elde edilmemiştir. Her ne kadar Dabirzadeh *et al.* (2022) sonuçlarında talasemi hastalarında parazit ile bir enfeksiyon olduğundan bahsetmiş olsa da, bu durum fark edilmeyen bir sonuç olabilir (Şekil 4.14).



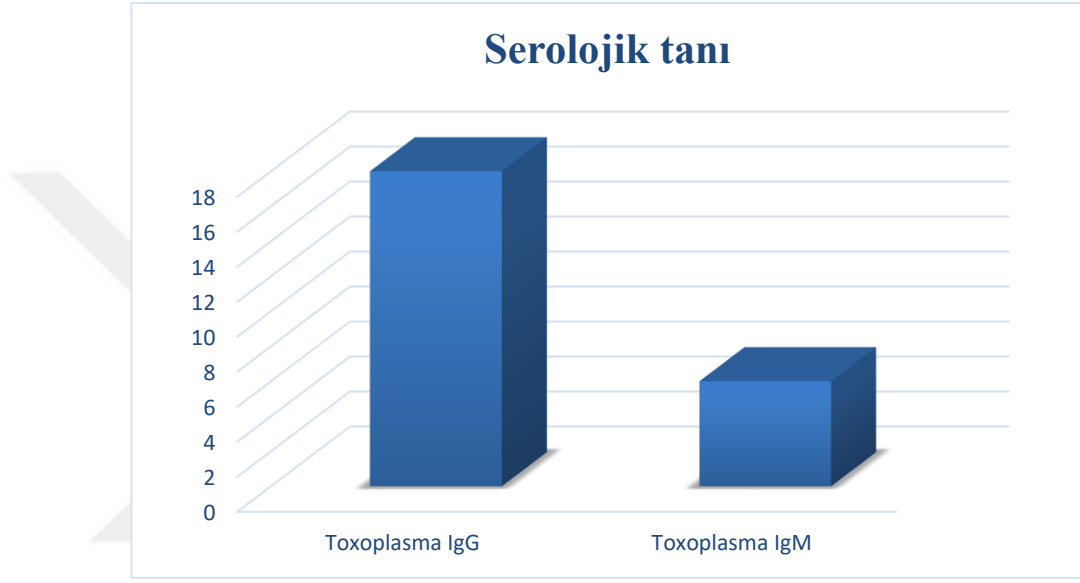
Şekil 4.14 RT-qPCR yük toksoplazma kontrolü için amplifikasyon grafiği

4.17 *Toxoplasma gondii*'nin Serolojik Tanıya Bağlı Dağılımı

Bu çalışmaya göre, immünolojik ve serolojik tanıya dayalı sonuçlar, IgG'nin talasemi hastalarında kontrole kıyasla daha yüksek olduğunu ortaya koymuştur. Aynı zamanda,

IgM de talasemi hastalarında daha yüksektir ve Hanifehpour *et al.* (2019) çalışmasıyla uyumludur.

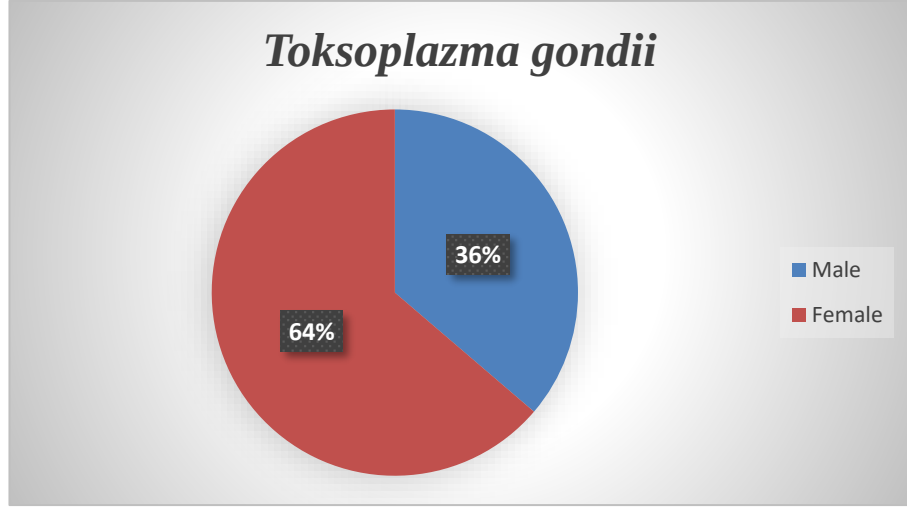
β -talasemi hastalarında *T. gondii* enfeksiyonunun tespiti için ELISA ve PCR sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki gözlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar Abd El-Latif *et al.* (2023) tarafından yapılan çalışma ile uyumludur (Şekil 4.15).



Şekil 4.15 *Toxoplasma gondii*'nin serolojik tanıya bağlı dağılımı

4.18 Toksoplazmanın Cinsiyete Göre Dağılımı

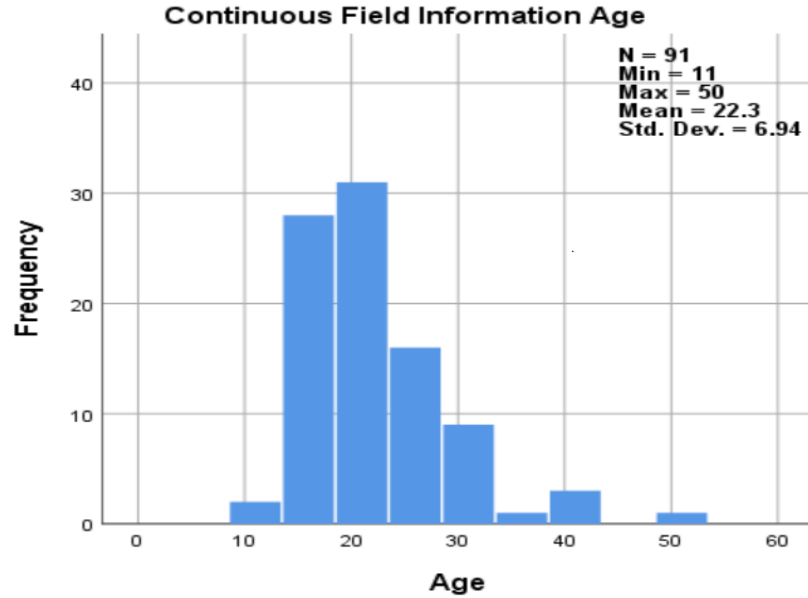
Toxoplasma paraziti enfeksiyon belirtisi göstermeyen parazitlerden biridir. Semptomlar ve belirtiler bağışıklık seviyesi azaldığında, özellikle talasemi hastaları gibi bağışıklık sistemi zayıf kişilerde ortaya çıkabilir. Kadınlar bu parazitte erkeklerden daha fazla enfekte olur ve bu çalışma, yakın zamanda yapılan çalışmalarda bildirilen erkeklerin kadınlardan enfeksiyona daha az duyarlı olduğu sonucunu doğrulamıştır (Çizelge 4.16).



Şekil 4.16 Parazitin cinsiyete bağlı dağılımı

4.19 Toksoplazmanın Yaşa Bağlı Dağılımı

Bu çalışmada parazitin ortalama yaşı $22,3 \pm 6,94$ olup yaş aralığı 11- 50'dir. Bu sonuçlar, orta yaşın diğer yaşlardan daha fazla olduğunu belirten Saleh and Al-Numan (2019) ve Yousefi *et al.* (2017) çalışmalarla uyumludur.



Şekil 4.17 Parazitin yaşa bağlı dağılımı

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma, talasemi hastalarına bulaşan patojenlerin tespiti arasında bir karşılaştırma sunmuş ve bu patojenlerin çoğunun donör kanından talasemi hastalarına bulaştığı bulunmuştur.

Talasemi majör hastaları gibi sık kan alanlar arasında HCV prevalansı hala çok yüksektir. Bu durum, bağışlanan kan torbalarında HCV antikoru taramasının geç başlamasına bağlanabilir. HCV'nin HBV'ye kıyasla yüksek prevalansından sorumlu olabilecek bir başka gerçek de HCV'ye karşı korunmak için şu ana kadar herhangi bir aşının mevcut olmamasıdır.

Talasemi majör transfüzyona başlamadan önce veya mümkün olan en kısa sürede Hepatit B aşısını tamamlamalıdır. Anti HBS antikor titresinin artması Hepatit B viral enfeksiyonuna karşı koruyucudur.

Bu çalışma, kan transfüzyonunun talasemi hastaları için yararlı bir tıbbi müdahale olduğunu, ancak özellikle Irak'ta kan donörlerinden fırsatçı Toxoplasma enfeksiyonunu bulaştırabileceğini göstermektedir.

Düşük oranda yaygın olsa bile. Anti-*T. gondii* antikorları için serolojik yöntemle kan taraması, talasemi hastalarında kan transfüzyonundan önce rutin bir araştırma olarak düşünülmeli ve yapılmalıdır.

Gelişmiş ELISA tarama testleri, karaciğer enzimleri ve RT-PCR'yi içeren yeni katı kan tarama programlarının, kan transfüzyonları ile ilişkili TTI riskini azaltacağı umulmaktadır.

Enfeksiyon erkekler ve kadınlar arasında farklılık göstermiş, kadınlar daha az enfekte olmuş, Sitomegalovirüs enfeksiyonu kadınlarda artmıştır.

Talasemi hastalarına bulaşan patojenlerin çoğu kan transfüzyonu yoluyla olmaktadır.

İmmünolojik ve moleküler tanı olmak üzere iki teknik arasında önemli bir fark olduğunu ve immünolojik tanıya güvenmenin mümkün olmadığı tespit edilmiştir. Tek başına immünolojik incelemenin yetersiz olduğu ve moleküler tanı ile doğrulayıcı incelemenin yapılması gereklidir.

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, bu çalışmada bahsedilmeyen diğer patojenlerin incelenmesi, Talasemi hastalarında immünolojik tanı yerine moleküler tanının onaylanması ve Talasemi hastalarına nakledilmeden önce donör kanının moleküler incelemesinin yapılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- Abbas, N. A. and Zaman, N. A. 2019. Serological study of human Cytomegalovirus in Thalassemia patients and blood donors and its relation to IL-6 in Kirkuk City. Rafidain Journal of Science, 28(1): 23-28.
- Abd El-Latif, N. F., Salem, A. I., Sadek, N. A., Salah, S. A., Shalaby, D. G. and Elhadad, H. 2023. Serological and molecular detection of *Toxoplasma gondii* in β . thalassemia patients. Journal of Parasitic Diseases, 47(4): 778-786.
- Abdul Hafeez, M., Mehdi, M., Aslam, F., Ashraf, K., Aleem, M. T., Khalid, A. R. and Almutairi, M. M. 2022. Molecular characterization of *Toxoplasma gondii* in cats and its zoonotic potential for public health significance. Pathogens, 11(4): 437.
- Abdulkadhim Sayah, M. and Mohammed, M. M. 2022. Prevalence of Hepatitis B and Hepatitis C Virus Infections in Beta Thalassemia Major Patients in Misan Governorate-Iraq. NeuroQuantology, 20(5): 3374.
- Aksu, T. Ü. Ş. 2021. Thalassemia. Trends in Pediatrics, 21(7): 1-7.
- Al-Hadraawy, S. K. and Hadi, F. A. 2017. Immunological and Molecular Study of *Toxoplasma gondii* in Al-Najaf Governorate-Iraq. International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research, 9(4): 482-492.
- Al-Hamadany, A. Y. 2020. Detection of Cytomegalovirus (CMV) in poly-transfused thalassemia patients and its correlation with abo blood groups. Annals of Tropical Medicine and Public Health, 20(98): 279-285.
- Alharbi, S. M., Alshaiti, J. H., Ghazwani, J. M., Ghazwani, A. M., Alshahrani, N. M. and Banjar, M. Y. 2021. Epidemiology of hereditary anemias in Saudi Arabia. International Journal of Community Medicine and Public Health, 8(3): 6127-6131.
- Alhuthali, H. M., Ataya, E. F., Alsalmi, A., Elmissbah, T. E., Alsharif, K. F., Alzahrani, H. A. and Hassanein, D. E. 2023. Molecular patterns of alpha-thalassemia in the kingdom of Saudi Arabia: identification of prevalent genotypes and regions with high incidence. Thrombosis Journal, 21(1): 115.
- Ali, S., Mumtaz, S., Shakir, H. A., Khan, M., Tahir, H. M., Mumtaz, S. and Khan, M. A. 2021. Current status of beta-thalassemia and its treatment strategies. Molecular Genetics & Genomic Medicine, 9(12): 1788.

- Al-Mosawy, W. F. 2017. The beta-thalassemia. *Nano Biomedicine and Engineering*, 9(2): 124-128.
- Alsayab, I. M., Hasony, H. J. and AlSalait, S. K. 2023. Cytomegalovirus Infection in Multi-Transfused β -Thalassemia Major Patients in Basrah. *Serology and Molecular Diagnosis. International Research Journal of Biology and Biotechnology*, 1(1): 1-10.
- Al-Shabany, N. H. S., AL-Jaifry, M. N. M. and Yousif, J. G. 2016. Detection of anti-HCV IgG antibodies in thalassemic patients by Enzyme Linked immunosorbant assay in AL-Najaf AL-Ashraf Provence. *Al-Kufa University Journal for Biology*, 8(3): 233-238.
- Al-Sharifi, L. M., Murtadha, J., Shahad, A., Mohammed, Y., Sura, J., Waleed, Z. and Abbas, Q. 2019. Prevalence of hepatitis B and C in thalassemic patients and its relation with type of thalassemia, frequency of blood transfusion, and spleen status. *Medical Journal of Babylon*, 16(2): 108-111.
- Amirhashchi, F., Azaran, A., Seyedian, S. S., Jalilian, S. and Keikhaei, B. 2022. Occult Hepatitis B Virus Infection among β -Thalassemia Major Patients in Ahvaz City, Iran. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 106(1): 174.
- Arvin, A., Campadelli-Fiume, G., Mocarski, E., Moore, P. S., Roizman, B., Whitley, R. and Yamanishi, K. 2007. *Human herpesviruses: biology, therapy, and immunoprophylaxis*. Cambridge University Press, 7(3): 10-26.
- Arya, Y. and Sahi, P. K. 2023. Cell-Based Gene Therapy for β -Thalassemia. *Indian Pediatrics*, 60(4): 313-316.
- Aws, H., Al-Numan, S. and Ghazwan, Y. 2021. Screening of beta-thalassemia major patients below 18 years for acute cytomegalovirus infection by IgM serology in Mosul. *Acta Medica Mediterranea*, 37(12): 1009.
- Bajwa, H. B. H. 2023. Thalassemia. *StatPearls*, 23(9): 1-20.
- Balcha, T. M., Aga, B. I., Disasa, D. D. and Berhanu, G. 2020. Public health and economic significance of toxoplasmosis. *American-Eurasian Journal of Scientific Research*, 15(1): 112-121.
- Bazi, A., Mirimoghaddam, E., Rostami, D. and Dabirzadeh, M. 2016. Characteristics of seropositive hepatitis B and C thalassemia major patients in South-East of Iran. *Biotechnology and Health Sciences*, 3(2): 16-19.

- Bhowmik, S., Biswas, A. K., Baranwal, A. K., Pawar, A. A. and Dimri, U. 2023. The effect of blood transfusion on serum hepcidin levels in chronically transfused patients of β -thalassemia major: An observational study in a tertiary care centre in Western Maharashtra. *Asian Journal of Transfusion Science*, 23(8): 1-6.
- Bhuyan, G. S., Noor, A. U. Z., Sultana, R., Noor, F. A., Sultana, N., Sarker, S. K. and Mannoor, K. 2021. Frequency of hepatitis B, C and HIV infections among transfusion-dependent beta thalassemia patients in Dhaka. *Infectious Disease Reports*, 13(1): 89-95.
- Busch, M. P., Bloch, E. M. and Kleinman, S. 2019. Prevention of transfusion-transmitted infections. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 133(17): 1854-1864.
- Chuncharunee, S., Teawtrakul, N., Siritanaratkul, N. and Chueamuangphan, N. 2019. Review of disease-related complications and management in adult patients with thalassemia: A multi-center study in Thailand. *PLoS One*, 14(3): 214148.
- Dabirzadeh, M., Yusefnia, H., Azizi, H., Raeghi, S. and Mirahmadi, H. 2022. Comparison of nested PCR and ELISA techniques in diagnosis of toxoplasmosis infection in thalassemia patients by targeting the RE gene. *Annals of Parasitology*, 68(3): 222.
- Dahl, V., Majeed, A., Wikman, A., Norda, R. and Edgren, G. 2020. Transmission of viral hepatitis through blood transfusion in Sweden, 1968 to 2012. *Eurosurveillance*, 25(29): 1900537.
- Di Benedetto, S., Müller, L., Rauskolb, S., Sendtner, M., Deutschbein, T., Pawelec, G. and Müller, V. 2019. Network topology dynamics of circulating biomarkers and cognitive performance in older Cytomegalovirus-seropositive or-seronegative men and women. *Immunity and Ageing*, 16(3): 1-19.
- Ehsan, H., Wahab, A., Shafqat, M. A., Faisal, M. S., Muneeb, A., Ali, S. and Anwer, F. 2020. Prevalence of Transfusion Transmissible Infections in Beta-Thalassemia Major Patients of Pakistan: A Systematic Review. *Blood*, 136(42): 23-25.
- Eivazi-Ziaei, J., Movassaghpour, A., Asgharzadeh, M. and Dastgiri, S. 2013. Seroprevalence of cytomegalovirus in blood donors in the northwest of Iran. *Journal of Research in Clinical Medicine*, 1(2): 96-100.
- Faraj, S. A. and Al-Abedy, N. M. 2021. Serum hepcidin hormone level and its genes polymorphism. In *Genetic Variation*. IntechOpen, 14(1): 246-255.

- Faranoush, M., Faranoush, P., Heydari, I., Foroughi-Gilvae, M. R., Azarkeivan, A., Parsai Kia, A. and Rohani, F. 2023. Complications in patients with transfusion dependent thalassemia: A descriptive cross-sectional study. *Health Science Reports*, 6(10): 1624.
- Galanello, R. and Cao, A. 2011. Alpha-thalassemia. *Genetics in Medicine*, 13(2): 83-88.
- Hanifehpour, H., Shariat, S. K. S., Ghafari, M. S., Kheirandish, F., Saber, V. and Fallahi, S. 2019. Serological and molecular diagnosis of *Toxoplasma gondii* infections in thalassemia patients. *Iranian Journal of Parasitology*, 14(1): 20.
- Huang, H., Xu, L., Chen, M., Lin, N., Xue, H., Chen, L. and Lin, Y. 2019. Molecular characterization of thalassemia and hemoglobinopathy in Southeastern China. *Scientific Reports*, 9(1): 3493.
- Ikeda, M., Sekimoto, M., Takiguchi, S., Kubota, M., Ikenaga, M., Yamamoto, H. and Monden, M. 2005. High incidence of thrombosis of the portal venous system after laparoscopic splenectomy: a prospective study with contrast-enhanced CT scan. *Annals of Surgery*, 241(2): 208-216.
- Jallab, H. R. and Easa, Z. M. 2020. Prevalence of Hepatitis B and Hepatitis C Viruses in β -thalassemia Major Patient in AD-Diwanya Province, Iraq. *Indian Journal of Forensic Medicine and Toxicology*, 14(1): 1245-1249.
- Jawetz, E., Melnick, J. L. and Adelberg, E. A. 1977. Grundsätze der diagnostischen medizinischen Mikrobiologie. *Medizinische Mikrobiologie*, 3(4): 371-396.
- Ji, M. J., Cho, H. C., Park, Y. J., Jang, D. H., Park, J. and Choi, K. S. 2023. Molecular Detection of *Toxoplasma gondii* in Blood Samples of Domestic Livestock in the Republic of Korea. *Pathogens*, 12(4): 547.
- Kandi, V., Vinjamuri, S. R. and Tanikella, B. P. 2021. Hepatitis C viral infection among beta-thalassemia patients: a study from the centre for excellence in thalassemia and other blood disorders. *Cureus*, 13(7): 1-6.
- Kanwar, M. K., Tedford, R. J., Thenappan, T., De Marco, T., Park, M. and McLaughlin, V. 2021. Elevated pulmonary pressure noted on echocardiogram: a simplified approach to next steps. *Journal of the American Heart Association*, 10(7): 17684.
- Kayser, F. H., Bienz, K. A., Eckert, J. and Zinkernagel, R. M. 2005. Medical microbiology. Thieme, 5(67): 98-105.

- Khalil, S., Khan, H. S. and Akhtar, P. 2016. Status of hepatitis B and C in beta thalassemia major patients. *Journal of Islamabad Medical and Dental College*, 5(2): 71-73.
- Khan, M. R., Anwar, S., Faizan, M. E. H. W. I. S. H. and Nosheen, S. 2017. The burden of transfusion related infections on thalassemia major children. *Pakistan Journal of Medical & Health Sciences*, 11(3): 882-886.
- Khedri, A., Asadi, F., Rasouli Ghahfarokhi, S. M., Obeidi, N., Talebi, F. and Moghbelinejad, S. 2020. Spectrum of mutations of thalassemia among couples from Izeh city, Khuzestan province, Iran. *Iranian Journal of Blood and Cancer*, 12(2): 58-63.
- Khounvisith, V., Saysouligno, S., Souvanlasy, B., Billamay, S., Mongkhoun, S., Vongphachanh, B. and Hübschen, J. M. 2023. Hepatitis B virus and other transfusion-transmissible infections in child blood recipients in Lao People's Democratic Republic: a hospital-based study. *Archives of Disease in Childhood*, 108(1): 15-19.
- Lee, J. S., Im Cho, S., Park, S. S. and Seong, M. W. 2021. Molecular basis and diagnosis of thalassemia. *Blood Research*, 56(1): 39-43.
- Leung, W. C., Leung, K. Y., Lau, E. T., Tang, M. H. Y. and Chan, V. 2008. Alpha-thalassaemia. In *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*. WB Saunders, 13(4): 215-222.
- Levinson, W. E. 2018. *Review of medical microbiology and immunology*. McGraw-Hill Education, 659 page, New York.
- Longo, F., Piolatto, A., Ferrero, G. B. and Piga, A. 2021. Ineffective erythropoiesis in β -thalassaemia: key steps and therapeutic options by drugs. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13): 7229.
- Madhi, M. N., Raheema, R. H. and Faraj, S. A. 2021. Serological and molecular study for hepatitis C virus in Thalassemia patients in Wasit Province/Iraq. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*, 21(8): 11513-11521.
- Mahmoud, R. A., El-Mazary, A. A. M. and Khodeary, A. 2016. Seroprevalence of hepatitis C, hepatitis B, cytomegalovirus, and human immunodeficiency viruses in multitransfused thalassemic children in upper Egypt. *Advances in Hematology*, 2016(1): 9032627.

- Martorelli Di Genova, B., Wilson, S. K., Dubey, J. P. and Knoll, L. J. 2019. Intestinal delta-6-desaturase activity determines host range for *Toxoplasma* sexual reproduction. *PLoS Biology*, 17(8): 3000364.
- Mirzaei, G., Shamsasenjan, K., Jafari, B., Bagherizadeh, Y., Sadafzadeh, A., Bannazadeh-Baghi, H. and Jafari-Sales, A. 2021. Prevalence of HBV and HCV infection in beta-thalassemia major patients of Tabriz city, Iran. *New Microbes and New Infections*, 43(76): 100912.
- Mobin-Ur-Rehman, B. U. and Jan, F. 2011. Correlation of hepatitis C with multiple blood transfusions in children of thalassemia major. *Pakistan Journal of Medical and Health Sciences*, 5(5): 323-326.
- Moghimbeygi, M. and Alavian, S. M. 2020. Eradication of hepatitis C virus infection in thalassemia patients in Iran using various treatment strategies. *Journal of Virus Eradication*, 6(3): 100006.
- Mohamed, A. O., Hany, A. M., Fayed, H. M. and Ahmed, S. A. 2023. Frequency and risk factors for Hepatitis C virus seropositivity in blood transfusion-dependent thalassemic patients in Qena hospitals. *SVU-International Journal of Medical Sciences*, 6(2): 489-500.
- Mohamed, S. M., Morsy, A. A. E. A., Mohamed, N. M. B. E. D. and Mohamed, A. R. 2019. Estimation of serum hepcidin and ferritin in patients with chronic liver disease. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine*, 74(8): 1817-1825.
- Mohammad, N. J., Al-Hmudi, H. A., Salait, A. and Sadeq, K. 2022. Cytomegalovirus (CMV) IgG avidity and their relationship with immunoglobulins (IgG and IgM) levels for primary cytomegalovirus diagnosis. *International Journal of Health Sciences*, 2(1): 9154-9168.
- Montoya, J. G. 2002. Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis. *The Journal of Infectious Diseases*, 185(1): 73-82.
- Motiani, A., Zubair, M. and Sonagra, A. 2024. Laboratory evaluation of alpha thalassemia. *StatPearls*, 24(2): 90-99.
- Mousa, N. M. and Nahab, H. M. 2020. Serological detection and hematological changes associated with Toxoplasmosis in thalassemia patients in Al-Samawah province. *International Journal of Pharmaceutical Research*, 12(4): 872-876.

- Mukherjee, K., Bhattacharjee, D. and Chakraborti, G. 2017. Prevalence of hepatitis B and hepatitis C virus infection in repeatedly transfused thalassemics in a tertiary care hospital in eastern India. *International Journal of Research in Medical Sciences*, 5(10): 4558-4562.
- Munkongdee, T., Chen, P., Winichagoon, P., Fucharoen, S. and Paiboonsukwong, K. 2020. Update in laboratory diagnosis of thalassemia. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7(3): 74.
- Naz, R., Ullah, F., Muhammad, T., Khan, O., Shah, F., u Rehman, A. and Basir, N. U. 2023. Incidence of hepatitis B due to multiple transfusions in patients of β -thalassemia major: Incidence of hepatitis B in patients of β -thalassemia major. *Pakistan Journal of Health Sciences*, 23(2): 86-90.
- Noviar, G. 2017. Prevalence of IgG antibodies and cytomegalovirus DNA on blood donor at Blood Transfusion Unit of DKI Jakarta Province. *Journal of Health Epidemiology and Communicable Diseases*, 3(1): 28-35.
- Patterson, S., Singleton, A., Branscomb, J., Nsonwu, V. and Spratling, R. 2022. Transfusion complications in thalassemia: patient knowledge and perspectives. *Frontiers in Medicine*, 9(2): 772886.
- Pawlotsky, J. M. 2004. Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. *Trends in Microbiology*, 12(2): 96-102.
- Pecorari, L., Savelli, A., Cuna, C. D., Fracchia, S. and Borgna-Pignatti, C. 2008. The role of splenectomy in thalassemia major. An update. *Acta Pediatrica Mediterranea*, 24(7): 57-60.
- Qassim Welli, J., Najii Agha, M. and Saleem Mohammed, M. 2021. Transfusion-related infections in Thalassemia major patients: Kirkuk Thalassemia center experience. *Kirkuk Journal of Medical Sciences*, 3(1): 22-28.
- Ragab, L. A., Hamdy, M. M., Shaheen, I. A. and Yassin, R. N. 2013. Blood transfusion among thalassemia patients: A single Egyptian center experience. *Asian Journal of Transfusion Science*, 7(1): 33-36.
- Reddy, P. S., Locke, M. and Badawy, S. M. 2022. A systematic review of adherence to iron chelation therapy among children and adolescents with thalassemia. *Annals of Medicine*, 54(1): 326-342.

- Ross, S., Novak, Z., Pati, S. and B Boppana, S. 2011. Overview of the diagnosis of cytomegalovirus infection. *Infectious Disorders-Drug Targets*, 11(5): 466-474.
- Rujeerapaiboon, N., Tantiworawit, A., Piriyaakhuntorn, P., Rattanathammethee, T., Hantrakool, S., Chai-Adisaksopha, C. and Charoenkwan, P. 2021. Correlation between serum ferritin and viral hepatitis in thalassemia patients. *Hemoglobin*, 45(3): 175-179.
- Salama, K. M., Ibrahim, O. M., Kaddah, A. M., Boseila, S., Ismail, L. A. and Hamid, M. M. A. 2015. Liver enzymes in children with beta-thalassemia major: correlation with iron overload and viral hepatitis. *Open access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 3(2): 287.
- Saleh, A. Y. and Al-Numan, A. Y. S. 2019. Investigation of the incidence of Toxoplasmosis and cytomegalovirus in patients with thalassemia. *Tikrit Journal of Pure Science*, 23(10): 14-18.
- Sinha, M. K., Raghuwanshi, B. and Mishra, B. 2019. Menace of Hepatitis C virus among multitransfused thalassemia patients in Balasore district of Odisha state in India. *Journal of Family Medicine and Primary Care*, 8(9): 2850-2854.
- Sözen, T., Özışık, L. and Başaran, N. Ç. 2017. An overview and management of osteoporosis. *European Journal of Rheumatology*, 4(1): 46.
- Uppal, M. S., Uppal, R., Khan, A. A., Piracha, Z. Z. and Saeed, U. 2022. Seroprevalence of Hepatitis B virus in multitransfused beta-thalassemic patients in Pakistan. *Japanese Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2(14): 1118.
- Wahidiyat, P. A., Liauw, F., Adnani, N. B. and Putriasih, S. A. 2017. Prevalence of hepatitis and its correlation with serum ferritin and aminotransferase levels among thalassemia major patients in Indonesia. *Paediatrica Indonesiana*, 57(4): 176-80.
- Wohlfert, E. A., Blader, I. J. and Wilson, E. H. 2017. Brains and brawn: toxoplasma infections of the central nervous system and skeletal muscle. *Trends in Parasitology*, 33(7): 519-531.
- Yasir, S. J., Abbas, H. H. and Hussain, N. A. 2013. Incidence of Human Cytomegalovirus in Thalassemia Patients in Najaf Governorate. *Journal of Babylon University/Pure and Applied Sciences*, 13(7): 643-650.

- Yousaf, A., Ghafoor, A., Fatima, N. and Danish, M. 2021. Gender-specific frequency distribution of hepatitis C virus genotypes in punjab Province, Pakistan: a clinically significant descriptive cross-sectional study. *Cureus*, 13(8): 5-9.
- Yousefi, E., Foroutan, M., Salehi, R. and Khademvatan, S. 2017. Detection of acute and chronic toxoplasmosis amongst multi-transfused thalassemia patients in southwest of Iran. *Journal of Acute Disease*, 6(3): 120-125.
- Yousefi, M., Dehesh, M. M., Ebadi, M. and Dehghan, A. 2017. The prevalence of hepatitis C virus infection in patients with thalassemia in Zabol city of Iran. *International Journal of Infection*, 4(1): 13.



