

T.C.  
MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**HEMODİYALİZ HASTALARINDA  
SEN VİRUS GENOTİP D VE SEN VİRUS GENOTİP H  
PREVALANSI**

Seda TEZCAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Nuran DELİALIOĞLU

MERSİN – 2006

T.C.  
MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**HEMODİYALİZ HASTALARINDA  
SEN VİRUS GENOTİP D VE SEN VİRUS GENOTİP H  
PREVALANSI**

Seda TEZCAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Nuran DELİALİOĞLU

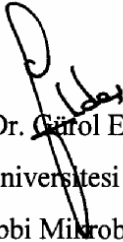
Tez No: .....


MERSİN – 2006

Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan '*Hemodiyaliz Hastalarında SEN Virus Genotip D ve SEN Virus Genotip H Prevalansı*' adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.


Tez Savunma Tarihi 14/07/2006

  
Prof. Dr. Cürol EMEKDAŞ  
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tıbbi Mikrobiyoloji  
Jüri Başkanı

  
Doç. Dr. Nuran DELİALİOĞLU  
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tıbbi Mikrobiyoloji  
Jüri Üyesi/Danışman

  
Doç. Dr. Mehmet Sami SERİN  
Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi  
Farmasötik Mikrobiyoloji  
Jüri Üyesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun .....tarih ve .....sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

  
Enstitü Müdürü  
Prof. Dr. Murat DİKMENGİL

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimime başladığım andan itibaren her konuda yardımlarını ve desteğini gördüğüm Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı hocam Sayın Prof. Dr. Gürol EMEKDAŞ'a, danışman hocam Sayın Doç. Dr. Nuran DELİALİOĞLU başta olmak üzere değerli hocalarım Sayın Doç. Dr. Gönül ASLAN, Sayın Doç. Dr. Candan ÖZTÜRK, Sayın Yrd. Doç. Dr. Feza OTAĞ'a teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince engin bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, destek ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Bilim Dalı öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Mehmet Sami SERİN'e teşekkür ederim.

Çalışmamızın kontrol grubunun serumlarının toplanmasında yardımcı olan Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kan Merkezi Müdürü Sayın Yrd. Doç. Dr. Naci TİFTİK'e teşekkür ederim.

Tezimin istatistikleri ve bulgularının değerlendirilmesi konusundaki yardımlarından dolayı Biyoistatistik Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Bahar TAŞDELEN'e teşekkür ederim.

Tezimin hasta grubunun serumlarının toplanmasında yardımcı olan özel hemodiyaliz merkezinde çalışan personele ve kontrol grubunun toplanmasında üniversitemizin Kan Merkezindeki çalışan personele ve çalışmam sırasında her türlü destekleri ile katkıda bulunan Anabilim Dalı'mızdaki tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi bu tez çalışmam sırasında da beni manevi açıdan sürekli olarak destekleyen aileme sonsuz teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

<b>KABUL VE ONAY</b> .....	iii
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	iv
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	v
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	vii
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	viii
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	ix
<b>ÖZET</b> .....	xi
<b>ABSTRACT</b> .....	xii
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	3
2.1. SEN Virus (SEN-V).....	3
2.1.1. Tek Zincirli DNA (ssDNA) Virusları ve Genel Özellikleri.....	3
2.1.2. <i>Circoviridae</i> ailesinin genel özellikleri ve sınıflandırılması.....	4
2.1.2.1. Morfolojisi.....	4
2.1.3. Patogenez .....	10
2.1.4. Hepatitlerle İlişkili Diğer Virusların SEN-V'le İlişkileri.....	11
2.1.4.1. Hepatit G Virus (HGV veya GBV-C).....	12
2.1.4.2. TT Virus (TTV).....	13
2.1.4.3. SANBAN virus.....	14
2.1.4.4. TTV Benzeri Mini Virus (TTV-like mini virus, TLMV).....	15
2.1.5. SEN-V'un Laboratuvar Tanısı.....	16
2.1.6. Epidemiyoloji.....	18
2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Tekniği.....	21
2.2.1. Polimeraz Zincir reaksiyonunun bileşenleri.....	25
2.2.1.1. Enzim.....	25
2.2.1.2. Deoksiribonükleotid Trifosfatlar (dNTPs).....	26

2.2.1.3. PZR Tampon içeriği (Reaksiyon Buffer).....	26
2.2.1.4. Oligonükleotid Primerler.....	27
2.2.1.5. Hedef diziler.....	28
2.2.1.6. Sıcaklık ve Döngü Parametreleri.....	28
2.2.2. “Hot Start” (Sıcak Başlangıç) PZR Tekniği.....	29
2.3. Amplifikasyon Ürünlerinin Analizi.....	30
2.3.1. Agaroz jel elektroforezi.....	30
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>	<b>31</b>
3.1. Hasta grubu serum örneklerinin toplanması.....	31
3.2. Kontrol grubu serum örneklerinin toplanması.....	31
3.3. Kullanılan Araç ve Gereçler.....	31
3.3.1. Kullanılan Cihazlar.....	31
3.3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	32
3.3.3. Kullanılan Tampon Çözeltiler.....	33
3.3.3.1 DNA Saflaştırılması (ekstraksiyonu) İçin Kullanılan Solüsyonlar.....	33
3.3.3.2 Elektroforez için Kullanılan Solüsyonlar.....	34
3.4. DNA ekstraksiyonu.....	35
3.4.1. DNA ekstraksiyonun yapılışı.....	36
3.5. Moleküler Analiz.....	37
3.5.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Uygulaması.....	37
3.5.2. Agaroz Jel Elektroforez İşlemi.....	40
3.5.2.1. Agaroz jelin hazırlanması.....	40
3.5.3. SEN-V genotip D ve SEN-V genotip H'nin varlığının tespiti.....	42
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>43</b>
4.1. İstatistik analiz.....	44
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>45</b>
<b>6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....</b>	<b>55</b>
<b>7. KAYNAKLAR.....</b>	<b>57</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>62</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 2.1</b> Circovirus ikozahedral şekli kapsid yapısı (17 - 22 nm).....	<b>4</b>
<b>Şekil 2.2</b> Elektron Mikroskopisi ile a) <i>Circovidae</i> ailesinden Chicken anemia virus (CAV), b) Procine circovirus'ün görünüşü.....	<b>5</b>
<b>Şekil 2.3</b> SEN-V'ün A'dan H'ye kadar isimlendirilen 8 farklı genotipinin varlığını gösteren ORF1'dizi varyasyonlarına dayandırılarak oluşturulmuş filogenetik dendrogram.....	<b>9</b>
<b>Şekil 2.4</b> PZR aşamaları.....	<b>22</b>
<b>Şekil 2.5</b> Zincir uzaması.....	<b>23</b>
<b>Şekil 2.6</b> PZR döngüleri.....	<b>24</b>
<b>Şekil 3.1</b> PZR yöntemi ile belirlenen SENV-D ve SENV-H genotiplerinin, %2'lik agaroz jel elektroforezi ile gösterilmeleri.....	<b>42</b>
<b>Şekil 4.1</b> PZR yöntemiyle belirlenen SENV-D ve SENV-H DNA'sının, %2'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	<b>44</b>

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 2.1</b> TTV ve “TTV-benzeri” virusların fiziksel ve biyokimyasal özellikleri.....	7
<b>Çizelge 2.2</b> <i>Circoviridae</i> ailesinin taksonomisinde SEN-V’un yeri.....	8
<b>Çizelge 3.1</b> SEN-V genotiplerinin PZR ile belirlenmesinde kullanılan primerler.....	38
<b>Çizelge 3.2</b> SEN-V genotiplerinin belirlenmesinde kullanılan primerlerin erişim numaraları.....	38
<b>Çizelge 3.3</b> SENV-D ve SENV-H’nin PZR reaksiyon karışımları.....	39
<b>Çizelge 3.4</b> Uygulanan amplifikasyon sıcaklık ve süreleri.....	40
<b>Çizelge 4.1</b> Hasta ve kontrol grubunda SEN-V enfeksiyonunun prevalansı.....	43



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>aa</b>	Aminoasit
<b>ALT</b>	Alanin Amino Transferaz
<b>Arg</b>	Arjinin
<b>bç</b>	Baz Çifti
<b>CAV</b>	Chicken Anemia Virus (Tavuk Anemi Virusu)
<b>cDNA</b>	Komplementer Deoksiribonükleik Asit
<b>CMV</b>	Sitomegalo Virus
<b>dATP</b>	Deoksiadenozin Trifosfat
<b>dCTP</b>	Deoksisitozin Trifosfat
<b>DEIA</b>	DNA- Enzyme Immuno Assay
<b>dGTP</b>	Deoksiguanozin Trifosfat
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik Asit
<b>dNTP</b>	Deoksiribonükleotid Trifosfat
<b>dsDNA</b>	Çift Zincirli DNA
<b>dTTP</b>	Deoksitimidin Trifosfat
<b>EBV</b>	Ebstein Barr Virus
<b>EDTA</b>	Etilendiamintetraasetik asit
<b>Et-Br</b>	Etidyum Bromid
<b>FISH</b>	Floresans in Situ Hibridizasyon
<b>HBV</b>	Hepatit B Virus
<b>HCV</b>	Hepatit C Virus
<b>HGV</b>	Hepatit G Virus
<b>HIV</b>	Human immunodeficiency virus (İnsan immun yetmezlik virusu)
<b>HSK</b>	Hepatosellüler Karsinoma
<b>HSV</b>	Herpes Simpleks Virus

<b>HVR</b>	Hyper Variable Region (Yüksek değişkenlik gösteren bölge)
<b>Kb</b>	Kilobaz
<b>KCl</b>	Potasyum Klorür
<b>Lys</b>	Lizin
<b>Mg<sup>+2</sup></b>	Magnezyum İyonu
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Magnezyum Klorür
<b>mRNA</b>	Messenger RNA (Mesaj taşıyan RNA)
<b>Nt</b>	Nükleotid
<b>ORF</b>	Open Reading Frame (Açık okuma çerçevesi)
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
<b>PMV</b>	Panicum Mosaic Virus
<b>PZR</b>	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>RNA</b>	Ribonükleik Asit
<b>SDS</b>	Sodyum Dodesil Sülfat
<b>SEN-V</b>	SEN Virus
<b>SENV-A</b>	SEN Virus genotip A
<b>SENV-B</b>	SEN Virus genotip B
<b>SENV-C</b>	SEN Virus genotip C
<b>SENV-D</b>	SEN Virus genotip D
<b>SENV-E</b>	SEN Virus genotip E
<b>SENV-H</b>	SEN Virus genotip H
<b>SENV-I</b>	SEN Virus genotip I
<b>SNTV</b>	Sentinel Virus
<b>ssDNA</b>	Tek Zincirli DNA
<b>TBE</b>	Tris-Borik Asit-EDTA
<b>TLMV</b>	TT Virus Benzeri Mini Virus
<b>Tris-HCl</b>	Tris-Hidroklorid
<b>TTV</b>	Torque Teno virus
<b>UTR</b>	Untranslated Region (Tercüme edilmeyen bölge)
<b>UV</b>	Ultraviyole (Mor ötesi)

## ÖZET

### Hemodiyaliz Hastalarında SEN Virus Genotip D ve SEN Virus Genotip H Prevalansı

Yakın zamanlarda keşfedilen bir DNA virusu olan SEN virus (SEN-V) insanlarda post transfüzyon hepatitinden sorumlu tutulmaktadır. SEN-V genomunun filogenetik analizi, bu virusun 8 farklı genotipinin (A-H) varlığını ortaya koymaktadır. Bu genotiplerden iki tanesi; SEN virus genotip D (SENV-D) ve SEN virus genotip H (SENV-H)'nin post transfüzyon hepatitleri ile yakın ilişkili olduğu belirtilmektedir.

Şimdiye kadar yapılan çalışmalar ile hemodiyaliz yapılan hastaların, SEN-V'un bulaşmasında artan bir riske sahip olup olmadıkları netlik kazanmamıştır. Bu çalışmadaki amacımız, hemodiyaliz ile tedavi edilen hastalarda SENV-D ve SENV-H'nin prevalansını araştırmaktır.

Hemodiyaliz hastalarından elde edilen 100 serum örneği, SENV-D ve SENV-H yönünden polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile incelendi. Sağlıklı kan donörlerinden elde edilen 120 serum örneği kontrol grubu olarak kullanıldı.

Hemodiyaliz ile tedavi edilen hastalarda SENV-D prevalansı %33, SENV-H prevalansı %22 olarak saptandı. Kan donörlerinde ise SENV-D prevalansı %5, SENV-H prevalansı %20 olarak saptandı. Bizim verilerimiz SEN-V enfeksiyonunun hemodiyaliz ile tedavi edilen hastalarda (%55), kontrol grubundan (%25) daha yaygın ( $P<0.05$ ) olduğunu göstermektedir.

**Anahtar sözcükler:** SEN-V; SENV-D; SENV-H; Prevalans; Hemodiyaliz; Kan Donörü; Polimeraz Zincir Reaksiyonu

## **ABSTRACT**

### **Prevalence of SEN Virus Genotype D and SEN Virus Genotype H among Patients on Maintenance Haemodialysis**

A recently discovered DNA virus (SEN Virus) has been assumed to be responsible for post transfusion hepatitis in humans. Phylogenetic analysis of SEN virus has revealed the existence of 8 different genotypes (A-H). Both of SEN virus genotype H (SENV-H) and SEN virus genotype D (SENV-D) have been described as most closely associated with post transfusion hepatitis.

Up to now, it is unclear whether patients on maintenance haemodialysis are on increased risk for acquiring SEN virus. The goal of present study is to investigate the prevalence of SEN virus genotype D and SEN virus genotype H among patients on maintenance haemodialysis.

Serum samples derived from 100 haemodialysed patients were examined for SENV-D and SENV-H viremia by polymerase chain reaction. 120 serum samples from healthy blood donors served as a control group.

The prevalence of SENV-D was determined to be 33% (n=33), SENV-H was determined to be 22% (n=22) among patients on maintenance haemodialysis. The prevalence of SENV-D was determined to be 5% (n=6), SENV-H was determined to be 20% (n=24) among healthy blood donors. Our data suggest that SEN-V infection was significantly more prevalent ( $P<0.05$ ) in patients on haemodialysis (55%) than in control groups (25%).

**Key words: SEN-V; SENV-D; SENV-H; Prevalence; Haemodialysis; Blood Donor; Polymerase Chain Reaction**

## GİRİŞ

Günümüzde viral hepatit vakalarının %80'inden fazlasından bilinen 5 hepatit virusu (hepatit A-E) sorumlu tutulmaktadır. Bununla beraber, akut hepatitli bireylerin yaklaşık %20'si tüm bilinen hepatit viruslarına karşı negatif test edilirken, transfüzyonla ilişkili hepatitli hastaların %10'undan fazlasında diğer viral hepatit etkenlerinin varlığı ileri sürülmektedir (1).

1999 yılında İtalya'da araştırmacılar HIV (Human immunodeficiency virus, insan immun yetmezlik virusu) ile infekte intravenöz (I.V.) ilaç bağımlısı bir hastanın serumundan farklı bir DNA klonu keşfetmişlerdir. Daha sonra bu klonun yeni bir virus olduğu tespit edilmiş ve virusa, bu hastanın isminin ilk harfleri olan 'SEN' ismi verilerek adlandırılmış ve virusun insanlarda posttransfüzyon hepatitlerinden sorumlu olabileceği ileri sürülmüştür (2, 3). Yapılan filogenetik analizlerle, 8 farklı suşunun varlığı gösterilen SEN virusun (SEN-V), SEN virus D (SENV-D) ve SEN virus H (SENV-H) genotipleri, post-transfüzyon hepatitlerine neden olan muhtemel virus adayları olarak tanımlanmışlardır (4).

SEN-V, zarfsız ve yaklaşık olarak 3900 nükleotitten (nt) oluşan tek zincirli bir DNA virusudur. Genom, sirküler ve en az 3 ORF'ye (ORF=Open Reading Frame, açık okuma çerçevesi) sahiptir (5). SEN-V'un filogenetik analizi sonucu virusun A'dan-H'ye kadar isimlendirilen 8 genotipinin mevcut olduğu tespit edilmiştir (6). SEN-V ve Torque Teno virus (TTV) arasında yakın benzerlik bulunmaktadır ve SEN-V ve TTV filogenetik olarak benzemektedir. Bu da virusların ortak bir ataya sahip olduğunu göstermektedir (5). TTV gibi SEN-V'de *Circoviridae* ailesine dahil edilmiştir (7).

Sağlıklı kan donörlerinde ve genel popülasyonda aktif infeksiyon sıklığı. Yüksek prevalans sadece bazı SEN-V izolatları için söz konusudur. SENV-A, SENV-B ve SENV-E infeksiyonlarına sağlıklı kan donörleri arasında daha az sıklıkla rastlanmakta olup, non-A-E hepatitleriyle ilişkili gibi görünmemektedir. Genotip D ve H için uyumlu donör/akut hepatit oranlarının varlığına ve virusun karaciğerde replike olduğunu destekleyen bulgular olmasına rağmen şu ana kadar SEN-V ile karaciğer patolojisi arasında net bir ilişki olduğu gösterilememiştir (8). İnfeksiyonun doğal seyri ile ilgili çok az bilgi mevcuttur. On yıldan fazla süreli kronik infeksiyonlar retrospektif olarak

araştırılmış olmakla beraber bir çok hasta, viremiyi virusa maruz kaldıktan itibaren bir ay içerisinde temizlemektedir. Ayrıca, SEN-V antikorlarını tespit edebilecek bir serolojik test henüz mevcut olmadığından dolayı, virusla ilk temasın doğru olarak tespiti oldukça zordur (6).

SENV-D ve SENV-H genotiplerinin transfüzyon ile ilişkili non-A-E hepatitlerinde, kronik karaciğer hastalıklarında ve hepatosellüler karsinomada, sağlıklı yetişkinlere oranla daha sık rastlandığı bildirilmiştir (6, 7, 9, 10). Donör ve alıcılar arasındaki dizi homolojilerinin kıyaslanması SEN-V'nun kan ile bulaştığını ortaya çıkarmıştır (11). Kan transfüzyonu yapılan hastalar transfüzyon yapılmayanlara göre daha yüksek bir bulaşma riski altındadır. Bu hastalarda transfüzyon yapılan kan ünitesi sayısı ile artış gösteren oranda bir enfeksiyon riski vardır (9).

Hemodiyaliz hastalarının HCV enfeksiyonu gibi kan kaynaklı hastalıklara yakalanma riski altında oldukları bilinmektedir. Zira terapötik prosedürler sıklıkla kan transfüzyonu ve kan alma ile ilişkilidir. Bu virusların nozokomiyal yayılmasının önlenmesi için ayrı diyaliz makineleri ve teçhizatın kullanılması önemlidir (12). Ancak şimdiye kadar yapılan çalışmalarda hemodiyalizin, hastaların SEN-V ile enfekte olma riskini artırıp arttırmadığı hususunu açıklayamamışlardır.

Bu çalışmada; hemodiyaliz hastaları kandan kaynaklanan hastalıklara yakalanmada yüksek bir risk oranına sahip oldukları için hemodiyaliz ile tedavi edilen hastalarda, serum SEN-V DNA varlığını ve iki SEN-V (SENV-D ve SENV-H) genotipinin prevalansını araştırarak bu virusun transfüzyonla geçişinin önemini değerlendirmeyi amaçladık.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. SEN VİRUS (SEN-V)

SEN-V'u 1999 yılında hepatotropik özellikli tek zincirli DNA (ssDNA) viruslarının yeni bir üyesi olarak keşfedilmiştir (13). 2000 yılında da bu virus, post-transfüzyon hepatiti olgularından izole edilmiş tek iplikli bir DNA virusu olarak tanımlanmıştır (8, 10, 12, 14). İlk çalışmalar SEN-V'ün 26 nm büyüklüğünde olduğunu ve viral genomun yaklaşık 3.8 kb uzunluğunda tek iplikli sirküler DNA yapısında olduğunu ortaya çıkarmıştır (4, 10, 15, 16, 17, 18, 19, 20). Bu virus daha sonraları *Annelovirus* genusunun *Circoviridae* ailesine dahil edilmiştir.

#### 2.1.1. Tek Zincirli DNA (ssDNA) Virusları ve Genel Özellikleri

*Circoviridae* ailesi ssDNA viruslarından olup tek zincirli DNA (ssDNA ) virusları şu şekilde sınıflandırılmıştır (21):

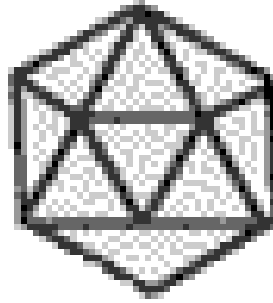
- Saptanamayan bakteriyofajlar
  - *Inoviridae*
  - *Microviridae*
- Saptanamayan viruslar
  - *Geminiviridae*
  - *Circoviridae*
  - *Nanoviridae*
  - *Parvoviridae* (*Parvovirus B19*)

## 2.1.2. *Circoviridae* ailesinin genel özellikleri ve sınıflandırılması

Bu aile üyeleri vertabralı virusları olarak tanımlanmıştır (22).

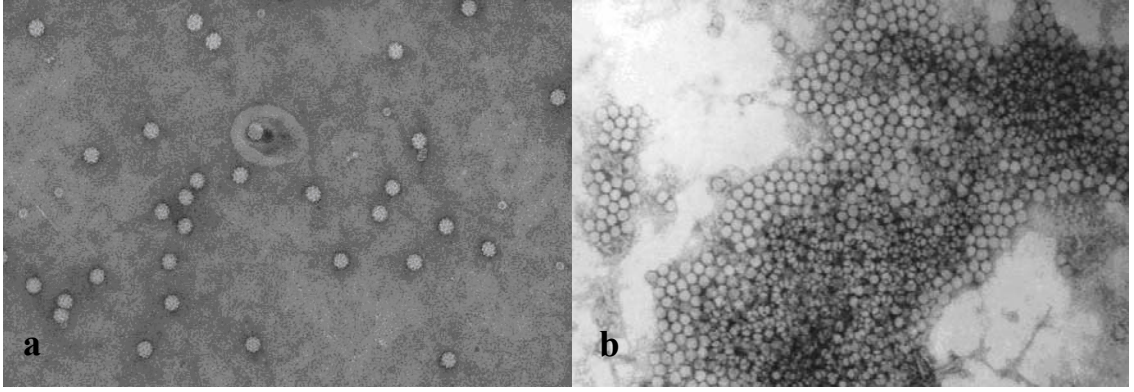
### 2.1.2.1. Morfolojisi

Virionlar zarfsız olup basit bir yapıya sahip kapsid içerirler. Nükleokapsid yuvarlaktır ve ikozahedral simetriye sahiptir. Kapsid izometrik olup yarıçapı 17–24 nm'dir, ancak kullanılan boya tipine göre partikül yarıçap büyüklüğü değişmektedir. Kapsidler yuvarlak görünür ve kapsid yüzey yapısı, konvansiyonel elektron mikroskopla bakıldığında, ayırıcı özellikte düzgün morfolojisi ile ortaya çıkar (Şekil-2.1 ve 2.2). Kapsid, 32 kapsomer (içi boş morfolojik alt üniteler) içerir (22, 23).



Şekil-2.1. Circovirus ikozahedral şekilli kapsid yapısı (17-22 nm) (23).





**Şekil-2.2.** Elektron Mikroskopisi ile a) *Circoviridae* ailesinden Chicken anemia virus (CAV), b) Procine circovirus'ün görünüşü (22).

*Circoviridae* ailesi; segmentsiz, küçük DNA içeren çembersel genoma sahip, tek bir yapısal proteinden oluşan (VP1), izometrik kapsidi olan, kendi aralarında oldukça sınırlı genomik dizi homolojisi gösteren ve ortak antijenik determinantları bulunmayan zarfsız virüslardan oluşmaktadır (14).

Genom; monomerik, segmentsiz, kovalent olarak kapanan daire şeklinde, tek molekül olarak ya negatif polariteli veya ambisense yapıda (kısmen negatif, kısmen pozitif polariteli) tek zincirli DNA molekülünden birini içerir. Genomun tamamı, 1.700–2.000 nükleotid uzunluğundadır. Viral genom yapısal veya yapısal olmayan proteinleri kodlar. Ancak, henüz lipidleri kodladıkları bildirilmemiştir (22).

Virionlar hayat siklusları boyunca ekstrasellüler bir transkripsiyon fazına sahiptirler (22). Replikasyon, parvovirüslerde olduğu gibi hücre bölünmesi sırasında nükleusta gerçekleşir. Hücre nükleusunda ssDNA (negatif polariteli veya ambisense), konak tamir enzimleri tarafından dsDNA formunda kalıp olarak kullanılır. dsDNA daha sonra, mRNA (Mesenger RNA= mesaj taşıyan RNA) üretimi (proteinlerin translasyonu için) ve projeni virionlarının genom kopyası için kalıp olarak kullanılır. Bu ürünler tamamlanmış projeni virionlar içinde bir araya toplanır (23).

Virus yaşam siklusu boyunca tek tip vertebralı konağı infekte eder. Circovirüsler çevrede oldukça stabildir, deterjanlar gibi birçok dezenfektana karşı dirençlidirler (23).

*Circoviridae* ailesine SEN-V ile beraber TTV ve TTV-benzeri mini virus (TTV-like mini virus- TLMV) gibi bir grup küçük, zarfsız, sirküler (10, 17, 18, 20), tek zincirli DNA virüsleri bulunmaktadır (10, 16, 17, 18).

Viral genom ORF1, ORF2 ve ORF3 olmak üzere 3 proteini kodlamaktadır. SEN-V'ün varsayılan ORF3 (putative ORF3; pORF3)'ünün *Drosophila melanogaster* topoisomerez I enzimi ile homoloji gösterdiği, bu sebeple ORF3'ün virusun replikasyonunda rol oynadığı düşünülmektedir. pORF3'ün transkripsiyonel aktivasyon ve baskılamada aracılık eden ve DNA veya RNA bağlayan nükleer bir proteini kodladığı düşünülmektedir (1).

Başka bir ilginç bulgu ise TTV'un ORF1'inde olmayan ancak SENV-A, SENV-C ve SENV-H'nin ORF1'inin C-ucunda fermuar leucine yapısı bulunmaktadır. ORF1 arg/lys bakımından zengin domainlere sahip olup oldukça hidrofildir. SEN-V genotipleri ORF1'deki varyasyonlara göre birbirinden ayırım göstermektedir. ORF2'nin fonksiyonu ise hala açık değildir. TTV ORF2'si ile SEN-V ORF2'sinin aminoasit (aa) dizilerinin sırası; protein dizilerinin %33.6–42.4 arasında bir benzerliğe sahip olduğunu göstermektedir. ORF2; SENV-A, SENV-B, SENV-C, SENV-D, SENV-E, SENV-F, SENV-G ve SENV-H genotipleri için sırasıyla 166, 156, 157, 152, 160, 146 ve 156 aa içermektedir (1).

ORF3'ün 2545- 2802 (SENV-A) nükleotidleri arasındaki mesafe ORF1'in 3'ucu ile üst üste biner, fakat ORF2 ile aynı okuma çerçevesini (reading frame) kullanır. Bu protein TLMV'deki yaklaşık 130 aa'lık proteinden daha küçük olup, 81–88 aa'den oluşmaktadır (1).

SEN virus filogenetik olarak hepatosellüler hasara neden olabilen DNA viruslerinin diğer bir üyesi olan TTV'a oldukça yakın benzerlik göstermektedir. Bu virus TTV ile ilişkili virusların bulunduğu *Circoviridae* ailesinde gruplandırılmıştır (1, 13, 24, 25). TTV ve TTV benzeri virusların (yani SEN-V ve SANBAN) genetik ilişkisini ve varyasyon derecesi araştırmak için nükleotid dizi analizleri yapılmıştır (25). Yapısal olarak TTV'a benzemesine rağmen, TTV prototipi ile %55'den daha düşük bir DNA dizi homolojisi ve %37'den daha düşük oranda bir aa homolojisi göstermektedir (Şekil-2.3) (1, 6, 8, 19). Yeni bir grup tek iplikli DNA virusları olan SEN-V formları; TTV ve TTV varyantları ile uzaktan ilişkili (15, 16, 18, 19) olmakla beraber TTV varyantları (SANBAN ve TUS01'i içeren) ile aynı grup içinde sınıflandırılmaktadır (15, 16, 18).

Filogenetik analiz ile 3 kesin grubun sınıflandırılması (TTV, SANBAN/SEN-V ve YONBAN) açık bir şekilde gösterilmemesine karşın bu 3 virus *Circoviridae* ailesinin

üyesidir (25). Bu viruslar 4 farklı gruba ayrılır; Grup 1; SANBAN ve YONBAN izolatları, grup 2; prototip TTV izolatları, grup 3; Panicum Mosaic Virus (PMV) izolatları, grup 4 (veya varsayılan 4. grup) farklı SEN-V izolatlarıdır (6, 15, 16). SANBAN ve TUS01'in ortak bir atadan evrim geçirerek geliştiği bildirilmektedir (1). Çizelge-2.1'de görüldüğü gibi fiziksel özellikleri, genomik yapı ve organizasyonu, non-translated bölgenin (%80'den fazlasını belirleyen) korunması ve ORF1'in yapı/fonksiyon benzerliği bu 3 virus arasında yakın bir ilişki olduğunu göstermektedir. Bu nedenle nomenklatür bu 3 virüsü, tek bir virus ailesi içinde 3 ayrı viral tür olarak ayırmıştır (25). Bu virusların taksonomisi Çizelge-2.2'de gösterilmiştir.

	TTV	SANBAN	TLMV	SEN-V	SNTV
Genom	DNA	DNA	DNA	DNA	DNA
Zincir	Tek/sirküler	Tek/sirküler	Tek/sirküler	Bilinmiyor	Tek/sirküler
Uzunluğu (nt)	3.852	3.808	2.856–2.897	3.249–3.619	>3.000
Büyükklük (nm)	30–50	Bilinmiyor	<30	26	30
Dansite (g/ml)	1.31–1.34	Bilinmiyor	1.31–1.34	1.403	1.33–1.35
Polarite	Negatif	Negatif	Negatif	Bilinmiyor	Bilinmiyor
ORF'leri	3	2	3	3	3
Taşıması	Parenteral/ enterik	Bilinmiyor	Parenteral	Parenteral	Parenteral

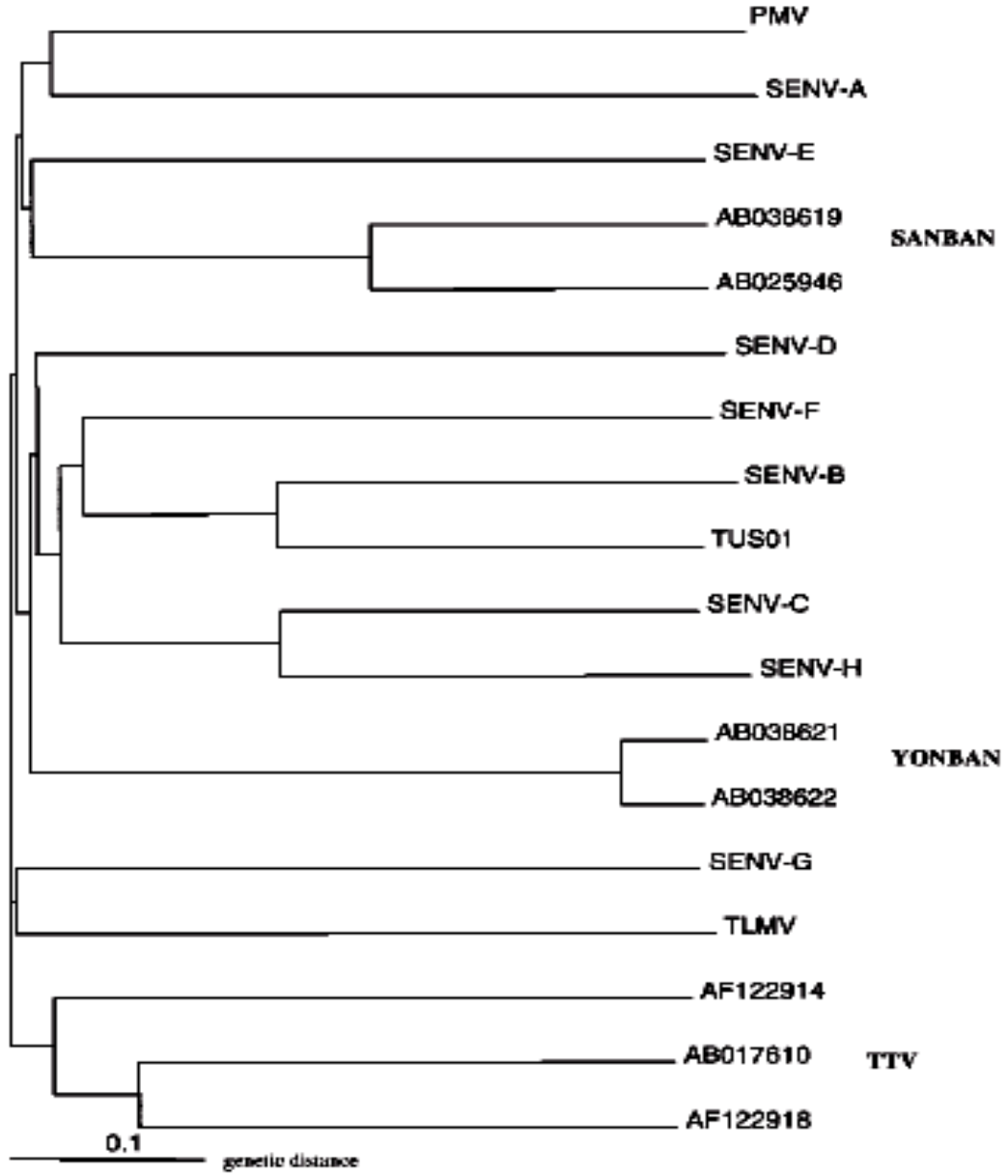
**Çizelge 2.1:** TTV ve “TTV-benzeri” virusların fiziksel ve biyokimyasal özellikleri (25).

Aile	Circoviridae	
	Genus	Circovirus
		Tür
		Porcine circovirus
		Tür
		Beak ans feather disease virus
		Tür
		Bovine circovirus
		Tür
		Porcine circovirus 2
		Tür
		Columbid circovirus
		Tür
		Porcine circovirus 1
		Tür
		Canary circovirus
		Tür
		Goose circovirus
		Tür
		Mulard duck circovirus
		Tür
		Muscovy duck circovirus
	Genus	Anellovirus
		Tür
		Torque teno virus (TTV)
		Tür
		TTV-like mini virus
		Tür
		<b>SEN virus</b>
		Tür
		Sentiel virus
		Tür
		Small anellovirus 1
		Tür
		Small anellovirus 2
	Genus	Gyrovirus
		Tür
		Chicken anemia virus

**Çizelge 2.2:** *Circoviridae* ailesinin taksonomisinde SEN-V'un yeri (26).

SEN-V'ün filogenetik analizi SEN-V'nun A'dan H'ye kadar isimlendirilen 8 farklı genotipinin varlığını göstermektedir (Şekil–2.3) (1, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 18, 20, 27, 28). Ancak son literatürlerde A'dan I'ya kadar 9 farklı izolat tanımlanmaktadır (13, 29). Her bir genotip en az %25 oranında nükleotid sekans farklılığı ile birbirinden ayırılır (1). Her bir subtip ise 3 ORF'yi kodlayan sirküler DNA'daki, %40–50 sekans homolojisi ile birbirine benzemektedir (29). Bu virus izolatları farklı popülasyonlarda değişen sıklıkta bulunmaktadır (10, 20). Post transfüzyon hepatitlerde genellikle D ve H genotipleri tespit edilmektedir (4, 12, 14, 16, 27). Bu iki genotipin transfüzyon ilişkili non-A-E hepatitli hastaların serum örneklerinde daha sık ve sağlıklı kan donörlerinin serum örneklerinde daha az sıklıkta bulunduğu bildirilmektedir (10, 20). Ayrıca bu iki

varyant arasında güçlü bir ilişkinin bulunduğu görülmektedir (17, 19). Bu ilişki %40–80 oranında sekans homolojisi şeklindedir (30).



**Şekil 2.3:** SEN-V'un A'dan H'ye kadar isimlendirilen 8 farklı genotipinin varlığını gösteren ORF1'dizi varyasyonlarına dayandırılarak oluşturulmuş filogenetik dendrogram (6).

### 2.1.3. Patogenez

Kısmi hepatektomi yapılan iki hastanın hepatoma ve non-kanseröz karaciğer dokusundan alınan parçalarda SEN-V'un spesifik komplementer DNA'sının (cDNA) amplifikasyonu, SEN-V'un karaciğer içinde replike olabildiğini göstermiştir (1).

SEN virusu hastaların çoğunda genellikle bir ay içerisinde immün cevap ile kendiliğinden temizlenebilmekle beraber aynı zamanda virus persistan kalarak kronik infeksiyon da oluşabilmektedir. SEN-V spesifik RNA'sı (muhtemel replikatif ajan) karaciğer dokusu tarafından çevrelenilmekte ve SEN-V kan transfüzyonu alıcılarının yaklaşık %45'inde bir yılı aşan bir süre persistan kalmaktadır. Hatta 12 yıl kadar uzun bir süre persistan kalarak infeksiyonlar oluşturabildiği ve reinfeksiyonlara sebep olabildiği bildirilmektedir (18, 31).

SEN-V'un persiste kalma yeteneği çok değişken ('HVR': hipervariable region, yüksek değişkenlik gösteren bölge) bölgesindeki mutasyon oranıyla (yılda, alanda  $7.32 \times 10^{-4}$ ) ilişkili olabileceği belirtilmiştir (1, 15, 18). Bu mutasyon oranının diğer DNA viruslarından daha yüksek olduğu ve HCV'ü gibi RNA viruslarındaki mutasyon oranına daha çok benzediği bildirilmiştir (15, 18).

Birçok bireyde SEN-V viremi birkaç yıl persiste kalabildiği için SEN-V DNA'sı pozitif ve negatif hastaların karaciğer dokusunun histopatolojik olarak incelenmesiyle uzun süreli geniş ve prospektif çalışmaların yapılması gerektiği belirtilmiştir (32).

Amerika Birleşik Devletlerinde (ABD), Ulusal Sağlık Örgütü'nün yaptığı bir çalışmada; transfüzyon sonrası infekte olan hastaların %55'inde infeksiyondan sonra 6 ay içinde ve %74'ünde ise başlangıçtan itibaren 5 yıl içinde virusun temizlendiği bildirilmiştir. Birkaç hastada ise virus yıllardan beri temizlenememiş, bu yüzden kronik infekte hastalarda virus uzun periyotları takiben sonunda temizlenip temizlenemeyeceğinin bilinmediği bildirilmiştir (1).

Wilson ve ark., SEN-V varlığını gösterdikleri enjektörle ilaç kullanan kişilerden, 9.3 yıl sonra aldıkları örnekleri tekrar test etmişler. Örneklerin %61'inde SENV-D'nin, %75'inde SENV-H'nin hala persiste olarak bulunduğunu ve tekrar teste alınan kişilerin yaklaşık yarısında farklı suşların bulunduğunu bildirmişlerdir (31, 33).

Schröter ve ark., SEN-V viremisini 7 hastada izlediklerini bildirmişlerdir. Bu vireminin geçici olduğunu ancak 2–3 yıl boyunca persiste kalabileceğini bildirmişlerdir. SENV-H'nin bu yavaş atılımının TTV ve Hepatit G virusuna benzemekte olduğunu ifade etmişlerdir (4).

SENV-V'un bilinmeyen etiyolojili akut ve kronik karaciğer hastalarında gözlenmesine rağmen; karaciğer hastalığının patogenezindeki rolü henüz bilinmemektedir (27). SENV-D ve SENV-H'nin transfüzyon ile ilişkili non-A-E hepatitlerinin etkeni olup olmadığı araştırılmaktadır. Her ikisinde transfüzyonla taşındığı bildirilmektedir. Ancak SEN-V ile transfüzyonla ilişkili non-A-E hepatitler arasındaki ilişkisinin olasılığı gittikçe yükselmektedir, fakat birçok SEN-V ile infekte kan transfüzyonu alıcısında hepatit gelişmediği için SEN-V'un post transfüzyon hepatit nedeni olabileceği hala kanıtlanamamıştır. Buna bağlı olarak da SEN-V enfeksiyonu ile karaciğer hücrelerinin hasarı arasındaki ilişkinin açık olmadığı ve daha sonraki çalışmaların dünya çapında SEN-V enfeksiyonunun klinikle ilgisini araştırmaya yönelik olmasının gerektiği bildirilmektedir (8).

#### **2.1.4. Hepatitlerle İlişkili Diğer Virusların SEN-V'le İlişkileri**

A-E hepatit virusları ile ilişkili olmayan (non-A-E) birçok viral hepatit vakasının meydana geldiğini gösteren kanıtlar bulunmaktadır. Bu vakalar fulminant, akut, kronik, post-transfüzyon, toplumdaki kazanılan hepatitleri ve hepatosellüler karsinomayı içermektedir. ABD'nde yalnız başına değişik karaciğer komplikasyonlarıyla kronik hepatit gelişen kan vericileri arasında, hala bilinmeyen etiyolojili post-transfüzyon hepatit gelişen 68.000 civarında vakanın olduğu tahmin edilmektedir (25).

Günümüzde ise bilinen hepatit virusları A, B, C, D, E ile ilişkisi gösterilemeyen, viral akut ve kronik hepatit ya da siroz olgularının sayısı tüm dünyada yaklaşık 300.000 olarak tahmin edilmektedir (14, 17). İlaç toksisitesi, otoimmün hastalıklar, alkol kullanımı gibi etiyolojide rolü olabilecek tüm faktörleri dışarıda bırakan kesin kriterler uygulandığında, akut hepatit ve post-transfüzyon hepatiti olgularının %10-20'sinde, etiyolojik ajanın; bilinen hepatit viruslarına ait protein, antikor veya nükleik asitlerin tespitinde kullanılan duyarlı yöntemlere rağmen tanımlanması mümkün olmamaktadır.

Bu nedenle Non-A-E hepatitleri ile ilişkilendirilebilecek yeni virusların tanımlanması amacıyla yapılan araştırmalar günümüzde de devam etmektedir (14).

#### **2.1.4.1. Hepatit G Virus (HGV veya GBV-C)**

1995 yılında (14, 25, 34) Simons ve ark., tarafından (25) Hepatit G Virus (HGV)'u, non-A-E hepatitin önemli etiyolojik etkeni olarak (25), idiyopatik kronik hepatitli iki farklı olgudan izole edilerek tanımlanmıştır (14). Daha sonraki çalışmalar, HGV'nun; floresans in situ hibridizasyon (FISH), Northern blot analiz ve immuno-histokimyasal boyama yöntemleriyle, hepatotropik bir virus olduğunu ortaya çıkarmıştır. Daha sonraları bu virus Flavivirus ailesine dahil edilmiştir. Birçok HGV infeksiyonunun asemptomatik bir şekilde, kısa sürede, kendi kendine iyileştiği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (25).

HGV; Flaviviridae ailesinde incelenen zarflı, ikozahedral simetrik, pozitif polariteli bir RNA virusudur. Genomik organizasyon açısından HCV'ye benzerlik göstermektedir. Viral genom yaklaşık 9500 nt'den ibarettir (14).

Farklı grupların çalışmaları da, HGV'nun hepatotropik özelliğini ve karaciğerde replike olduğunu göstermiştir. Eldeki veriler, HGV'nun bazı akut ve kronik hepatitlerde sorumlu olabileceğini düşündürmektedir. Ancak bazı çalışmalarda ise, sağlıklı ve hasta popülasyonlarında benzer oranlarda gösterilmesi ve Non-A-E hepatitlerinin yalnız %3-16'sında virusun saptanabilmiş olması, bu olgularda aranan etiyolojik etken olmaktan uzak olduğuna işaret etmektedir. Ayrıca virusun tek başına veya diğer hepatit virusları ile koinfeksiyon hallerinde fulminant hepatit oluşturabileceğine ilişkin kanıtlar da bulunmaktadır (14).

HGV'nun çoklu kan transfüzyonu almış kişilerde ve hemodiyaliz hastalarında yüksek oranda saptanması, virusun en önemli bulaşma yolunun kan ve kan ürünleri aktarımı olduğunu düşündürmüştür (14).

Epidemiyolojik veriler, virusun dünyanın çeşitli bölgelerinde bulunduğunu ve sağlıklı popülasyonlarda %1-4 oranında saptanabildiğini göstermektedir (14). Yüksek riskli gruplar olarak kabul edilen hemofili hastaları, çoklu transfüzyon almış kişiler,



intravenöz ilaç kullananlar gibi popülasyonlarda prevalans daha yüksek olarak izlenmektedir (14, 34).

Günümüzde ise HGV infeksiyonlarının, non A-E hepatit vakalarında %20'den daha az sıklıkta bulunduğu gösterilmiştir. Bu sonuçla, ilave non A-E hepatit viruslarının araştırması devam etmiştir. 1997'den beri 5 muhtemel non-A-E virusu tanımlanmıştır. Bu viruslar; TTV, SANBAN virus, TLMV, SEN-V ve Sentinel virus (SNTV)'tür. Bu virusların karakteristik özellikleri Çizelge-2.1'de gösterilmiştir (25).

1997-2000 yılları arasında birbirlerine oldukça benzer özelliklere sahip üç yeni virus; TTV, TLMV ve SEN-V; non-A-E ve post-transfüzyon hepatitleri ile ilişkili olarak (14, 17, 27) moleküler biyolojik yöntemlerle tanımlanmış ve ortak bir kökene sahip olduğu ortaya konulmuştur (14).

#### **2.1.4.2. TT Virus (TTV)**

Virusun DNA'sı ilk kez 1997 yılında Japonya'da bir post-transfüzyon hepatiti olgusunda saptanmıştır (14, 34). TTV zarfsız ve 30-50 nm partikül büyüklüğüne sahiptir. Negatif polariteli sirküler tek zincirli DNA genomu 3852 nt uzunluğundadır. Virus; bilinen en az 16 genotipinin kodlandığı bölgede %30'dan fazla genetik çeşitlilik göstermektedir (25).

Virusun iki farklı genomik DNA dizisi arasında %50'den fazla farklılık saptanabilmekte ve ORF1'in içerisinde izolatlar arası farklılıkların belirgin olarak bulunduğu 'yüksek değişkenlik gösteren bölgeler' (HVR 1, 2, 3) bulunmaktadır. Günümüzde virusun coğrafi dağılımı ile ilgili görünmeyen 25'in üzerinde viral genotip tanımlanmıştır. Ayrıca genotipler arasında rekombinasyon olaylarının sıklıkla meydana geldiği bilinmektedir (14).

TTV'un taksonomisi konusunda henüz uluslararası bir görüş birliği oluşmamıştır. TTV izolatları, genel özelliklerinin benzerliği nedeniyle çoğunlukla *Circoviridae* ailesi içinde incelenmekle birlikte, virusun yüksek derecede genetik çeşitlilik gösterdiğinin saptanması ve tanımlanan birçok yeni genotip ve virus varyantlarına ait verilerin artması ile sınıflandırmaları güçleşmiştir. Ancak virusun

sirküler DNA'dan oluşan genomu ve genomik organizasyonun benzerliği nedeniyle *Circoviridae* ailesinde incelenmesi önerilmektedir (14).

TTV'un vücuda girdikten sonra primer çoğalmasını gerçekleştirdiği hedef doku ve organlar kesin olarak tanımlanmamıştır (14). TTV'un karaciğer dokusunda replikasyonunun indirekt olarak kanıtlandığı bildirilmektedir. Karaciğer biyopsilerinde in situ hibridizasyon ile TTV'un tespiti de bildirilmektedir. Ancak hibridizasyon bulgularında hepatositlerde hiçbir morfolojik değişiklik gözlenmemiş olması, karaciğer patogenezinde önemli bir rolü olmadığını işaret etmektedir (25). Ayrıca daha sonraları, TTV'a ait DNA'ya Non-A-E hepatitli olgularda, etiyojisi bilinen diğer hepatitlerde, birçok hastalıkta ve sağlıklı kan donörlerinde saptanabilmiştir (14).

TTV sağlıklı popülasyonda ve kronik karaciğer hastalarında yüksek sıklıkta bulunabileceği bildirilmiştir. TTV'un insanların dışında diğer primatlarda da tespit edilebildiği bildirilmiştir (34). TTV infekte bireylerin ve tavuk (%19), inek (%25), domuz (%20) ve koyunları (%30) içeren çiftlik hayvanlarının; safra, dışkı, kan ve kan ürünlerinde bulunduktan sonra, virusun parenteral olarak ve fekal-oral yolla enterik olarak taşınabileceği bildirilmiştir (25, 34). TTV DNA'sı TTV ile infekte hastaların salya (%78) ve semen (%60)'lerinde de yüksek oranda bildirilmiştir. Bu şekilde bulaşma Amerika'da %33, Japonya ve diğer ülkelerde %92 oranında bildirilmiştir (25).

TTV kırsal ve kentsel yerleşim bölgeleri arasında fark olmaksızın tüm dünyada saptanmaktadır (35). Virusun duyarlı saptama sistemleri ile bazı bölgelerdeki prevalansının %90–95 gibi çok yüksek oranlarda olduğunu göstermektedir (14).

Bu güne kadar kronik karaciğer hasarında TTV'un katkısı veya akut sporadik hepatit, hepatosellüler karsinoma veya non A-E hepatit ile hiçbir ilişkisi gösterilmemiştir. Virusun doğada her yerde bulunması sebebiyle hem sağlıklı kan donörlerinde hem de genel popülasyonda oldukça yüksek sıklıkta rastlanabilmektedir (25).

#### **2.1.4.3. SANBAN virus**

Orijinal Okamoto primerleri ile TTV DNA'sı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) negatif olan bir insanın serumundan SANBAN olarak isimlendirilen bir izolat

bildirilmiştir. SANBAN tek zincirli, sirküler DNA'sı ile TTV'a benzer, fakat daha önce bildirilen TTV'un en uzun izolatından 44 nt daha kısadır. Günümüzde SANBAN virusunun taşınma şekli, hepatotropik özelliği ve hastalıkla ilişkisi bilinmemektedir (25).

#### **2.1.4.4. TTV Benzeri Mini Virus (TTV-like mini virus, TLMV)**

TLMV ilk kez 1999 yılının sonunda kan donörlerinde TTV prevalansının saptanması amacıyla Japonya'da yapılan bir araştırma sırasında gösterilmiş ve TTV'a olan benzerlikleri nedeniyle TTV benzeri mini virus (TTV-like mini virus, TLMV) adını almış (14) ve beraberinde chicken anemia virusu (CAV=Tavuk anemi virusu) identifiye edilmiştir. TLMV tek zincirli zarfsız, dansitesi TTV'a benzer fakat yaklaşık 100 nt'lik korunmuş bölge ve G-C'den zengin kısım dışında TTV ile belirgin dizi homolojisi göstermediği saptanmıştır. TLMV, TTV ile benzer dansiteye sahip olmasına karşın viral partiküllerin TTV'dan daha küçük olduğu belirtilmiştir (14, 25).

Bu virus TTV ile ko-infekte sağlıklı normal 3 kan donöründen izole edilmiştir. TLMV'nin genomu yaklaşık 2860 nt'den (TTV'dan en az 1000 nükleotid daha az) oluşmaktadır. Ancak TTV, TLMV ve CAV'ın nükleotid ve aminoasit dizileri karşılaştırıldığında bu üç virusun birbiriyle ilişkili olmadığı gösterilmiştir (25).

TTV'da olduğu gibi TLMV'de de çok yüksek düzeyde genetik çeşitlilik izlenmektedir. Epidemiyolojik özellikleri TTV'a benzeyen virus farklı biyolojik örneklerden izole edilebilmekte, toplumda yüksek oranda saptanmakta ve infekte kişilerde birçok genotipi bulunmaktadır (14).

SEN-V ile ilişkili bu virusların benzer olabilmeleri ile ilişkili olarak; patojenitelerinin tam olarak bilinmemesi ve taşınma şekillerinin bir sonucu olarak da bu virusların hepsinin tek bir ailenin üyesi oldukları açıktır. Patojenitelerindeki eksiklik, virus ve konak arasında karşılıklı adaptasyon veya muhtemelen spesifik hücrel reseptör bağlayan yapılarının az olmasına ve hücreden hücreye viral yayılımın ve buna bağlı olarak sitopatojenitenin engellenmesi gibi bir çok faktöre bağlı olarak meydana gelebileceği düşünülmektedir. 'Zararsız' TTV veya TTV benzeri virusların bu tiplerinden orphan (öksüz) viruslar olarak söz edilmektedir. Ama bu orphan viruslar

terimi 1950'lerde hücre kültüründe izole edilen, fakat bilinen hiçbir hastalıkla ilişkilendirilmemiş olan virusları tanımlamak için orijinal olarak uydurulmuştur. Bu parenteral virusların; konaklarına karşı zararsız olabilecekleri varsayılmış ve daha iyi bir tanımlama ismi olarak 'endosymbiont' kelimesi uygun görülmüştür (25).

### **2.1.5. SEN-V'un Laboratuvar Tanısı**

SEN-V'un karaciğer hasarına neden olup olmadığı net olmamakla beraber, post transfüzyon hepatiti gelişen kan transfüzyonu vericilerinin kanlarında SEN-V DNA'sının ortaya çıkarıldığı ve kronik karaciğer hastalıklı ve/veya aynı risk faktörlerine sahip hastalar arasındaki SEN-V enfeksiyonunun yüksek oranda görüldüğü bildirilmektedir. Başka bir deyişle yüksek SEN-V prevalansı genel popülasyonda da bulunabilmektedir ve bunların çoğunun karaciğer hastalığına sahip olmadığı düşünülmektedir. Ayrıca hepatik fonksiyon ve karaciğer enzim anormallikleri; SEN-V durumu ne olursa olsun kronik viral hepatitli hastalarinkine benzer olduğu bildirilmektedir. Bu bulguların hepsi; TTV ile yakın ilişkili olduğunu fakat sadece SEN-V'un insanlarda akut ve /veya kronik karaciğer hastalığına neden olabileceğini ileri sürmektedir. Bu sebeple, hasta takip başlangıcında, bilinen bütün SEN-V genotiplerinin izleme teknikleri ile belirlenmesinin mantıklı olduğu düşünülmektedir (13).

Günümüzde SEN-V'un tespit edilmesi; spesifik primerler kullanılarak uygulanan PZR ile yapılmaktadır. Ayrıca genotipleme, PZR'yi takiben elde edilen ürünlerin, SENV-D ve SENV-H genotiplerine spesifik, biotinle işaretlenmiş problrarla hibridizasyonu ile yapılmaktadır. Bu amaçla geliştirilmiş ticari kitler mevcuttur (DNA enzyme immunoassay, DEIA) (13, 15). Karaciğer hasarına diğer SEN-V genotiplerinin neden olup olmadığı bilinmediğinden, önce genotip spesifik testlerle bütün SEN virus genotiplerinin izlenmesini sağlayan bir tekniğin avantajlı olabileceği ifade edilmektedir (13).

Spesifik antikörlerin gerekmediği ve tekniğin bütün bileşenlerinin kolayca elde edilebildiği PZR ile gerçekleştirilen viral testler birçok laboratuvar da gerçekleştirilebilmektedir. Kojima ve ark., (13) SEN-V izleme tekniği olarak AI-1F ve AI-1R genel primerlerini kullanarak amplifiye edilen PZR ürünlerini incelemişlerdir.

Bütün bilinen SEN-V genotipleri ile meydana gelebilen infeksiyonları belirleyebilmek için, genomik dizi analizi ile doğrulanan tekniklerin spesifitesi ve sensitivitesinin, DEIA tekniği ile elde edilenden daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir (13).

TTV gibi SEN-V de yüksek genetik çeşitliliğe sahiptir. Tanaka ve ark., (6) SEN-V genotipleri arasında nükleotid homolojisini %52–78 olarak, ORF1'in aminoasit sekansının homolojisini ise %39–77 olarak bildirmişlerdir (6). Kojima ve ark., (13) PZR ürünlerinin dizi analizini gerçekleştirmişler ve SEN-V genotiplerinde yüksek genetik çeşitliliği doğruladıklarını bildirmişlerdir. İlginç bir şekilde, bilinen SEN-V genotipleriyle ve TTV ailesiyle düşük homolojiye sahip çeşitli klonlar bulduklarını bildirmişlerdir. Bu klonların yeni SEN-V genotipi olup olmadığını daha sonraki çalışmaların göstereceğini bildirmişlerdir (13).

Karaciğer hastalığının nedeninden sorumlu olan SEN-V genotipleri açık olmadığından SEN-V ile karaciğer hastalığı arasındaki ilişki ile ilgili önemli incelemelerin, genotip spesifik PZR ve/veya dizi analizi ile yapılabileceğini bildirilmiştir. Kojima ve ark., (13) SENV-D genotipleriyle meydana gelen infeksiyonun tespitinde; D-spesifik primeri kullandıkları tekniğin spesifite ve sensitivitesini yeterli olduğunu saptamışlardır. H-spesifik primerlerin SEN-V'un diğer genotipleriyle (özellikle SENV-E) çarpaz reaksiyon verdiğini ve tekniğin geliştirilmesi gerektiğini bildirmişlerdir (13).

SENV-V'un tespit edildiği PZR'ın sensitivitesi kullanılan primerlere bağlıdır. SENV-V prevalansının; farklı primerleri kullanan araştırmacıların çalışmalarında, değişik oranlarda tespit edildiği görülmektedir (1).

Kojima ve ark., genel SENV-V izleme ve genotip spesifik teknik adı verilen 2 PZR tekniğini geliştirmişlerdir (1).

PZR ile gösterilen bütün SENV-V genotiplerinin ve SENV-V ile ilişkili sekansların spesifitesi 20/20'dir (%100). Genotip spesifik PZR ile SENV-D ve SENV-H'nin spesifitesi 7/7 (%100) ve 7/11 (%64) olarak bildirilmiştir (1).

AI genel primerleri ile yapılan PZR'nin SENV-V infeksiyonunu izlemede faydalı olduğu ve ileri çalışmalarda ise, dizi analizinin SENV-V'nun karaciğer hastalığındaki potansiyel etkinliğinin ortaya çıkarılmasında kullanılmaya devam edileceği bildirilmektedir (13).

### 2.1.6. Epidemiyoloji

Akut ve kronik karaciğer hastalığının değişik formları ile birlikte bulunabilen viral hepatitler dünya çapında büyük bir halk sağlığı problemi olarak bulunmaktadır (34).

Tüm dünyada olduğu gibi, ülkemizde de önemli sağlık sorunlarından birisi viral etiyolojili karaciğer hastalıklarıdır. Viral hepatit tablosuna yol açan en az beş farklı virusun (Hepatit A-E virusları) tanımlandığı bilinmektedir. Asıl hedefleri karaciğer olmayan ancak ender de olsa hepatite yol açan diğer bazı viruslar (Herpes simpleks virusu-HSV, Sitomegalo virusu-CMV, Epstein Barr virusu-EBV, Adenovirus, Parvovirus, gibi) bir yana bırakılır ise, hepatositlere tropizm gösteren bu beş virüsü bulaş yollarına göre iki grupta toplamak mümkündür (14);

1. Fekal-oral yoldan bulaşan; hepatit A virusu (HAV) ve hepatit E virusu (HEV)
2. Parenteral yoldan bulaşan; hepatit B virusu (HBV), hepatit C virusu (HCV) ve hepatit delta virusu (HDV)

Bu listeye HGV, TTV ve SEN-V gibi etiyolojisi belirlenmemiş hepatit olgularından izole edilen, ancak patojeniteleri konusunda bazı kuşklar bulunan üç yeni etkeni de ilave etmek mümkündür (1, 34).

Bilinen hepatit viruslarının hepsi negatif bulunan birçok hepatit hastası olması nedeniyle hastalığa neden olan başka patojenlerin olduğundan şüphe edilmiştir. Nedeni bilinmeyen akut hepatit vakalarının %10-20'si, kronik hepatit vakalarının %30'u, fulminant hepatit vakalarının %50-60'ından SEN virusunun sorumlu olabileceği bildirilmiştir (17). A, B, C, D, E hepatit virusları transfüzyonla ilişkili viral hepatit vakalarının %80'inden sorumludur. Geriye kalan %20'lik kısımdan da bu virüsün sorumlu tutulduğu bildirilmektedir (2, 36).

SENV-A ve SENV-E'nin kan donörlerinde prevalansının düşük bulunduğu bildirilmiştir. Fakat non A-E hepatit ile ilişkisi açık bir şekilde ortaya konamamıştır (8). İtalya'daki araştırmacılar, kan donörlerindeki SEN-V izolatlarının prevalansını; SENV-E için %0, SENV-C için %2, SENV-B için %13 olarak bildirmişlerdir (37). Ancak SENV-D ve SENV-H prevalansının donörlerde %1'den daha az, transfüzyon ile ilişkili non A-E hepatit vakalarında ise %50'den daha fazla olması bu virusların transfüzyonla taşındığını ortaya koymaktadır (8).

HCV'nin klonlanmasından ve bu patojen için duyarlı serolojik ve moleküler analizlerin gelişmesinden sonra, transfüzyon ile ilişkili hepatitlerin insidansında büyük azalma meydana gelmiş olmakla beraber transfüzyon ile ilişkili hepatit vakalarının yaklaşık %10'u ve toplumdan kazanılan hepatit vakalarının %20'sinde ilave etkenlerin varlığını işaret eden bir etiyoloji tanımlanmamıştır (8). Non A-E hepatitlerle ilişkili HGV olarak isimlendirilen bir DNA virusu yakın zamanlarda klonlanmıştır (10, 27). Ancak daha sonraki çalışmalarda; HGV ve TTV, non B-C hepatosellüler karsinoma (HSK)'nin majör etiyolojik etkeni olarak gösterilmediği ve bunların hepatotropik olduklarının daha doğrulanmadığı bildirilmiştir (27). Ayrıca son yapılan birçok çalışmada da HGV ve TTV'un klasik hepatit virusları gibi karaciğer hastalığına neden olmadığı belirtilmiştir (10).

TTV, 1997'de gösterilebilir farklı analizlerle (Representational Different Analysis-RDA) keşfedilmiştir. Beş post transfüzyon hepatit vakasının 3'ünde tespit edilmiş ve non A-E hepatitlerinin potansiyel nedeni olarak ileri sürülmüştür (8). Non A-E hepatit vakaları ve kontroller, belirleyici TTV primerleri kullanılarak test edilmiş fakat transfüzyon ilişkili hepatit ile ilişkisi bulunamamıştır. Ayrıca Japonya'da TTV genomunun daha saklanmış bölgesi için primerler kullanılarak yapılan çalışmada, etken Japon kan donörlerinin %90'undan fazlasında bulunmuştur (8, 20). Artık TTV'un transfüzyon ile ilişkili hepatitin nedeni olduğu ihtimali üzerine ortaya atılan görüşler azalmıştır. Daha sonraları yapılan diğer çalışmalar da, TTV'un yüksek prevalansı ve transfüzyon ile ilişkili hepatitlerle ilişkisinin olmadığını doğrulamıştır (8). Bu döneme yakın zamanlarda A-E hepatit virusları veya HGV'nun viral göstergelerine rastlanmayan fakat transaminaz seviyesi yüksek, post transfüzyon hepatitli bir hastanın plazmasından SEN-V olarak isimlendirilen yeni bir DNA virusunun klonlandığı bildirilmiştir (27).

SEN-V; farklı oranlarda tespit edilmesine rağmen, çalışmaların yapıldığı bütün ülkelerde endemik olduğu ortaya çıkmıştır. Amerika'da, gönüllü kan donörlerinin büyük bir kısmı test edilmiş ve prevalansı İtalya'da bildirilenlere benzer bir şekilde %1.8 oranında tespit edilmiştir. Ancak Japonya'da, gönüllü kan donörlerinin %10'u ve Taiwan'dakilerin %15'i pozitif olarak bulunmuştur. Kanada'da, saklanan kan örneklerinin retrospektif çalışmasında popülasyonun %36'sının SEN-V ile infekte olarak bulunduğu bildirilmiştir (1, 29). Yapılan bir çalışmada; kalp operasyonu

sonrasında hastalarda SEN-V prevalansı izlenmiş, SEN-V kan transfüzyonundan sonra hastaların %30'unda, transfüzyon olmayanların ise %3'ünde bulunmuştur. Aynı çalışmada, 12 üniteden daha fazla transfüzyon aldıktan sonra, oran %45.2'ye çıktığı için SEN-V infeksiyon oranının transfüze edilen ünitelerin total sayısı ile arttığı bildirilmiştir (1).

Türkiye'de Elazığ ilinde 180 sağlıklı çocukta yapılan SEN-V prevalansı çalışmasında çocukların 25'inde (%14) SENV-D ve 15'inde (%8.3) SENV-H pozitifliği belirlenmiştir. Bu çalışmada araştırmacılar yüksek oranda SEN-V varlığını belirlediklerini ve bu virusun yalnızca parenteral yoldan değil parenteral olmayan yollarla da bulaşabildiğine işaret etmişlerdir (38).

Japonya'da çocuklarda yapılan SEN-V prevalans çalışmasında SENV-D fulminant hepatitli çocuklarda %60, akut hepatitli çocuklarda %5, kronik hepatitli çocuklarda %11, kontrol grubunda %13 ve gebe kadınlarda %15 oranında tespit edilmiştir. SENV-H fulminant hepatitli ve kronik hepatitli çocukların hiçbirisinde bulunamamış olmakla beraber akut hepatitlilerin %5'inde, kontrol grubunun %2'sinde ve gebe kadınların %12'sinde tespit edilmiştir. SENV-D akut veya kronik hepatit ile kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık bulunmamış ancak, SENV-D tespit oranı fulminant hepatitlilerde kontrollerden anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur. SENV-H'nin tespit oranında ise, hepatit vakaları ve kontroller arasında anlamlı bir farklılık bulunmamış olmakla beraber, SENV-H saptama oranının gebe kadınlarda kontrollerden anlamlı bir şekilde yüksek olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, SENV-D'nin fulminant hepatit için bir risk faktörü olabileceği bildirilmiştir (17).

Başka bir çalışmada; kan transfüzyonu almamasına rağmen ameliyat sonrası küçük bir oranda SEN-V geçmesi nedeniyle, SEN-V'un hastane şartlarında iatrojenik yollarla taşınmasının mümkün olabileceği bildirilmiştir (1). Ayrıca Kanada'nın bir bölgesindeki fekal-oral yol ile taşınan akut hepatit-A infeksiyonlu hastalardaki SEN-V prevalansının sağlıklı erişkinlerdekinden daha yüksek olması nedeniyle, SEN-V'un bu yüksek prevalansını paranteral olmayan bir taşınma yolunun olabileceği gerçeğine dayandırmışlardır (1, 29).

SENV-V infeksiyonunun anneden bebeğe taşınmasının gösterilmesi amacıyla 30 annenin dahil edildiği bir çalışmada, annelerin 15'inde SEN-V izole edildiği bildirilmiştir. Otuz bebekten 13'ü ise SEN-V yönünden pozitif hale gelmiştir (1, 37).



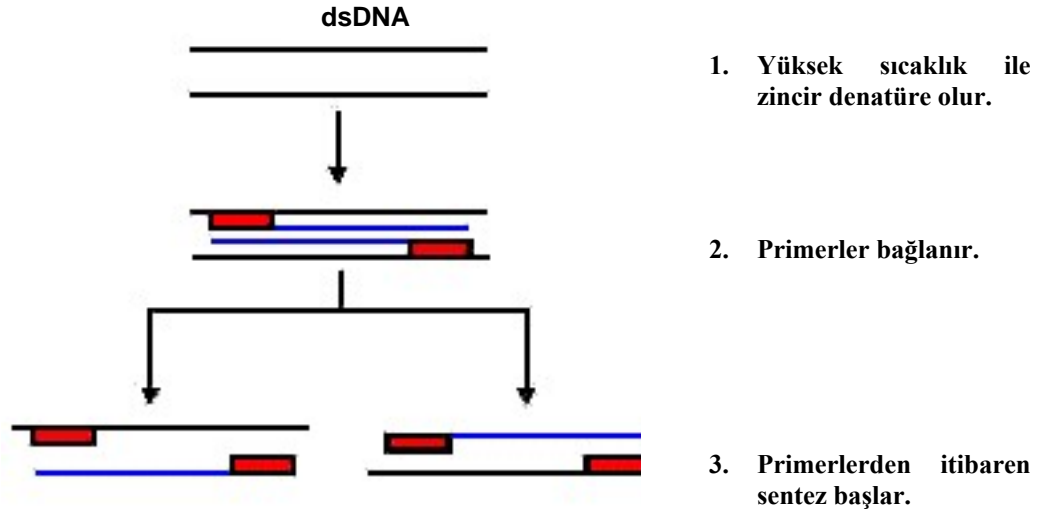
## 2.2. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR) TEKNİĞİ

PZR, 1985 yılında ilk kez Kary Mullis tarafından amplifikasyona dayanan sistem olarak keşfedildi (39). Günümüzde ise moleküler biyolojinin temel uygulama tekniklerinden birisidir.

PZR, nükleik asitlerin in vitro şartlarda replikasyonu için geliştirilmiş bir tüp test sistemidir. Hedef DNA/RNA'nın selektif olarak amplifikasyonuna imkan verir. İn vivo şartlarda bölünen bir hücrede DNA'nın replikasyonu çeşitli enzimler tarafından düzenlenen ve genomun kopyalanması ile sonuçlanan bir işlemdir. Bir test tüpü içerisinde gerçekleştirilen PZR'de in vivo çoğalma örnek olarak alınmıştır. Yalnızca DNA polimeraz enzimi yardımı ile genomun tamamı değil, spesifik bölgelerin kopyalanması gerçekleştirilir (40).

Amplifikasyon bazlı teknikler; birinci reaksiyonda üretilen bütün nükleik asitlerin bir sonraki reaksiyon için kalıp görevi gördüğü, bir birini izleyen siklus serisi içinde tekrarladıkları için 'zincir reaksiyonu' (chain reaction) olarak adlandırılmıştır (39).

PZR dizisi bilinen iki bölge arasında uzanan DNA parçasını çoğaltmak için kullanılır. İki tane oligonükleotid, DNA polimeraz tarafından katalizlenen bir seri sentetik tepkimenin primerleri olarak kullanılır. Bu oligonükleotidler farklı dizilere sahip olup, kalıp DNA'nın karşılıklı dizilerinde bağlanırlar. Kalıp DNA ilk önce primerlerin varlığında denatüre edilir. Reaksiyon karışımı daha sonra, kalıp dizilere, primerlerin bağlanması için gereken sıcaklığa düşürülür. Bağlanmış olan primerler, uygun sıcaklığa çıkartılarak DNA polimeraz ile uzatılması sağlanır (41).



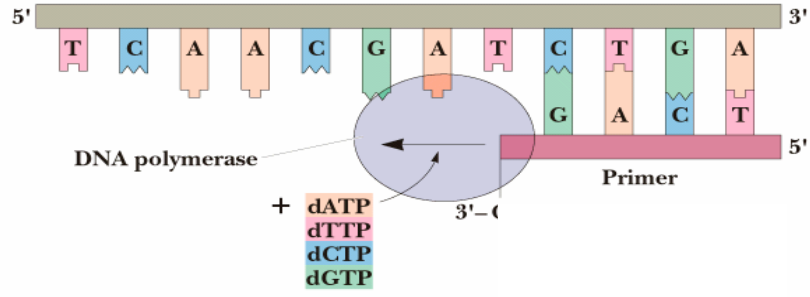
Şekil 2.4: PZR aşamaları (42).

Kısaca PZR, temel olarak tekrarlayan 3 aşamalı bir yol izler (Şekil–2.4) (43).

Bunlar:

1. Çift iplikli DNA (dsDNA)'nın ısı (90–95°C) ile tek iplikli DNA (ssDNA)'ya denatürasyonu
2. Ortamın 40–60°C'ye soğutulmasıyla primerlerin (spesifik sentetik oligonükleotidler) ssDNA'ya bağlanması (annealing)
3. Sıcaklığın 70–75°C'ye yükseltilmesiyle ssDNA kalıplarına bağlanmış olan primerlerden doğru 5'-3' yönünde zincir uzamasının (elongasyon) gerçekleşmesi (43)

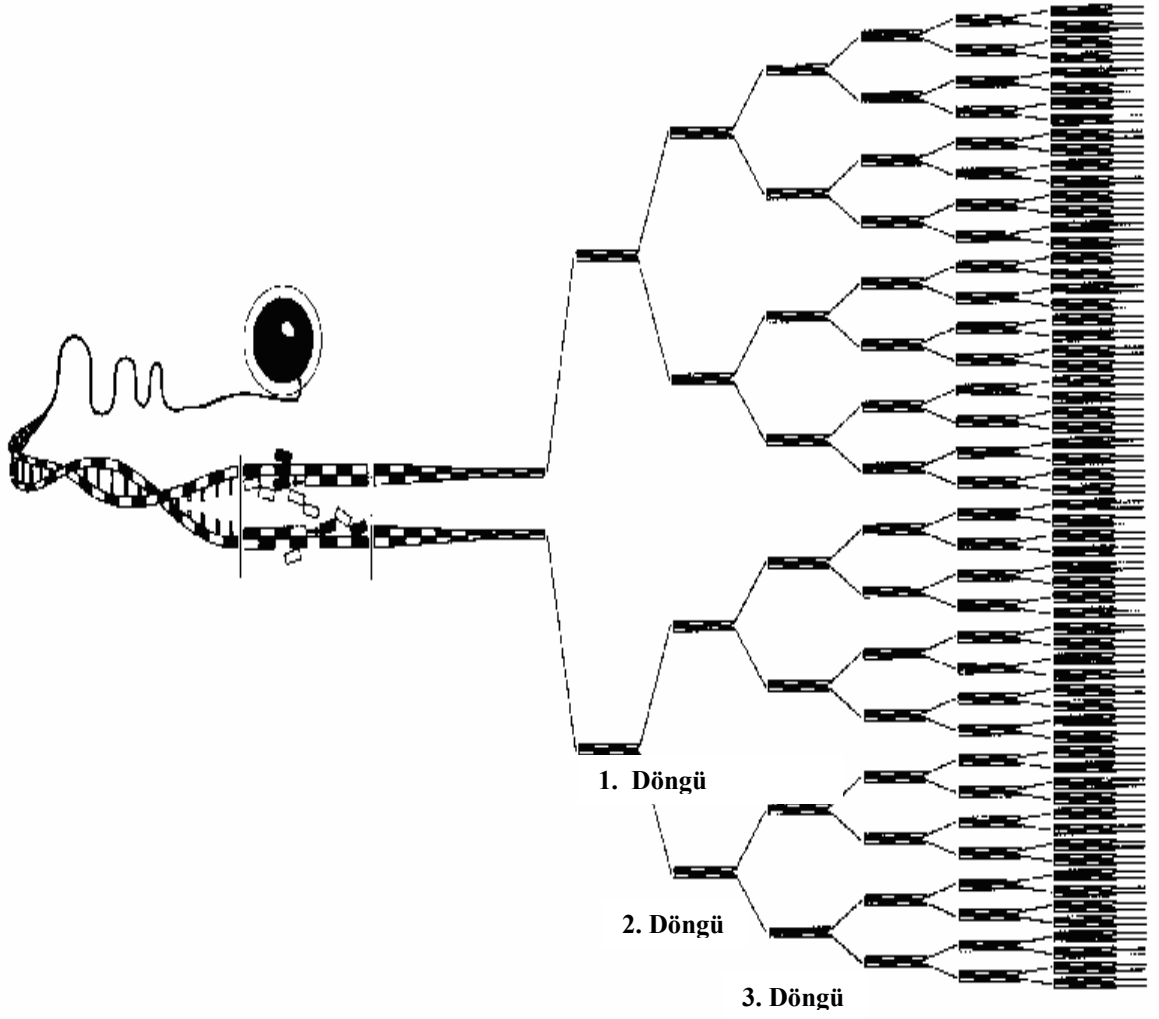
Zincir uzaması aşamasında kalıp DNA'ya bağlanmış primerlerin 3'-OH gruplarına kalıp DNA'daki bazlara uygun olarak deoksi-nükleotid-tri-fosfatlar (dNTP) bağlanarak zincirin uzaması sağlanır. Bu işlem ısıya dayanıklı bir DNA polimeraz enzimi olan *Taq* polimeraz ile katalize edilir (Şekil–2.5) (43).



Şekil 2.5: Zincir uzaması (43).

Uzamayı takiben orijinal DNA segmenti; yeni cDNA'lar ve bunu takiben yeni kalıp DNA'lar oluşturur. Böylece her PZR siklusunda mevcut spesifik DNA miktarı iki katına çıkmaktadır (43).

Uygun şartlarda meydana gelen, denatürasyon, bağlanma ve uzama ile meydana gelen ilk basamak amplifikasyon işlemi ile DNA sentezi gerçekleşir. Daha sonra bu işlem birçok kez tekrarlanır (41). Eğer bu üç siklus tekrarlatılırsa yani yeni zincirleme reaksiyon başlatılırsa, her siklusta bir öncekinin iki katı DNA molekülü (sadece primerler arasında kalan bölge) elde edilir. Bu düzen dahilinde yapılan yaklaşık 20–35 siklusun tamamlanmasıyla hedef nükleik asitin miktarı görünür bir şekilde milyon-trilyon kez ( $10^9$ – $10^{12}$ ) artmaktadır (Şekil–2.6) (39) .



Şekil 2.6: PZR döngüleri (44).

Reaksiyon ortamındaki tüm bileşenlerin (tampon, nükleotidler, primerler, DNA ve enzim) termostabil olmaları nedeniyle, her siklus için sadece belirtilen sıcaklık değişikliklerinin yapılması yeterlidir. Bu işlem programlanabilir bir cihaz (thermal cycler, ısı döngü cihazı) ile otomatik olarak yapılmaktadır.

### 2.2.1. Polimeraz Zincir reaksiyonunun bileşenleri

Standard bir PZR reaksiyonu genellikle 50–100 µL'lik bir hacimde, 50mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.4), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 µg/mL jelatin, 0.25 µM primer çifti, 200 µM dNTP (herbir dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1–2.5 U *Taq* polimeraz ve örnek DNA'nın varlığında gerçekleştirilir. Reaksiyon termal döngülerin programlandığı ve uygulandığı bir termal cyclus'da gerçekleştirilir. Genel olarak 94°C'de 20 sn'lik denatürasyon, 55°C'de 20 sn'lik bağlanma ve 72°C'de 30 sn'lik uzamadan oluşan 30 siklusk bir döngü programı farklı uzunluklardaki birçok hedef dizilerin amplifikasyonu için kullanılabilir (43).

PZR'nin bileşenleri:

- Enzim
- Deoksiribonükleotid Trifosfatlar (dNTP)
- PZR Tampon İçeriği
- Oligonükleotidler (Primer)
- Hedef Diziler
- Sıcaklıklar ve Döngü Parametreleri

#### 2.2.1.1. Enzim

Oldukça yaygın kullanılan DNA polimeraz, *Thermus aquaticus*'dan izole edilen *Taq* polimerazdır. *T. aquaticus*'un avantajı, yüksek sıcaklığa dayanıklı olmasıdır. Ancak diğer termostabil DNA polimerazlar da kullanılabilir. *T. thermophilus* DNA polimeraz, *Bacillus stearothermophilus* DNA polimeraz ve *Thermococcus litoralis* DNA polimeraz gibi alternatif termostabil enzimler de kullanılabilir. *Taq* polimerazın aktivitesi kabaca 65–72°C arasında iki katına çıktığı için çalışmadaki ısı da önemlidir. *Taq* polimeraz aktivitesi 10 mM Tris'de 8.2–9.0 pH aralığında (25°C'de ölçülen) optimaldir ancak daha düşük veya yüksek pH aralığında aktivitesi azalmaktadır (45).

PZR protokollerinde kullanılan enzimlerin konsantrasyonu önemli derecede değişkendir. Günümüzde en sıklıkta tercih edilen *Taq* polimeraz çoğunlukla

reaksiyonlarda 1–2.5 U/ 100 µL konsantrasyonlarda kullanılır. Enzim konsantrasyonu çok yüksek olduğunda non-spesifik eşleşme, düşük olduğunda ise zayıf amplifikasyon etkisi olur (41).

### **2.2.1.2. Deoksiribonükleotid Trifosfatlar (dNTPs)**

dNTP'lerin optimal konsantrasyonu her reaksiyon için ayrı ayrı hesaplanmalı ve  $Mg^{+2}$  konsantrasyonu ile uyumlu olarak kullanılmalıdır. Genelde dNTP konsantrasyonu 20 ile 200 mM arasındadır. Yüksek konsantrasyonlar düşük reaksiyon spesifitesi ve yüksek maliyet ile sonuçlanırken, düşük konsantrasyonlar normale göre daha az ürün eldesi ile sonuçlanır (41).

dNTP'lerin herbiri liyofilize veya nötralize sulu solüsyonlar olarak elde edilebilir.  $-20^{\circ}C$ 'de herbiri birkaç ay stabildir fakat liyofilize olanların kullanmadan önce KOH ile nötralize edilmeleri gerekebilir. dNTP'ler son konsantrasyonları 100 mM olacak şekilde hazırlandıkları zaman, küçük hacimlerde (herbir 20 mM dNTP'den 50 µl) paylaştırılabilirler ve birkaç ay  $-20^{\circ}C$ 'de 100 katlı konsantrasyon şeklinde saklanabilirler (45).

### **2.2.1.3. PZR Tampon İçeriği (Reaksiyon Buffer)**

Çeşitli reaksiyon tamponu formülasyonları bildirilmiştir fakat 1988'de Saiki ve ark.,'nın tanımladığına benzer bir görüş birliği ortaya çıkmaya başlamıştır. Buna göre bir PZR tamponu; final konsantrasyonunda, 10 mM Tris (pH 8.4) , 50 mM KCl, 1.5 mM  $MgCl_2$ , %0.01 jelatin, %0.01  $NP0_4$  ve %0.01 Tween 20 içerir. Non-iyonik deterjanlar yerine %0.1'lik Triton X–100 kullanılabilir. Tuz konsantrasyonu değiştirilebilir (KCl'ü azaltmak veya ortadan kaldırmak için) ve yükseltilmiş magnezyum konsantrasyonu ile primerlerin daha iyi çalıştığı gözlenir. Ayrıca dNTP'ler ile magnezyum arasında dayanıklı etkileşimler de gözlenir. Bunun sonucunda dNTP'lerin yüksek konsantrasyonu magnezyuma bağlanır ve mevcut magnezyum konsantrasyonunu azaltır.

Bu yüzden eğer dNTP'ler yüksek konsantrasyonda kullanılıyorsa, magnezyum konsantrasyonunu arttırmak gerekebilir (45).

PZR reaksiyon tamponundaki değişiklikler efektif bir amplifikasyonu önemli ölçüde etkilemektedir. Özellikle  $MgCl_2$  konsantrasyonu amplifikasyonun gerçekleşmesinde ve spesifitesinde oldukça önemlidir. Genellikle her bir dNTP'nin 200 mM konsantrasyonunda bulunduğu bir reaksiyonda, 1.5 mM  $MgCl_2$  optimal olarak kullanılabilir. Bununla beraber bazı reaksiyonlarda, farklı  $Mg^{+2}$  miktarı da gerekebilir. Reaksiyona katılan  $Mg^{+2}$ , önemli bir enzim kofaktörü olup, sentez olayını katalize etmenin yanında, hedef dizine primerlerin bağlanmasında da ayarlayıcı rolü olan bir elemandır. Konsantrasyondaki artış başlangıçta primer bağlantısının zayıf olmasına ve yanlış eşleşmelere neden olabilmektedir. Diğer taraftan yine yüksek  $Mg^{+2}$  konsantrasyonu, zayıf reaksiyon spesifitesine, düşük  $Mg^{+2}$  konsantrasyonu ise zayıf reaksiyon etkinliğine neden olabilmektedir. Reaksiyonda kullanılacak  $Mg^{+2}$  konsantrasyonu, nükleotid konsantrasyonu gibi hesaplanmalıdır (43).

#### 2.2.1.4. Oligonükleotid Primerler

Oligonükleotidler genellikle 18–30 baz arasında sentezlenir ama daha az karmaşık olan DNA'ların (plazmidler veya daha önceden amplifiye edilen DNA'lar) amplifikasyonu için daha kısa primerler kullanılabilir (45).

Bir PZR'de başarılı bir amplifikasyon için önemli değişkenlerden biri olan primerlerin doğru tasarlanmasıdır. İyi tasarlanmış primerler arka plan ve özgül olmayan ürünlerin oluşmasını engellemeye yardımcı olur (41). Primer dizilerinin G+C içeriği, amplifiye edilecek bölgenin G+C içeriğine yakın olmalıdır. Özellikle 3' ucunda sekonder yapılar taşıyan dizilerden kaçınılmalıdır. Primerler birbirleriyle komplementer oluşturacak nitelikte olmamalıdır. 24–30 bazlık uzun primerler 60°C ve üzerindeki bağlanma sıcaklığında oldukça iyi çalışmaktadır (45).

Düşük konsantrasyonda primer kullanımı az miktarda reaksiyon ürünü elde edilmesine, yüksek konsantrasyonlarda kullanım ise düşük spesifiteye neden olur ki bu durum jelde çok farklı amplikonların tespiti ile mümkündür. Ancak yüksek primer konsantrasyonları, primer-dimer artefaktlarının oluşmasına da neden olmaktadır.

Primerlerin genellikle 0.1–0.5  $\mu\text{M}$  arasındaki derişimi en elverişli olanıdır (41). Sık aralıklarla tekrarlayan dondurup-çözdürme olmaksızın hazırlanan primerler  $-20^\circ\text{C}$ 'de amonyumlu sıvılarda uygun bir şekilde saklanabilirler (45).

### **2.2.1.5. Hedef Diziler**

Birçok farklı kaynak DNA'nın başarılı amplifikasyonu için materyal sağlayabilir. Bunun için DNA'nın amplifiye edilecek kısmının bozulmamış olması gereklidir. Bunun anlamı da parçalanmış DNA kaynağından amplifiye edilen kısımların daha kısa olacağıdır. Reaksiyon inhibitörlerinin (deterjan, EDTA, fenol kalıntısı) olmadığından da emin olmak önemlidir (45).

### **2.2.1.6. Sıcaklık ve Döngü Parametreleri**

PZR reaksiyonu için gereken 3 termal aşama ve farklı sayılardaki döngüler günümüzde birçok üretici firma tarafından üretilen ısı döngü (thermal cycler) cihazları ile gerçekleştirilmektedir (43).

PZR sırasında çift zincirli DNA molekülünün, tek zincirli hale gelmesi için denatürasyon işleminin etkili bir şekilde yapılması gerekir. Genellikle başlangıçta örneğin  $94^\circ\text{C}$  civarında 5 dakika boyunca ısıtılması başarılı bir denatürasyon için yeterlidir. Başarılı bir PZR'de primerlerin, hedef diziye bağlanabilmesi için moleküler etkileşimlerin optimize edilmesi gerekmektedir. Bu da kritik bağlanma sıcaklığına bağlıdır (46).

Denatürasyondan sonra ortam sıcaklığı  $40-60^\circ\text{C}$ 'ye düşürüldüğü zaman reaksiyon karışımındaki primerler komplementer oldukları kalıp DNA dizilerine bağlanırlar (43). Genelde yüksek bağlanma sıcaklığı, primerlerin hedef diziye daha spesifik bağlanmasında ve hedef dizinin çoğaltılmasında (amplifikasyon) oldukça önemlidir. Düşük sıcaklık ise, hedef dizi ile primer dizisi arasında daha fazla uygunsuzluğa neden olabilir ve hedeflediğimiz dizi dışındaki dizilerin non-spesifik olarak çoğaltılmasına neden olabilir. Pratikte  $55^\circ\text{C}$ 'de gerçekleştirilen bağlanma başarılı



bir PZR için uygundur. Optimal bağlanma sıcaklığı, genelde MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonu ile optimize edilir (46).

Bağlanmayı takiben ortam sıcaklığı 70–75°C'ye çıkarıldığında, primerlerin 3' ucundan itibaren kalıp DNA'nın kopyasını teşkil edecek şekilde zincir uzamaları (elongasyon) başlar (43). Uzama zamanı hedef dizini derişimine, uzunluğuna ve ısıya bağlıdır. Kalıp DNA zinciri üzerindeki primerlerin uzaması için kabul edilen en uygun ısı derecesi 72°C'dir. 1 dakikalık uzama zamanı genellikle uzunluğu 2 kb'a kadar olan ürünler için yeterli olmaktadır (41).

Optimal siklus sayısı 25–30 arasındadır, nadiren 35 siklus uygulanabilir. Bununla beraber, 35'den yüksek (40–45) siklus sayısı uygulandığında genelde ortamdaki PZR karışımını oluşturan maddelerin azalması ile birbirleriyle olan kritik dengelerin bozulmasından kaynaklanan non-spesifik ürünlerin sentezlenmesi söz konusu olabilmektedir (43).

### **2.2.2. “Hot Start” (Sıcak Başlangıç) PZR Tekniğı**

Bir PZR uygulaması sırasında yapılan temel işlem, reaksiyon bileşenlerinin (enzim, MgCl<sub>2</sub>, dNTP'ler, primerler, tampon) bir tüp içinde karıştırıldıktan sonra (mastermix) hedef DNA'nın ortama konularak, thermal cycler da PZR protokolünün tamamlanması beklenir. Tüm bu işlemler sırasında reaksiyon ortamının maruz kaldığı sıcaklık 4–25°C arasında değışir. Hedef DNA eklenip sistem termal cycler'a yerleştirilene kadar olan zaman dilimi içinde, hedef DNA ile primer arasında düşük eşleşme oranlı bir hibridizasyon meydana gelebilir. Bundan sonraki sıcaklık dereceleri 55–60°C'nin altına düşmese bile, spesifik olmayan ürünler sentezlenebilir ve bunlar reaksiyon spesifitesini önemli derecede düşürürler (46). Bu nedenle normal PZR protokolünde amplifikasyon karışımı hazırlanırken hedef DNA ve primerler arasında özgül olmayan bağlanmalar olabilmekte ve bu bağlanmaların polimeraz enzimi ile uzatılması sonucunda çok sayıda istenmeyen bant ortaya çıkabilmektedir. Bu istenmeyen reaksiyonları önlemek için geliştirilmiş olan “hot start” PZR tekniğinde, temel maddelerden (polimeraz, nükleotidler, Mg<sup>+2</sup> veya primerler) biri başlangıçta amplifikasyon tüpüne konulmamaktadır. Bu karışıma ilk denatürasyon işlemi

uygulandıktan sonra eksik olan madde eklenir ve sıcaklık normal bağlanma derecesine soğutulur. Böylece özgül primer bağlanması gerçekleşir. Bu aşamadan sonra uygulanan amplifikasyon sonucunda daha net DNA bantı elde edilmiş olur (40).

## **2.3. Amplifikasyon Ürünlerinin Analizi**

### **2.3.1. Agaroz jel elektroforezi**

Hedef bölgenin amplifikasyonundan sonra, elde edilen ürünlerin bir şekilde belirlenmesi ve analizlerinin yapılması gerekmektedir. Bu amaçla uygulanan en basit konvansiyonel yöntem agaroz jel elektroforezidir (43). Agaroz, deniz yosunlarından elde edilmiş lineer bir polimerdir. Ticari olarak elde edilen agaroz tamamen saf değildir. Polisakkarit, tuz ve proteinler ile kontamine haldedir. Bu kontaminasyonun miktarı DNA'nın jelde göçünü etkileyebilmektedir. Bu yüzden firmalar agarozun kimyasal olarak formüle edilmiş formunu satmaktadırlar (47).

Elde edilen PZR ürünlerinin fragment büyüklükleri, çalışmanın en başında bellidir. Seçilen veya dizayn edilen primerlerin hedefledikleri bölge ya literatür bilgileri ile bilinir veya ilgili mikroorganizmanın gen haritasına bakılarak bu büyüklük hesaplanır. PZR'da elde edilecek olan fragment büyüklüklerinde aynı olması gerekir. Bunun tespiti, elektriksel bir ortamda molekül ağırlığına göre ayrımının sağlandığı elektroforez metodlarıyla gerçekleştirilir. DNA negatif elektrik ile yüklü olduğundan dolayı pozitif kutba doğru göç eder. Agaroz jeli, porlu bir yapıya sahip olduğundan, elektriksel ortamda göç eden DNA fragmentlerini büyüklüklerine göre birbirinden ayırır. Jel, ya elektroforezden önce veya elektroforezden sonra Etidyum Bromid (Et-Br) gibi bir DNA boyası ile boyanır. Bu boya 312 nm dalga boyundaki UV (Ultraviole, mor ötesi) ışığı ile floresan vermektedir (43).

Bu sebeple, Et-Br ile boyanmış jel UV transilüminatöründe görüntülenir ve fotoğrafı çekilerek incelenir. İstenen büyüklükteki DNA fragmentlerinin tespit edildiği örnekler "pozitif" kabul edilir. Fragment büyüklüğü hesaplamalarında, ticari olarak temin edilebilen standard DNA molekül ağırlığı kullanılmaktadır (43).

### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

#### **3.1. Hasta grubu serum örneklerinin toplanması**

Çalışmanın hasta grubunun serum örneklerinin, Mersin ilindeki bir hemodiyaliz merkezinde tedavi gören ortalama yaş grubu 49.43 olan 68'i erkek, 32'si bayan olmak üzere 100 hastadan toplandı.

#### **3.2. Kontrol grubu serum örneklerinin toplanması**

Kontrol grubunun serumları ise Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Kan Merkezine kan vericisi olarak başvuran ortalama yaş grubu 36.43 olan, parenteral taşınan hastalıklar bakımından hiçbir risk faktörüne sahip olmayan ve donör tarama testleri negatif toplam 120 sağlıklı bireyden (2'si bayan, 118'i erkek) elde edildi.

Hasta ve kontrol grubundan yaklaşık 10 ml kadar kan örneği alındı. Serum kısmının ayrılması için kan örnekleri 5.000 devir/dakika (d/d)'da 3 dakika santrifüj edildi. Tüpün üst kısmından toplanan serumlar çalışılincaya kadar -80°C'de saklandı.

#### **3.3. Kullanılan Araç ve Gereçler**

##### **3.3.1. Kullanılan Cihazlar**

- PZR cihazı (Thermal Cycler, Eppendorf Mastercycler)
- Güvenlik Kabini (Heraeus-HERA safe)
- Elektroforez Güç Kaynağı (Biometra P30)
- Elektroforez Tankı (Agagel Mini Biometra)
- Jel Görüntüleme Sistemi (Vilber Lourmat Marne La Vallée, France)
- Soğutmalı Mikrosantrifüj (Hettich- Universal 32 R)

- Mikrodalga Fırın (Beko- MD 1500)
- Derin Dondurucu (Uğur)
- Etüv (Memmert)
- Otoklav (Nüve- OT 020)
- Hassas Terazı (Scaltec)
- Buz Dolabı (Indesit)
- Vortex (NM- 110)
- Su Banyosu (Memmert)
- Distile su cihazı (Nüve NS 108)
- Mikropipet Seti (Gilson- PİPETMAN- P 10-P100-F1000)

### **3.3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler**

- Tris-Hidroklorid (Sigma T- 5941, Lot 31 K5466)
- Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA), sodium salt (Lachema- 302430300, cat nr 30354)
- Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Merck- L51736210)
- Tris-baz (Sigma-Aldrich-T8937)
- Borik asit (Merck- K29935665 204)
- Gel Star (FMC Bioproducts # 50535)
- Brom fenol mavisi (SCP Science-B7722)
- Sükroz (Merck-1.07651)
- Etanol absolut (Riedel- deHaän/ 32221)
- Fenol (Merck- S3971900 349)
- Kloroform (Merck- K28735331 107)
- Agaroz (Sigma- A-9539 lot 013K0008)
- Taq DNA Polimeraz (Promega-M1665)
- 10X PCR Buffer (Mg Free) (Promega M190G)
- 5 mM MgCl<sub>2</sub> (Promega- A351H)
- 10 mM dNTP Mix (Sigma-Deoxynucleotide set DNTP-100)

- Proteinaz K (Sigma- P 2308)
- 100 bç Marker (100 bp DNA Step Ladder) (Promega- G6951)
- Distile Su
- DNase, RNase Free Su
- Primerler

SEN Virus genotip D için:

*Sense:* D10S (5'-GTAACCTTTGCGGTCAACTGCC-3')

*Antisense:* L2AS (5'-CCTCGGTTKSAAAKGTYTGATAGT-3')

SEN Virus genotip H için:

*Sense:* C5S (5'-GGTGCCCTWGTYAGTTGGCGGTT-3')

*Antisense:* L2AS (5'-CCTCGGTTKSAAAKGTYTGATAGT-3')

(W: A veya T, Y: C veya T, M: A veya C, K: G veya T, S: C veya G)

### 3.3.3. Kullanılan Tampon Çözeltiler

#### 3.3.3.1. DNA Saflaştırılması (ekstraksiyonu) İçin Kullanılan Solüsyonlar

##### Lysis Buffer (100 ml için)

(10mM Tris/HCl pH 8; 5mM EDTA, % 0.5 SDS)

- Tris-HCl.....0.209 gr.
- EDTA.....0.249 gr.
- SDS.....0.67 gr.
- Tartılan kimyasal maddeler 50 ml distile su ile eritildi.
- pH'sı 8.0'a ayarlandı.
- 100 ml'ye distile su ile tamamlandı.

- Oda ısısında muhafaza edildi.

### **1:1 Fenol-Kloroform**

- Kristalize fenol su banyosunda eritildi.
- Bir kısım kloroform, bir kısım sıvı hale getirilmiş fenol ile karıştırıldı.
- + 4°C’de koyu renkli şişelerde muhafaza edildi.

### **Proteinaz-K (100mg/ml)**

- Hazır olarak alınan liyofilize 100 mg Proteinaz-K (Sigma)
- 1 ml steril distile su ile çözülerek 100 mg/ml’lik konsantrasyona getirildi.
- 50 µl’lik porsiyonlara ayrıldı.
- -20°C’de saklandı.

### **3.3.3.2. Elektroforez için Kullanılan Solüsyonlar**

#### **10X TBE (Tris-Borik asit-EDTA) Stok Solüsyonu pH 8.8**

- Tris Base.....108 gr.
- Borik Asit.....55 gr.
- EDTA.....8.3 gr.
- Distile su ile eritildi ve pH’sı 8.8’e ayarlandı.
- Distile su ile 1 litre’ye tamamlanarak çözüldü.
- Oda ısısında muhafaza edildi.

### **Elektroforez Yürütme Tamponu (1XTBE)**

- 10X TBE Buffer stok solüsyonundan distile su ile seyreltilerek hazırlanmış olan 1X TBE tamponu elektroforez yürütme tamponu olarak elektroforez tankına konularak kullanıldı.

### **Yükleme Tamponu (20 ml için)**

- Sükroz.....4 gr.
- Brom fenol mavisi.....0.05 gr.
- Tartılan kimyasallar 20 ml 1XTBE tamponunda eritildi.
- Oda ısısında saklandı.

### **% 2 Agarose Gel Solüsyonu**

- 30 ml 1X TBE Buffer içerisinde 0.6 g agaroz mikrodalga fırında eritildikten sonra Gel Star ilave edildi.

### **3.4. DNA ekstraksiyonu**

Serum örneklerinden DNA saflaştırılması; modifiye klasik fenol-kloroform ve kloroform yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi (48).

Bu yöntemin anahtar basamağı, fenol-kloroform ve kloroform ile nükleik asitin sıvı fazda proteinlerden ayrılmasıdır. Proteinlerin parçalanarak ayrılmasında organik solventler ile ekstraksiyondan önce, genellikle pronaz veya proteinaz K gibi proteolitik enzimler kullanılır.

Nükleik asit ile proteinlerin ayrılmasında standart yol, öncelikle fenol-kloroform ile daha sonra da kloroform ile ekstraksiyondur. Bu prosedürün avantajı; iki organik çözücüden birinin kullanılması yerine, ikisinin kullanılarak deproteinizasyonun daha etkili bir şekilde yerine getirilmesidir. Ancak, fenol proteinleri etkili bir şekilde denatüre

etmesine rağmen, RNAase aktivitesini tamamen inhibe etmez. Nükleik asitlerin konsantre edilmesi için kullanılan yöntem genellikle, etanol ile çöktürmedir. Nükleik asitlerin bu çöktürme işlemi; monovalan katyonların konsantrasyonunu azaltmak için uygulanır. Presipite olan nükleik asit santrifüj işleminden sonra uygun tampon sıvıda veya distile suda, eğer gerekiyorsa uygun konsantrasyonda tekrar çözündürülür (48).

Bizim yaptığımız bu çalışmada; Proteinaz K'nın varlığında hücreler parçalandı. Organik ekstraksiyonla (fenol-kloroform), DNA biyolojik materyallerden uzaklaştırıldı. Daha sonra da DNA etanol ile çöktürüldü.

#### **3.4.1. DNA ekstraksiyonun yapılışı**

- 1.5 ml'lik steril eppendorf tüpüne, 100 µl serum örneği kondu.
- Serum örneği üzerine 300 µl lysis tamponu (10mM Tris/HCl pH 8.0; 5mM EDTA, % 0.5 SDS) + 1 µl Proteinaz-K (100mg/ml) ilave edip vortekslendi.
- Bu karışım, 56°C'lik su banyosunda bir gece boyunca inkübe edildi.
- Bu karışım üzerine 800 µl fenol-kloroform ilave edildi. İyice alt üst edip +4°C'de 30 dakika bekletildi.
- Bu süre içinde tüpler zaman zaman alt üst edilerek karıştırıldı.
- Tüpler 12.000 xg'de 15 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant kısmı (üstteki berrak kısım) alınarak yeni steril bir tüpe aktarıldı.
- Yeni tüpe alınan süpernatant üzerine, süpernatantın 2 katı hacimde olacak şekilde kloroform ilave edildi. Alt üst ederek +4°C'de 30 dakika bekletildi.
- Bu süre içinde tüpler zaman zaman alt üst edilerek karıştırıldı.
- Tüpler 12.000 xg'de 15 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant kısmı alınıp yeni steril bir tüpe aktarıldı.
- Süpernatant üzerine 1 ml soğuk absolüt etanol ilave edildi.
- Yavaşça alt üst edip -20°C'de gece boyunca bekletildi.
- Ertesi gün tüpler 12.000 xg'de 15 dakika santrifüj edildi.
- Tüpün dibindeki nükleik asit pellet kısmına zarar vermeden üst kısmı dikkatlice uzaklaştırıldı.



- Tüpler temiz kağıt havlular üzerine ters olarak koyarak 10 dakika bekletilerek kurutuldu.
- Pellet 20 µl steril distile su ile yavaş hareketlerle pipetaj yaparak çözdürüldü.

Hazırlanan ekstrakt çalışılncaya kadar –20°C’de saklandı.

### **3.5. Moleküler Analiz**

#### **3.5.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Uygulaması**

PZR, tek bir molekül DNA’yı bile çoğaltabileceği için, reaksiyon karışımlarının DNA molekülleri ile kontamine olmasının engellenmesi gerekmektedir. Bu kontaminasyon, daha önceki PZR reaksiyonu, eksojen DNA veya diğer hücrel materyallerden kaynaklanıyor olabilir. Bu nedenle kullanılan sarf malzemeleri ve solüsyonların steril olmasına dikkat edildi ve reaksiyon bileşenleri ekstraksiyon işleminin yapıldığı kabinden ayrı temiz bir kabinde hazırlandı. PZR reaksiyonunda ısı iletiminden kaynaklanabilecek sorunların en az düzeye indirilmesi için, ince duvarlı DNase ve RNase enzimlerinden arındırılmış steril 0.2 µL’lik PZR tüpleri (Axygen Thin-Walled PCR Tubes) kullanıldı. Reaksiyonun gerçekleştirilmesi için de thermal cyclers cihazı ile 0.5–10 µL, 10–100 µL ve 50–200 µL’lik otomatik pipetler kullanıldı.

SENV-D ve SENV-H genotiplerinin DNA’sı suş spesifik primerleri kullanarak modifiye PZR belirlendi. Çalışmada kullanılan primerler, Umemura ve ark., ile Kojima ve ark.,’nın yaptığı araştırma makalelerinden seçildi (8, 13). SEN virus D genotipinin tespiti için D10S primeri ve L2AS primeri (Çizelge–3.1 ve 3.2) kullanıldı. SEN virus H genotipinin tespiti için C5S primeri ve L2AS (Çizelge–3.1 ve 3.2) antisense primeri kullanıldı.

Sense primer dizisi	Antisense primer dizisi	PZR ürünü
D10S (5'-GTAACCTTTGCGGTCAACTGCC-3')	L2AS (5'- CCTCGGTTKSAAAKGTYTGATAGT-3')	SENV-D 222 nt 1322–1544
C5S (5'-GGTGCCCTWGTYAGTTGGCGGTT-3')	L2AS (5'- CCTCGGTTKSAAAKGTYTGATAGT-3')	SENV-H 229 nt 1271–1500

**Çizelge 3.1:** SEN-V genotiplerinin PZR ile belirlenmesinde kullanılan primerler (W: A veya T, Y: C veya T, M: A veya C, K: G veya T, S: C veya G)

Genotipler	Primerler	GenBank erişim numarası	Nükleotid sayısı (nt)
SENV-D	D10S	AX 025730	1322–1342
	L2AS		1521–1544
SENV-H	C5S	AX O25838	1271–1294
	L2AS		1477–1500

**Çizelge 3.2:** SEN-V genotiplerinin belirlenmesinde kullanılan primerlerin erişim numaraları (17).

'Hot start' amplifikasyonu reaksiyonda kullanılan temel bileşiklerden biri olan primerlerin tüp sıcaklığı 65°C'ye yükseldikten sonra karışıma ilave edilmesi ile gerçekleştirildi. Böylece non-spesifik bağlanma ihtimali azaltıldı.

Çalışmanın fizibilitesi ve uygulamadan kaynaklanabilecek hataları en az tutmak için her çalışmada 10 örnek alınıp SENV-D ve SENV-H beraber bakılmıştır. SENV-D ve SENV-H'nin PZR reaksiyon karışımları ve reaksiyon şartları aynı şekilde uygulanmıştır. Her bir örnek için PZR karışımı Çizelge-3.3'deki gibidir.

	<b>SENV-D</b>	<b>SENV-H</b>
Reaksiyon Bileşenleri	Kullanılacak Miktar ( $\mu$ l)	Kullanılacak Miktar ( $\mu$ l)
Distile Su	23.65	23.65
10X PCR Buffer	5	5
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	5	5
dNTP Mix (10 mM)	1	1
Taq DNA Polimeraz	0.35	0.35
DNA örneği	10	10
Primer Karışımı ( $\mu$ l)		
Primer 1 (Forward) (100pmol/ $\mu$ l)	0.5	0.5
Primer 2 (Reverse) (100pmol/ $\mu$ l)	0.5	0.5
Distile Su	4	4
SENV-D için; Primer 1 Primer 2	D10S (5'-GTAACCTTGCGGTCAACTGCC-3') L2AS (5'-CCTCGGTTKSAAAKGTYTGATAGT-3')	
SENV-H için; Primer 1 Primer 2	C5S (5'-GGTGCCCTWGTYAGTTGGCGGTT-3') L2AS (5'-CCTCGGTTKSAAAKGTYTGATAGT-3')	
W: A veya T, Y: C veya T, M: A veya C, K: G veya T, S: C veya G		

**Çizelge 3.3:** SENV-D ve SENV-H'nin PZR reaksiyon karışımları.

Oluşturulan bu PZR karışımı vortekste karıştırıldıktan sonra, her bir örneğe ait ve üzerlerinde numaraları yazılı steril 0.2  $\mu$ l'lik PZR tüplerine 35'er  $\mu$ l konuldu. Daha sonra üzerine 10  $\mu$ l DNA örneği konulup cihaza yerleştirildi. Isı 65°C'nin üzerine çıktıktan sonra termal cycler'in kapağı açılıp tüpler cihazda iken tüplerin üzerine hazırlanan primer karışımları hızlıca ilave edildi. Tüplerin kapakları yeniden kapatılıp, cihazın kapağı geri kapatıldı.

SENV-D ve SENV-H için thermal cycler cihazında PZR koşulları Çizelge-3.4'deki gibi uygulanmıştır.

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Döngü Sayısı
Ön ısıtma (Başlangıç denatürasyonu)	94	5	1
Denatürasyon	94	1	40
Primer bağlanması (Annealing)	60	1	
Zincir uzaması (Elongasyon)	72	1	
Son uzama (Post elongasyon)	72	10	1
Muhafaza	4	∞	∞

**Çizelge 3.4:** Uygulanan amplifikasyon sıcaklık ve süreleri.

İşlem bittikten sonra, örnekler elektroforez uygulanmak üzere +4°C'deki buzdolabına kaldırıldı.

### 3.5.2. Agaroz Jel Elektroforez İşlemi

PZR'da amplifiye edilen gen bölgelerinin uzunluğunu saptamak için agaroz jel elektroforez tekniği kullanıldı. Hazırlanan jelde yürütülen DNA'ların uzunlukları, büyüklükleri belli (100–1000 bp) DNA fragmentleri ihtiva eden moleküler ağırlık standartı ile kıyaslanarak saptandı.

Tank tamponu olarak TBE (Tris-Borik asit-EDTA), 10X konsantre stok solusyon şeklinde hazırlandı. Daha sonra 1X olacak şekilde sulandırıldı ve hem tankta hem de agaroz jelin hazırlanması sırasında kullanıldı.

#### 3.5.2.1. Agaroz jelin hazırlanması

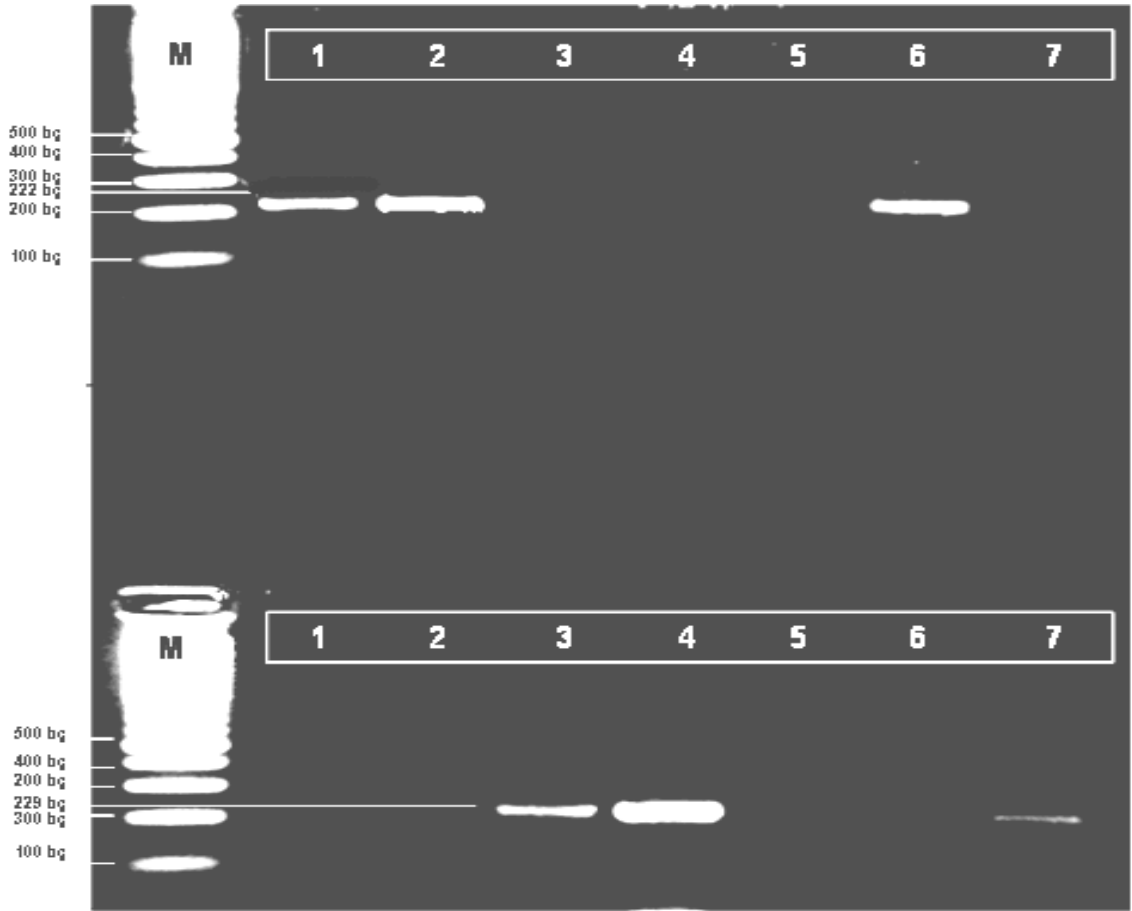
Bir balon jodede 0.6 gr agaroz 30 ml 1X TBE solüsyonu içerisinde mikrodalga fırında homojen şeffaf hale gelinceye kadar ısıtıldı. Buhar çıkması durduktan sonra Gel Star (FMC Bioproducts # 50535)'dan 3 µl eklendi. Erimiş haldeki Gel Star ile karıştırılmış jel tarakların yerleştirildiği jel tepsisine yavaşça döküldü. Dökme işlemi

esnasında jel içinde hava kabarcıklarının kalmamasına dikkat edildi. Yaklaşık 30 dakika boyunca soğumaya bırakılan jel, soğuma esnasında Gel Star'ın ısı ve sıcaktan çabuk etkilenmesi ve aktivitesini yitirmesi nedeniyle, gün ışığından korundu. Katılaşana kadar (25–30 dk) oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra elektroforez tankına yerleştirilerek PZR örneklerinin yüklenmesine hazır hale getirildi.

Daha önceden PZR işlemi yapılmış olan buzdolabındaki örneklerden 5'er µl alınarak parafilm üzerinde 2 µl 1XTBE ile hazırlanmış yükleme tamponu (%20 süktroz veya gliserol, % 0.25 brom fenol mavisini) ile iyice karıştırıldı. Daha sonra da elektroforez tankına yerleştirilen jelin kuyucuklarına sırasıyla yüklendi. Tankın kapağı kapatıldıktan sonra güç kaynağı çalıştırıldı. Kullanılan mini tank için 30mA akım verilerek elektrik akımı geçmesi sağlanarak örnekler 30–40 dakika boyunca yürütüldü. Yükleme tamponunda bulunan brom fenol mavisinin göçü takip ederek jelin 2/3'lük kısmına ulaştığında elektroforez durduruldu. Jeli tanktan çıkararak 312 nm dalga boyunda ışık veren UV-transilüminatöründe incelendi ve jel görüntüleme sisteminde (Vilber Lourmat Marne La Vallée, France) kayıtları yapıldı.

### 3.5.3. SEN-V genotip D ve SEN-V genotip H'nin varlığının tespiti

Agaroz jel elektroforez işleminden sonra, 200 ve 300 bç'lik DNA moleküler ağırlık standardının arasında yer alan bantlar gözlenmiştir. SENV-D'ye spesifik primerlerin kullanıldığı reaksiyon tüplerinin elektroforezinde yaklaşık 222 bç hizasında bulunan bantlar SENV-D genotipi olarak değerlendirilmiştir. SENV-H'ye spesifik primerlerin kullanıldığı reaksiyon tüplerinin elektroforezinde ise yaklaşık 229 bç hizasında bulunan bantlar SENV-D genotipi olarak değerlendirilmiştir (Şekil-3.1).



**Şekil 3.1:** PZR yöntemi ile belirlenen SENV-D ve SENV-H genotiplerinin, %2'lik agaroz jel elektroforezi ile gösterilmeleri. (Kolon M: 100 bç'lik DNA moleküler ağırlık standartı/DNA step ladder; Kolon 1 ve 2: yukarıda 222 bç'lik SENV-D pozitif, altta SENV-H negatif örnekler; Kolon 3 ve 4: yukarıda SENV-D negatif, altta 229 bç'lik SENV-H pozitif örnekler; Kolon 5: yukarıda SENV-D ve aşağıda SENV-H negatif örnek; Kolon 6: yukarıda 222 bç'lik SENV-D pozitif, altta SENV-H negatif örnek; Kolon 7: yukarıda SENV-D negatif, altta 229 bç'lik SENV-H pozitif örnek)

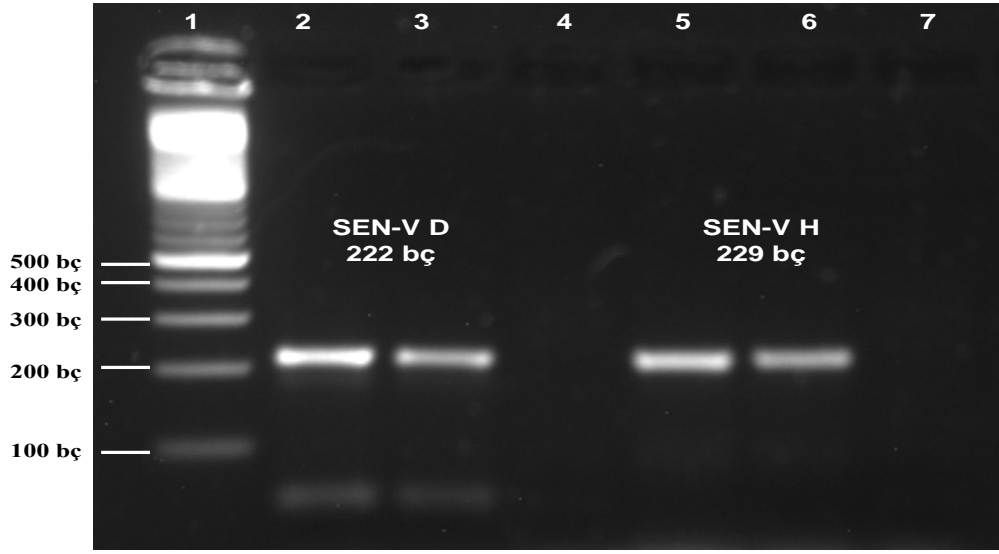
## 4. BULGULAR

Yaptığımız bu çalışmada hemodiyaliz ile tedavi edilen 100 hastadan toplanan serum örneklerindeki SENV-D ve SENV-H viremisi PZR tekniği ile araştırıldı. Sağlıklı kan donörlerinden elde edilen 120 serum örneği kontrol grubu olarak kullanıldı. Hemodiyaliz ile tedavi edilen hastalarda; SEN-V viremisinin prevalansı %55 (55/100), SENV-D viremisinin prevalansı %33 (33/100), SENV-H viremisinin prevalansı %22 (22/100) olarak saptandı. Kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edilen kan donörlerinde, SEN-V viremisinin prevalansı %25 (30/120) olarak saptandı. Yine kontrol grubunda SENV-D viremisinin prevalansı %5 (6/120), SENV-H viremisinin prevalansı %20 (24/120) olarak saptandı (Çizelge-4.1).

Çalışma grupları	Toplam sayı	SENV-V pozitif sayı (%)	SENV-D pozitif sayı (%)	SENV-H pozitif sayı (%)
Hasta grubu	100	55 (%55)	33 (%33)	22 (%22)
Kontrol grubu	120	30 (%25)	6 (%5)	24 (%20)

**Çizelge 4.1:** Hasta ve kontrol grubunda SEN-V enfeksiyonunun prevalansı

PZR yöntemi ile çoğaltılan yaklaşık 222 bç hizasındaki SENV-D genotipi ile yaklaşık 229 bç hizasındaki SENV-H genotipinin agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü Şekil-4.1’de gösterilmektedir.



**Şekil 4.1:** PZR yöntemiyle belirlenen SENV-D ve SENV-H DNA'sının, %2'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü.

- 1 nolu kolon; 100 bç'lik DNA step ladder (moleküler ağırlık standartı),  
2 ve 3 nolu kolon; SENV-D primer çifti ile çoğaltılan 222 bç'lik SENV-D pozitif örnek,  
4 nolu kolon; SENV-D negatif örnek,  
5 ve 6 nolu kolon; SENV-H primer çifti ile çoğaltılan 229 bç'lik SENV-H pozitif örnek,  
7 nolu kolon; SENV-H negatif örnek

#### 4.1. İstatistik analiz

Çalışmanın bulguları istatistik analiz ile değerlendirilmiştir. MINITAB 13.0 sürümlü programda hasta ve kontrol grubunun pozitiflik ve negatiflik oranlarının karşılaştırılması yapılmıştır. SENV-D pozitiflik oranları hasta ve kontrol grubunda farklı olarak bulunmuştur ( $P < 0.05$ ). SENV-H pozitiflik oranları hasta ve kontrol grubunda farklı olarak bulunmamıştır ( $P > 0.05$ ).



## 5. TARTIŞMA

SEN-V varyantlarının ilk çalışmaları Primi tarafından (Dia Sorin, İtalya) yönetilmiştir. SEN-V suşlarının (A, B, C, D, E, F, G, H, I) prevalansı ve total SEN-V olarak gösterilen ortak bir dizinin prevalansını, çeşitli donör ve hasta popülasyonlarında araştırmıştır. Yapılan bu çalışmalarda; SENV-D ve SENV-H'in non A-E hepatit vakalarında yüksek oranda bulunduğu gösterilmiştir. Bu nedenle sistematik araştırmalarda transfüzyon yapılan ve yapılmayan gruplarda SENV-D ve SENV-H'nin araştırılması üzerine yoğunlaşmıştır (8). Biz de yapmış olduğumuz bu çalışmada, sadece SENV-D ve SENV-H'ye yönelik primerleri kullanarak hasta ve donörlerdeki prevalansı araştırdık.

Yapmış olduğumuz bu çalışmada, hemodiyaliz ile tedavi edilen hastalar arasında SENV-D ve SENV-H prevalansını belirledik. Hemodiyaliz ile tedavi edilen hastalardan sağlanan 100 serum örneği PZR metodu ile incelendi. SEN-V bu serum örneklerinin %55 (%33'ü SENV-D ve %22'si SENV-H)'inde belirlenmiştir. Kontrol olarak çalışmaya dahil edilen 120 sağlıklı kan donöründeki prevalans %25 (%5'ü SENV-D ve %20'si SENV-H) olarak belirlenmiştir. Hemodiyaliz ile tedavi edilen hastalardan elde edilen sonuç sağlıklı kan donörlerinden elde edilen sonuç ile karşılaştırıldığında, hemodiyaliz ile tedavi edilen hastalardaki SENV-D pozitiflik oranları hasta ve kontrol grubunda farklı olarak bulunmuştur ( $P<0.05$ ), SENV-H pozitiflik oranları ise hasta ve kontrol grubunda farklı olarak bulunmamıştır ( $P>0.05$ ).

SEN-V suşları kan transfüzyonu ile ilişkili hepatitlerde olduğu gösterilen yeni keşfedilen bir grup virusları oluşturmaktadır. Bu suşların kronik karaciğer hastalığı veya transfüzyon altındaki popülasyondaki potansiyel rolü henüz tam olarak açıklanmamıştır. Biz bu çalışmayla; Mersin ilinde sürekli transfüzyon altındaki hemodiyaliz ile tedavi edilen hastalarda SEN-V'un iki suşunun kontrol grubuna göre oldukça yaygın olduğunu tespit ettik. Bunu da uzun süre damar yolundan injeksiyonla ilaç ve kan transfüzyonu almaları ile ilişki olabileceğini düşünmekteyiz. Buradan SEN-V'un perkutanöz kan transfüzyonu ile taşınabileceğini söyleyebiliriz.

Çalışmamıza kontrol grubu olarak dahil ettiğimiz serumları; transfüzyonla taşınan hastalıklar için risk altında olmadığını düşündüğümüz, gönüllü kan

donörlerinden temin edildi. Bu grupta tespit ettiğimiz %25 SEN-V (%5'ü SENV-D ve %20'si SENV-H) prevalans oranını çok düşük bir oran olmadığı için, özellikle SENV-H pozitiflik oranları hasta ve kontrol grubunda benzer oranlarda olması sebebiyle bu virusun taşınmasında parenteral yol dışında başka yolların da etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Daha önceden Schröter ve ark., tarafından yapılan bir çalışmada, TTV'da olduğu gibi SENV-H'nin de klinik bir hastalığa neden olmaksızın konakla kommensal bir ilişkisinin kanıtlanabileceği bildirilmiştir. Araştırmacılar bunu, SENV-H viremik hastalarda hepatitin klinik ve biyokimyasal bulgularının gelişmemesine bağladıklarını bildirmişlerdir (12).

A-E hepatit viruslarının keşfinden sonra; ilave hepatit ajan(lar)ının olabileceği çeşitli ifadelerde belirtilmişti. Bunlar kesin olmayan bir şekilde non A-E hepatit olarak gösterilmişlerdir. Bilinen hepatit viruslarının hepsi için negatif test edilen; toplumdan kazanılmış hepatit vakaları ve transfüzyon ilişkili hepatit vakalarının %10-20'si, kriptojenik kronik karaciğer hastalığı, siroz, hepatit ile ilişkili aplastik anemi vakalarının çoğu ve fulminant hepatit vakalarının büyük bir oranını, içeren vakaların yaklaşık %30'unda göz önünde bulundurulmayan hepatit ajanlarının bir veya daha fazlasının varlığı ifade edilmiştir. Bu gözlemlerle özellikle endüstri zincirindeki birçok araştırmacı viral keşif programlarına yüklenmişlerdir. Bu da sırasıyla; HGV ve TTV'ların keşiflerine izin vermiştir. Bu ajanların hiçbiri non A-E hepatitin nedeni olarak ispatlanamamıştır. Yakın zamanlarda SEN-V tanımlanmış ve SANBAN, YONBAN ve TUS01'i içeren TTV'un dahil olduğu *Circoviridae* ailesi genişlemiştir. Fiziksel karakterizasyon ve filogenetik analizler şimdilerde, TTV, SANBAN, YONBAN, TUS01 ve SEN-V'un, *Circoviridae* ailesinin bütününe oluşturduğunu göstermektedir (8).

SENV ve TTV varyantlarının sayısı Japonya'da, İtalya'da ve Amerika Birleşik Devletleri'nde yönetilen araştırmalara bağlı olarak genişlediği için insan circovirusların süper ailesinde bu geniş varyantların açık hale geldiği bildirilmiştir (8).

Son birkaç yıldan beri yeni virus tespiti için kullanılan moleküler biyolojik metodlar; parenteral taşınan ve hepatit ile ilişkili yeni virusların keşfine izin vermiştir. Ancak bunlardan HGV ve TTV'un daha sonraları hepatit ile ilişkileri doğrulanamamıştır ve bu iki virusun hemodiyaliz hastaları arasında prevalanslarının çok

yüksek olmadığı bildirilmiştir. Bu yüzden de HGV veya TTV viremik hastalarının ayrı makinelerde diyalizinin önerilmediği belirtilmiştir (12).

Ayrı diyaliz makinelerinin kullanımı nozokomiyal yayılımının önlenmesi için HCV ile infekte bireylerde önerilmektedir. Genel popülasyonda HGV ve TTV'un her ikisinin yüksek prevalansı ve şüpheli klinik etkisi nedeniyle bu güne kadar ayrı makinelerin kullanılması için önerilerde bulunulmadığı bildirilmektedir (12).

Viral keşifde moleküler yaklaşımların gelişmişliği ve sensitivitesi yeni virusların keşfedilmesinin devamını sağlayacağı belirtilmiştir. Hepatit arenasında yalnız başına son 10 yılda HGV, TTV, SANBAN, YONBAN ve SEN-V'u içeren circovirusların genişleyen ailesinin bağımsız keşifleri görülmektedir. Relatif olarak hastalığın görüldüğü infekte bireylerin düşük oranı ve relatif olarak etkenin prevalansının yüksek olduğu zaman virusların nedensel ilişkisini ortaya koyma metotları çok zor hale gelmektedir. Bu nedenle; HGV veya TTV'un hiçbir hastalıkla ilişkisinin bulunamadığı bildirilmiştir (8, 7).

Bugünkü yaygın ve geçerli çalışmalar SEN-V ile ilişkili bir hastalığı hala ileri sürmekte; fakat yukarıda tanımlandığı gibi bu açıklamaları kısıtlayan durumlar bulunmaktadır. Moleküler amplifikasyon ve klonlama tekniklerinin sensitivitesi ile bu virusun, normal flora üyesi olarak bulunan bakteriler gibi organizmada zararsız olarak bulunduğu ileri sürülmektedir. Bu organizmaların patojenik olmayabilecekleri veya sadece edinsel immun yetmezlik gibi özel durumlar altında patojenik olabilecekleri belirtilmiştir (8).

SEN-V ve *Circoviridae* ailesindeki birçok grubun patojenitesi daha ispatlanmamıştır, fakat bunların identifiye edilmedikleri hastalıklarla ilişkilerinin olabileceği veya onların konakta homeostasisi sağlamakta bazı faydalı rolleri olan kommensal organizmalar olarak görev yapabilecekleri belirtilmektedir (18).

Moleküler buluşlar genellikle Koch Postulatları'nın gereğini yerine getirememektedirler. Bunun sonucunda moleküler çağın gereksinimlerini karşılayacak yeni nedenlerin ortaya konulmasına ihtiyaç duyulmuştur. SEN-V'un bu zamanda patojenik skalada yerini ortaya koymak zordur. Fakat SEN-V ve insan circoviruslerinin yeni süperailisinin; transfüzyon ile taşınan ve persistan kalan infeksiyonun gelişmesine neden olabilen yeni infeksiyöz ajanlar olduğu ifade edilmiştir (8).

Amerika Birleşik Devletleri'nde kan transfüzyon alıcıları arasında SENV-D ve SENV-H prevalansı %30, kontrol grubunda ve kan donörleri arasında %2–3 olarak bildirilmiştir. Transfüzyon üniteleri arttıkça prevalansın arttığı ifade edilerek SEN-V sekans homolojisinin donör–alıcı zincirinde gösterildiği bildirilmiştir (31).

Damar içi injeksiyonla ilaç kullananlarda SENV-D prevansının %32.7, SENV-H prevalansının da %37.5 olarak bulunduğu bildirilmiştir (31, 33).

Almanya'da parenteral taşınan hastalıklar için risk altında olan bireylerde yapılan bir çalışmada, HIV ile infekte bireylerin %44.4'ünde SENV-H viremisinin yüksek oranının gözlemlendiği bildirilmiştir. Damar içi ilaç kullananlarda ise SENV-H viremisinin oranını %23 olarak bildirmişlerdir. Kontrol olarak çalışmalarına dahil ettikleri kan donörlerindeki (%16.8) prevalanstan oldukça yüksek bulduklarını ifade etmişlerdir (4).

San Francisco'da yapılan bir çalışmada injeksiyonla ilaç kullananlarda yapılan çalışmada SENV-A %47.5, SENV-C/H %35.6 ve SENV-D %10.3 oranında bildirilmiştir. İnfeksiyon uzun süre injeksiyonla ilaç kullanımıyla ilişkilendirilmiş ve SEN-V suşlarının San Francisco'nun Bay eyaletinde yaygın olarak bulunduğunu belirtmişlerdir (33).

Çalışmamızın hasta grubunu oluşturan hemodiyaliz ile tedavi edilen hastaları transfüzyon altındaki popülasyon içinde değerlendirdiğimizde bulduğumuz %33 SENV-D oranı ve %22 SENV-H oranı, yukarıda yapılan çalışmalarda transfüzyon altındaki popülasyon içinde değerlendirilen injeksiyonla ilaç kullananlarda yapılan çalışmaların sonuçları ile oldukça uyumludur.

Kan kaynaklı viruslarla infeksiyon riski altındaki popülasyonlarda SENV-D/H prevalansı çoğunlukla bilinmemektedir. Taiwan'daki sağlıklı donörlerde PZR metodu kullanarak SENV-D/H DNA'sını Kao ve ark., (10) %15 olarak, Dai ve ark., (49) %24.2, Huang ve ark., (50) ise %51 olarak tespit etmişlerdir. SEN-V prevalansının Shibata ve ark., (9) tarafından Japonya'daki sağlıklı kan donörlerinde %10, Umemura ve ark., (8) tarafından Japonya'da sağlıklı kişilerde %20, İtalya ve Amerika'daki sağlıklı kan donörlerinde ise %2 oranında bulunduğu bildirilmiştir. Kanada'lı sağlıklı bireylerde %39 (29, 17), Japonya'daki gebe kadınlarda %27 olarak saptandığı bildirilmektedir (17). Ayrıca Yoshida ve ark., Japonya'da SEN-V DNA'sının tespitinde başka primerlerin kullanıldığı başka bir metotta sağlıklı erişkinlerdeki oranın yaklaşık %75'e çıktığını

bildirmişlerdir (27, 17). Bizim kontrol grubu olarak seçtiğimiz sağlıklı kan donörleri arasında SEN-V prevalansı %25 olarak saptanmıştır. Bizim çalışmamızda bulduğumuz bu oran; Taiwan'daki bazı araştırmacıların bulunduğu sağlıklı kişilerdeki SEN-V oranına yakın olup, Japonya, İtalya ve Amerika'dan oldukça yüksek, Kanada'lı bireylerdeki orandan ise oldukça düşüktür. Bizim çalışmamızın bulgularına göre sağlıklı kan donörlerinin %5'i SENV-D, %20'si SENV-H ile infekte olarak bulunmuştur. Bu bulgular Türkiye'de Mersin ilinde sağlıklı bireylerin de SEN-V ile infekte olduğunu göstermektedir ve bu bireylerden kan transfüzyonu ile diğer bireylere bulaş riski bulunmaktadır. Virusun patojenitesi tam bilinmediğinden özellikle immun direnci düşük hastalarda bunun önemli olabileceğini düşünmekteyiz.

Ülkemizde Elazığ ilinde sağlıklı 180 çocukta yapılan bir çalışmada 25'inde (%14) SENV-D'ye, 15'inde (%8.3) SENV-H'ye rastladıklarını bildirmişler (38). Bizim çalışmamızın kontrol grubunu oluşturan sağlıklı populasyon olarak değerlendirilen kan donörlerinde bulduğumuz %5 SENV-D ve %20 SENV-H sonucuna benzememekle birlikte, Elazığ ilinin %22.3'lik SEN-V prevalans oranı ile sonuçların yakın olduğunu söyleyebiliriz. Biz kendi çalışmamızda SENV-H'nin daha yaygın olduğunu gösterdik. Ancak biz çalışmamızda aynı ülkenin 2 farklı şehrinde SENV-D ve SENV-H oranlarının birbirinden oldukça farklı dağılıma sahip olduğu gösterdiğimizi de söyleyebiliriz. Ancak dünyanın diğer başka ülkelerinden (Taiwan, Japonya) (49, 51, 52) SENV-D'nin, SENV-H'den daha yaygın olduğunu gösteren birçok çalışma vardır. Bu sonuçlar ile SEN-V varyantlarının ülke ve dünya çapında farklı coğrafik dağılıma sahip olduğunu söyleyebiliriz. Zaten yapılan son çalışmalarda da coğrafik bölgelere göre prevalansının değişebileceği belirtilmektedir (3).

Yine Ülkemizde Çukurova bölgesinde Serin ve ark., tarafından yapılan bir çalışmada hasta grubu olarak çalışmaya dahil edilen yüksek ALT ve AST seviyesine sahip ancak HBV DNA ve HCV RNA'sı negatif ve daha önceden transfüzyon hikayesine sahip olmayan 100 hastada SEN-V DNA'sı %13 (%8 SENV-D ve %5 SENV-H), kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edilen normal ALT ve AST seviyesine sahip ve transfüzyon hikayesine sahip olmayan sağlıklı bireylerde SEN-V DNA'sı %10 (%4 SENV-D ve %6 SENV-H) olarak bildirilmiştir (53). Bu çalışmada hasta (SEN-V; %13) ve kontrol grubu (SEN-V; %10) arasında SEN-V prevalansında belirgin bir farklılık bulunmamaktadır. Ancak bizim yaptığımız çalışmada hasta (SEN-V; %55) ve

kontrol grubu (SEN-V; %25) arasında belirgin bir farklılık bulunmaktadır. Bu farklılığın sebebini bizim yaptığımız çalışmadaki hasta grubunu oluşturan hemodiyaliz hastalarının sürekli transfüzyon altında olmasından kaynaklandığını ileri sürebiliriz. Ancak Serin ve ark.,'nın yaptığı çalışmadaki kontrol grubundaki %10 SEN-V prevalans oranı ile bizim yaptığımız çalışmadaki kontrol grubundaki %25 SEN-V prevalans oranı arasında belirgin farklılık dikkati çekmektedir. Her iki çalışmanın da Çukurova bölgesinde yapıldığı göz önünde bulundurulduğunda; aynı ülkenin, aynı coğrafik bölgelerinin, farklı şehirleri arasında virusun farklı dağılıma sahip olduğunu görmekteyiz. Serin ve ark., (53) kontrol grubunda %4 oranında SENV-D, %6 oranında SENV-H genotipine rastlamışlardır. Bizim yaptığımız çalışmanın kontrol grubundaki %5 SENV-D, %20 SENV-H oranı ile kıyaslandığında; yalnız SENV-D genotipinin yakın prevalansa sahip olduğu görülmektedir.

Başlangıçtan beri SEN-V'un parenteral yol ile bulaştığı söylenmektedir ve yukarıdaki bilgiler hastalığın primer bulaşma yolunun muhtemelen sadece parenteral olmadığını düşündürmektedir. Ancak transfüzyonla bulaşan infeksiyonların risk grubunda olan hemodiyaliz ile tedavi edilen hastalar arasında saptadığımız SEN-V oranının %55 olması transfüzyonun bulaşmada önemli rol oynadığını işaret etmektedir.

SEN-V DNA'sının prevalansı Taiwan'lı gönüllü kan donörleri arasında (%5) Batı popülasyonunda tespit edilenden (%2-3) biraz yüksek bulunmuş, fakat Asya ülkelerinden (%10-15) daha düşük bulunduğu bildirilmektedir (30).

Mikuni ve ark., Japon kan donörlerinde SEN-V DNA'sını %28.6 oranında tespit etmişlerdir. Ancak bu yüksek prevalansın Japonya'daki erişkin popülasyonda olduğu bildirilmiştir. Daha önceki çalışmalarda İtalya ve Amerika Birleşik Devletleri'ndeki normal kan donörlerinde SENV-D ve SENV-H infeksiyon prevalansı %2-3 olarak bildirilmiştir (32). Japonya'da daha önce Shibata ve ark.,'nın yaptığı çalışmadaki SENV-D ve SENV-H pozitifliğinin oranı (%10) yine İtalya ve Amerikan'dan daha yüksektir. Ancak İtalya, Amerika ve Japonya'daki kan donörleri arasındaki SEN-V prevalansındaki bu büyük farklılığın nedeninin bilinmediği bildirilmektedir. Mikuni ve ark., Nested-PZR ile SEN-V genomunun 5'UTR (Untranslated region, tecüme edilmeyen bölge)'sini hedefledikleri için yaptıkları bu çalışmada tespit oranının arttığını (%28.6) ifade etmektedirler (32).

Hemodiyalizdeki hastaların kandan kaynaklanan infeksiyon riski altında olabileceği göz önünde bulundurulmaktadır. Çünkü terapötik prosedürler sıklıkla kan transfüzyonu ve kan alma ile ilişkilidir (1). Daha önce yapılan çalışmalarda HCV, GBV-C/HGV veya TTV gibi paranteral taşınan etkenlerin hemodiyaliz hastalarında yüksek prevalansı bildirilmiştir (54). Bizim çalışmamızdaki SENV-D ve SENV-H'nin hemodiyaliz hastalarındaki bu yüksek prevalans, taşınma yolunun diğer kan kaynaklı viruslar gibi olduğunu işaret etmektedir.

Almanya'da kronik hemodiyalizdeki hastalardan 78 tane serum örneğin toplandığı ve PZR ile retrospektif olarak incelendiği bir çalışmada; SENV-H'nin prevalansı %12.8 (10/78) olarak saptanmış. 226 sağlıklı kan donöründe bulunan %16.8 (38/226) sonucu ile karşılaştırıldığında, hemodiyalizdeki hastalar arasındaki prevalans, sağlıklı kan donörleri arasındaki prevalansdan anlamlı bir farklılık bulunmadığı bildirilmiştir. SENV-H viremik bireylerin hemen hemen hiç birinin karaciğer hastalığına ilişkin klinik veya biyokimyasal bulgulara sahip olmadığı bildirilmiştir. Bu sonuçlara göre; SENV-H viremik hastaların ayrı makinelerde diyalizinin gerekmediğini bildirmişlerdir (12).

Kobayashi ve ark.,'nın Japonya'da 189 hemodiyaliz hastasında yaptıkları bir çalışmada ise SEN-V infeksiyonu hemodiyaliz hastalarında kontrol grubundan daha yaygın bulunduğunu bildirmişlerdir. Kontrol grubunda %22'lik oran bulmalarına karşın hasta grubunda %38'lik bir oran bulmuşlardır. SEN-V infeksiyonunu transfüzyon miktarı veya hemodiyaliz süresi ile ilişkili bulmadıklarını, ancak hepatit C virus infeksiyonunu bu faktörlerle anlamlı bir şekilde ilişkilendirdiklerini belirtmişlerdir. ALT (alanin aminotransferaz) yükselme HCV ile ilişkilendirilmiş fakat SEN-V viremisi ile ilişkilendirilmemiştir. Araştırmacılar hemodiyalizdeki hastalarda SEN-V'un yaygın olduğu konusunda görüş birliğine varmışlar ve SEN-V'un patojenitesi hakkında hiçbir kanıt elde edemediklerini bildirmişlerdir (51).

İtalya'da Pirovano ve ark., yaptığı bir çalışmada hastanenin farklı 2 ünitesinde bulunan 171 hemodiyaliz hastasında ve 163 tane kontrolde SEN-V'un prevalansı araştırılmıştır. Tespit edilen SEN-V DNA'sı (SENV-D, SENV-E, SENV-G) ünitelerden birinde daha yüksek bulunmuş ve aynı ünitenin hastalarında SEN-V dizileri yüksek derecede benzer bulunduğu bildirilmiştir. Ayrıca birçok SEN-V genotipi ile karışık infeksiyonun yaygın bulunduğu belirtilmiştir. Cinsiyet, yaş, hemodiyaliz süresi,

transfüzyon, transplantasyon, hepatit infeksiyonu ve rutin karaciğer test sonuçları ve SEN-V'un varlığı arasında hiçbir ilişki gözlenmediğini belirtmişlerdir. Sonuç olarak hemodiyalizdeki hastaların SEN-V taşıma riskinin yüksek olabileceğini ve spesifik SEN-V varyantlarının aynı üniteye taşındığını belirtmektedirler (55).

Taiwan'da yapılan bir çalışmada; SENV-D/H infeksiyonunu; damar içi ilaç kullananları, hemofili, talasemi hastalarını ve hemodiyaliz ile tedavi edilen hastaları içeren yüksek risk gruplarında %54-%90 arasında yaygınlık tespit etmişlerdir. Hemodiyaliz ile tedavi edilen hastalardaki SEN-V oranını %68 olarak bildirmişlerdir (10, 28).

Taiwan'da yapılan başka bir çalışmada hemodiyaliz hastalarında SENV-D prevalansı %46.5, SENV-H prevalansı %27.3 olarak, kontrol grubunu oluşturan kan donörlerinde ise SENV-D prevalansı %18.3, SENV-H prevalansı %5.8 olarak bildirilmiştir. Taiwan'da hemodiyaliz hastalarında SENV-D prevalansının SENV-H'den daha yüksek olduğu görülmektedir. Araştırmacılar SEN-V prevalansını hemodiyaliz süresi ve kan transfüzyon hikayesi ile ilişkilendirmemişlerdir. Araştırmacılar SEN-V'un parenteral veya fekal-oral taşınma gibi diğer olası taşınma yollarındaki rolünün ortaya konması için daha ileri çalışmalara gereksinim olduğunu belirtmektedirler (54).

Türkiye'de Elazığ ilinde Toraman ve ark., 89 hemodiyaliz hastası ve 50 sağlıklı bireyde SENV-D ve SENV-H DNA'larını semi-nested PZR yöntemi ile araştırmışlardır. Kronik hemodiyaliz hastalarının 9'unda (%10.1) SENV-D, 15'inde (%16.8) SENV-H ve 2'sinde (%2.2) hem SENV-D hemde SENV-H varlığını belirlemişlerdir. Aynı çalışmada kontrol grubununun 3'ünde (%6) SENV-D ve 4'ünde (%8) SENV-H pozitifliğini saptamışlardır. SEN-V pozitifliği saptanan ve saptanmayan hastaların klinik ve biyokimyasal değerlerinin birbirine yakın veya benzer olduğunu belirlemişlerdir. Bu çalışmanın verilerine göre, hemodiyaliz hastalarında SENV-D ve SENV-H pozitifliğini yüksek bulmuşlar ancak pozitif olan hastalarda virusun klinik ve biyokimyasal olarak hepatite yol açması ile ilgili bir bulguya rastlamadıklarını bildirmişlerdir (56).

Bizim yaptığımız çalışmanın verileri, hemodiyaliz ile tedavi edilen hastalardaki SEN-V'un %55 oranı ile her iki genotipinin (%33 SENV-D, %22 SENV-H) de, Almanya (%12.8 SENV-H), Japonya (%38 SEN-V) ve ülkemizdeki başka bir il olan Elazığ'da (%29 SEN-V,) hemodiyaliz ile tedavi edilen hastalarda oldukça yaygın olduğunu göstermektedir. Ancak Taiwan'daki çeşitli çalışmalarda belirtilen



hemodiyalizle tedavi edilen hastalardaki (%68 SEN-V, %46.5 SENV-D, %27.3 SENV-H) (10, 28, 54) orandan daha düşüktür. Burada, SEN-V'un hemodiyaliz hastaları arasındaki prevalansının ülkeler arasında ve aynı ülkenin farklı şehirleri arasında oldukça farklı dağılıma sahip olduğu görülmektedir.

Umemura ve ark.,'nın bulguları SEN-V'un tamamen kan transfüzyonu ile taşındığını işaret etmektedir (8). Bizim bulgularımız daha önceden hiçbir parenteral girişim veya kan transfüzyonu (kan kaynaklı bir temas) hikayesine sahip olmayan sağlıklı kan donörlerindeki %25'lik oran; TTV infeksiyonunun benzer bir fenomen olan fekal-oral yol (57) gibi başka bir yol ile taşınabileceğini işaret etmektedir. Ancak yine bizim çalışmamızdaki hemodiyaliz hastalarındaki bu yüksek oran (%55) bu infeksiyonun HBV ve/veya HCV gibi parenteral yol ile taşınabileceğini göstermektedir. Bunlara ilaveten son verilerde SEN-V'un hem parenteral hem de parenteral olmayan yollarla taşınabileceğini işaret etmektedir (57).

SENV-V'un filogenetik analizlerle varlığı gösterilen varyantları arasından sadece SENV-D ve SENV-H daha yüksek prevalansa sahiptir. İtalya ve Amerika'daki yapılan araştırmalarda kan donörlerinde %2'lik bir oran bildirilmiştir. Her iki varyant akut non-A-E hepatitli hastalarda %18, kronik non-A-E hepatitli hastalarda %45, kriptojenik hepatitli bireylerin %35'inde ve transfüzyon ilişkili non-A-E hepatitli bireylerin %50'sinden fazlasında bulunduğu bildirilmiştir (8, 10, 25). Japonya'da SENV-D/H viremi fulminant hepatitli hastaların %32'sinde, akut hepatitli hastaların %17'sinde, kronik hepatitli hastaların %27'sinde, sirozlu hastaların %31'inde ve kan donörlerinin de %10'unda tespit edildiği bildirilmiştir (9, 10). SENV-D ve SENV-H'nin transfüzyon ilişkili non-A-E hepatitle güçlü ilişkisine rağmen SENV-D/H'nin post transfüzyon hepatitinin etkeni olup olmadığının bilinmediği bildirilmektedir (8, 10).

Wong ve ark., Kanada'nın halk kesimini temsil eden izole bir yerdeki bireylerin oluşturduğu sağlıklı popülasyonda (%36) ve bölge sağlık merkezindeki kronik karaciğer hastaları arasında (%21) SEN-V infeksiyonunun oldukça yaygın olduğunu belirtmektedir (29).

Taiwan'da yapılan araştırmada SENV-D/H prevalansı, kan ve kan ürünleri ile sık sık karşılaşan parenteral ilaç kullanıcılarda %54, hemofili hastalarında %68, talasemi hastalarında %90 ve hemodiyalizdeki hastalarda %68 oranında bulduklarını

bildirmişlerdir. Bu da parenteral yolun SENV-D/H'nin taşınmasındaki önemini doğruladığını belirtmişlerdir (10).

Birçok hepatit virusu aynı taşınma şekline sahiptir ve birden fazla sayıda virus ile infeksiyon aynı bireyde meydana gelebilir (10). SEN-V infeksiyonu ile ko-infeksiyonun kronik hepatit B ve C'li hastalarda yaklaşık %20 oranında gözlenmekte olduğu bildirilmiştir (5). Taiwan'da yapılan çalışmada SENV-D/H infeksiyonunun prevalansı kronik hepatit B'li (%41) ve hepatit C'li (%67) hastalarda sağlıklı erişkinlerden (%15) belirgin bir şekilde daha yüksek gözlendiği bildirilmektedir (10).

## 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

SEN-V'un prevalans dağılımı coğrafik farklılık göstermektedir. SEN-V'un yüksek prevalansı TTV prototipi ile yüksek homolojisine bağlanabilmektedir. Çünkü TTV enfeksiyonu da parenteral bulaşan hastalık riski altında olan hastalar arasında ve bir o kadar da sağlıklı kan donörleri arasında dünya çapında bir dağılıma sahiptir.

Hemodiyaliz hastaları sık hastaneye yatmaları, kan vermek veya kan transfüzyonuna ihtiyaç göstermeleri nedeniyle kan kaynaklı viruslar tarafından meydana getirilen enfeksiyon riski altındadırlar.

Ayrı diyaliz makinelerinin kullanımı nozokomiyal yayılımının önlenmesi için HCV ile infekte bireylerde önerilmektedir. Ancak genel popülasyonda SEN-V'un yüksek prevalansı ve yapılan çalışmalardaki şüpheli klinik etkisi nedeniyle bu güne kadar ayrı makinelerin kullanılması için önerilerde bulunulmamıştır.

Yapmış olduğumuz SEN-V prevalans belirleme çalışmasında, bölgemizde yaşayan transfüzyon ile taşınan hastalıklar için risk altında olan, hemodiyaliz ile tedavi edilen 100 hastanın %55'inde SEN-V saptandı. Hastaların %33'ünde SENV-D genotipi, %22'inde ise SENV-H genotipi saptandı. Çalışmamıza kontrol grubu olarak dahil ettiğimiz bölgemizde yaşayan 120 sağlıklı kan donörünün %25'inde SEN-V saptandı. Kan donörlerinin %5'inde SENV-D, %20'sinde ise SENV-H genotipi saptandı.

Hemodiyaliz ile tedavi edilen hastalarda SEN-V prevalansı kontrol grubundaki sağlıklı kan donörlerinden daha yüksek olduğu ortaya çıkarıldı. Bu da SEN-V'ün asıl taşınma yolu olarak kabul edilen transfüzyonla meydana gelen bulaşın, SEN-V'un taşınmasında etkili bir yol olabileceği söylenebilir.

Hemodiyaliz ile tedavi edilen hastalarda SENV-D genotipinin sıklığı, SENV-H genotipinden, kontrol grubunda ise SENV-H genotipinin sıklığı, SENV-D'den daha fazla olduğu görüldü.

Bizim çalışmamızın sonuçları; Mersin ilinde genel popülasyonu oluşturan, parenteral yol ile bulaşan hastalıklar için risk altında bulunmadığı düşünülen sağlıklı kan donörleri arasında SENV-D ve SENV-H viremisinin oldukça yaygın olduğunu göstermektedir. Bu da parenteral taşınma yolunun SEN-V'un yayılmasında veya bulaşmasında temel yol olup olmadığı konusunda şüphe uyandırmıştır.

Bu sonuçlarla SEN-V'un kan haricinde diğer yollarla geçip geçmediği bilinmemektedir. Kan haricindeki bulaş yolu muhtemelen besinler veya fekal-oral yol aracılığı ile olabilir ve ileri çalışmalarda bunların araştırılmasına önem verilmelidir.

Sonuç olarak; SEN-V enfeksiyonu kan donörlerinde, hemodiyaliz hastalarında, bilinmeyen etiyolojili karaciğer hastalarında oldukça sık oranda bulunmaktadır, ancak yapılan çalışmalarda, SEN-V'un hepatit oluşturma yeteneğinin ve hastalığın gidişatında oynadıkları rolün hala açık olmadığı sonucuna varılmaktadır. Bu nedenle SEN-V'un medikal önemini yani, gerçekten hepatit etkeni virus olup olmadığını ortaya koyan ileri çalışmalara gereksinim vardır. İleride birçoğumuzun kanında dolaşan bu virusların belki de bambaşka hastalık tablolarından sorumlu oldukları ortaya çıkabilir. Çünkü mikrobiyoloji bilimi, varlıkları ortaya çıktıktan sonra hastalıkla ilişkisinin yıllar sonra ortaya konduğu mikroorganizmalarla daha önce de karşılaşmıştır.

## 7. KAYNAKLAR

1. **Sagir A, Kirschberg O, Heintges T, Erhardt A, Hussinger D.** SEN virus infection. *Rev Med Vir*, **2004**, 14:141–148.
2. **Habeck M.** New hepatitis virus discovered. *Mol Med Today*, **1999**;5(11):462.
3. **Akiba J, Umemura T, Alter HJ, Kojiro M, Tabor E.** SEN virus: epidemiology and characteristics of a transfusion–transmitted virus. *Transfusion*, **2005**;45:1084–1088.
4. **Schroter M, Laufs R, Zollner B, Knodler B, Schafer P, Sterneck M, Fischer L, Feucht HH.** Prevalence of SENV-H viraemia among healthy subjects and individuals at risk for parenterally transmitted diseases in Germany. *J Viral Hepat*, **2002**;9(6):455–459.
5. **Bowden S.** New hepatitis viruses: contenders and pretenders. *J Gastroenterol Hepatol*, **2001**;16(2):124–131.
6. **Tanaka Y, Primi D, Wang RY, Umemura T, Yeo AE, Mizokami M, Alter HJ, Shih JW.** Genomic and molecular evolutionary analysis of a newly identified infectious agent (SEN virus) and its relationship to the TT virus family. *J Infect Dis*, **2001**;183(3):359–367.
7. **Allain J.P, Thomas I, Sauleda S.** Nucleic acid testing for emerging viral infections. *Transfusion Medicine*, **2002**;12(4):275–283.
8. **Umemura T, Yeo AE, Sottini A, Moratto D, Tanaka Y, Wang RY, Shih JW, Donahue P, Primi D, Alter HJ.** SEN virus infection and its relationship to transfusion-associated hepatitis. *Hepatology*, **2001**;33(5):1303–1311.
9. **Shibata M, Wang RY, Yoshiba M, Shih JW, Alter HJ, Mitamura K.** The presence of a newly identified infectious agent (SEN virus) in patients with liver diseases and in blood donors in Japan. *J Infect Dis*, **2001**;184(4):400–404.
10. **Kao JH, Chen W, Chen PJ, Lai MY, Chen DS.** Prevalence and implication of a newly identified infectious agent (SEN virus) in Taiwan. *J Infect Dis*, **2002**;185(3):389–392.
11. **Ball JK, Curran R, Berridge S, Grabowska AM, Jameson CL, Thomson BJ, Irving WL, Sharp PM.** TT virus sequence heterogeneity in vivo: evidence for co-infection with multiple genetic types. *J Gen Virol*, **1999**;80 (7):1759–1768.

12. **Schroter M, Laufs R, Zollner B, Knodler B, Schafer P, Feucht HH.** A novel DNA virus (SEN) among patients on maintenance hemodialysis: prevalence and clinical importance. *J Clin Virol*, **2003**;27(1):69–73.
13. **Kojima H, Kaita KD, Zhang M, Giulivi A, Minuk GY.** Genomic analysis of a recently identified virus (SEN virus) and genotypes D and H by polymerase chain reaction. *Antiviral Res*, **2003**;60(1):27–33.
14. **Ustaçelebi Ş, Abacıoğlu H, Badur S.** *Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji*. Güneş Kitabevi, Ankara, **2004**.
15. **Umemura T, Tanaka Y, Kiyosawa K, Alter HJ, Shih JW.** Observation of positive selection within hypervariable regions of a newly identified DNA virus (SEN virus). *FEBS Lett*, **2002**;510(3):171–174.
16. **Moriyama M, Mikuni M, Longren W, Zi-Yi Z, Xueqing W, Oshiro S, Matsumura H, Aoki H, Ichijima S, Iwasaki H, Tanaka N, Abe K, Arakawa Y.** Epidemiology of SEN virus infection among patients with hepatitis B and C in China. *Hepato Res*, **2003**;27(3):174–180.
17. **Sugiura T, Goto K, Imamine H, Ando T, Ban K, Sugiyama K, Togari H.** Prevalence of SEN virus among children in Japan. *Virus Res*, **2004**;100(2):223–228.
18. **Umemura T, Alter HJ, Tanaka E, Yeo AE, Shih JW, Orii K, Matsumoto A, Yoshizawa K, Kiyosawa K.** Association between SEN virus infection and hepatitis C in Japan. *J Infect Dis*, **2001**;184(10):1246–1251.
19. **Xu D, Tian DY, Zhang ZG, Chen HY, Song PH.** Effect of SEN virus coinfection on outcome of lamivudine therapy in patients with hepatitis B. *World J Gastroenterol*, **2004**;10(7):968–971.
20. **Lin JG, Goto T, Nakane K, Miura K, Mikami K, Ohshima S, Yoneyama K, Watanabe S.** Clinical significance of SEN virus on interferon response in chronic hepatitis C patients. *J Gastroenterol Hepatol*, **2003**;18(10):1144–1149.
21. Virus classification. Erişim: [http://en.wikipedia.org/wiki/Virus\\_classification](http://en.wikipedia.org/wiki/Virus_classification). Erişim tarihi: 7.02.2005
22. ICTVdB, The Universal Virus Database Descriptions. Erişim: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdb/>. Erişim tarihi: 04.09.2005
23. Google grafikler. Erişim: <http://www.ivis.org/advances/Carter/Part2chap8/chapter.asp?LA=1#Circovirus>. Erişim tarihi: 04.09.2005.
24. **Tanaka Y, Pfeiffer R, Yeo AE, Mizokami M, Edlin BR, Castle P, O'Brien TR, Alter HJ, Shih JW.** PCR-probe capture hybridization assay and statistical model for SEN virus prevalence estimation. *J Med Virol*, **2004**;73(1):123–130.

25. **Mushahwar IK.** Recently discovered blood-borne viruses: are they hepatitis viruses or merely endosymbionts? *J Med Virol*, **2000**;62(4):399–404.
26. Taxonomic subtree rooted by TaxID 39724 (*Circoviridae*). Erişim: <http://taxon.molgen.mpg.de/gettaxon?depth=3&prune=10000&taxid=39724>. Erişim tarihi: 02.01.2005.
27. **Yoshida H, Kato N, Shiratori Y, Shao R, Wang Y, Shiina S, Omata M.** Weak association between SEN virus viremia and liver disease. *J Clin Microbiol*, **2002**;40(9):3140–3145.
28. **Kao JH, Chen W, Chen PJ, Lai MY, Chen DS.** SEN virus infection in patients with chronic hepatitis C: preferential coinfection with hepatitis C genotype 2a and no effect on response to therapy with interferon plus ribavirin. *J Infect Dis*, **2003**;187(2):307–310.
29. **Wong SG, Primi D, Kojima H, Sottini A, Giulivi A, Zhang M, Uhanova J, Minuk GY.** Insights into SEN virus prevalence, transmission, and treatment in community-based persons and patients with liver disease referred to a liver disease unit. *Clin Infect Dis*, **2002**;35(7):789–795.
30. **Tangkijvanich P, Theamboonlers A, Sriponthong M, Kullavanijaya P, Poovorawan Y.** SEN virus infection and the risk of hepatocellular carcinoma: a case-control study. *Am J Gastroenterol*, **2003**;98(11):2500–2504.
31. **Pfeiffer RM, Tanaka Y, Yeo AE, Umemura T, Seal KH, Shih JW, Alter HJ, Edlin BR, O'Brien TR.** Prevalence of SEN viruses among injection drug users in the San Francisco Bay area. *J Infect Dis*, **2003**;188(1):13–18.
32. **Mikuni M, Moriyama M, Tanaka N, Abe K, Arakawa Y.** SEN virus infection does not affect the progression of non-A to -E liver disease. *J Med Virol*, **2002**;67(4):624–629.
33. **Wilson LE, Umemura T, Astemborski J, Ray SC, Alter HJ, Strathdee SA, Vlahov D, Thomas DL.** Dynamics of SEN virus infection among injection drug users. *J Infect Dis*, **2001**;184(10):1315–1319.
34. **Poovorawan Y, Chatchatee P, Chongsrisawat V.** Epidemiology and prophylaxis of viral hepatitis: a global perspective. *J Gastroenterol Hepatol*, **2002**;17:155–166.
35. **Luo K, He H, Liu Z, Liu D, Xiao H, Jiang X, Liang W, Zhang L.** Novel variants related to TT virus distributed widely in China. *J Med Virol*, **2002**;67(1):118–126.
36. **CCDR.** Viral Hepatitis and Emerging Bloodborne Pathogens in Canada. ISSN 1188–4169; volume: 2753, September, **2001**.
37. **Pirovano S, Bellinzoni M, Ballerini C, Cariani E, Duse M, Albertini A, Imberti L.** Transmission of SEN virus from mothers to their babies. *J Med Virol*, **2002**;66(3):421–427.

38. **Bulut Y, Özdarendeli A, Kalkan A, Kılıç M, Toraman ZA.** Sağlıklı çocuklarda TTV, SIMIAN TTV ve SEN virusların prevalansı ve önemli gen kısımlarının klonlanması. 3. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi (uluslararası katılımlı). Program ve bildiri özet kitabı. Ankara, 28 Haziran–1 Temmuz, **2004**:213.
39. **Harper D.R.** Molecular Virology: A Medical Perspectives Book, 1<sup>st</sup>.Ed., UK: BIOS Scientific Publishers Limited, **1994**.
40. **Durmaz R.** Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji. Nobel Tıp Kitap Evleri, İstanbul, **2001**.
41. **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Book 2, 2<sup>ed</sup>. Ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, **1989**.
42. PCR-Symposium. Erişim: <http://derma.klinikum.unimuenchen.de/Alte%20Seiten/PCRsymposium.htm>. Erişim tarihi: 10.10.2005
43. **Serin M.S.** Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR). Aslan G, Emekdaş G, Köksal F, Serin M.S. *IV. Ulusal Sindirim Yolu ile Bulaşan İnfeksiyonlar Simpozyumu: Uygulamalı Moleküler Kurs Kitabı*, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No. 51, Mersin, **2005**:37–52.
44. Advances in the diagnosis of sexually transmitted diseases caused by bacteria. Erişim: <http://www.roche.com/pages/facets/1/chlamyde.htm>. Erişim tarihi: 05.10.2005
45. **Taylor G.R.** Polymerase chain reaction: basic principles and automation. İn: McPherson M.J, Quirke P, Taylor G.R. *PCR Volume 1: A Practical Approach*, 1<sup>st</sup> Ed. New York: Oxford University Press, **1991**:1–14.
46. **McPherson M.J, Moller S.G.** PCR: The Basics from Background to Bench, 1<sup>st</sup>. Ed., UK: BIOS Scientific Publishers Limited, **2000**.
47. **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Book 1, 2<sup>ed</sup>. Ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, **1989**.
48. **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Book 3, 2<sup>ed</sup>.Ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, **1989**.
49. **Dai CY, Yu ML, Lin ZY, Chen SC, Hsieh MY, Wang LY, Tsai JF, Chuang WL, Chan WY.** Prevalence and clinical significance of SEN virus infection among volunteer blood donors in southern Taiwan. *Dig Dis Sci*, **2004**;49(7–8):1181–1185.
50. **Huang LR, Wang HH, Lin WS, Lin CL.** The prevalence of SEN virus infection in blood donors in Taiwan. *J Infect*, **2005**;51:30–34.



51. **Kobayashi N, Tanaka E, Umemura T, Matsumoto A, Iijima T, Higuchi M, Hora K, Kiyosawa K.** Clinical significance of SEN virus infection in patients on maintenance haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant*, **2003**;18(2):348–352.
52. **Umemura T, Alter HJ, Tanaka E, Orii K, Yeo AE, Shih JW, Matsumoto A, Yoshizawa K, Kiyosawa K.** SEN virus: response to interferon alfa and influence on the severity and treatment response of coexistent hepatitis C. *Hepatology*, **2002**;35(4):953–959.
53. **Serin MS, Koksall F, Oksuz M, Abayli B, Aslan G, Tezcan S, Yildiz C, Kayar B, Emekdas G.** SEN virus prevalence among non-B and non-C hepatitis patients with high liver function tests in the south of Turkey. *Jpn J Infect Dis*, **2005**;58(6):349–352.
54. **Dai CY, Chuang WL, Chang WY, Chen SC, Sung MH, Hsieh MY, Lin ZY, Hsieh MY, Wang LY, Tsai JF, Yu ML.** SEN virus infection among patients on maintenance hemodialysis in southern Taiwan. *J Infect*, **2005**;51(2):110–115.
55. **Pirovano S, Gregorini G, Malacarne F, Marini M, Albertini A, Imberti L.** High prevalence of SEN virus infection in patients on maintenance hemodialysis: frequent mixed infections with different variants and evidence for nosocomial transmission of the virus. *Intervirology*, **2005**;48(4):216–222.
56. **Toraman ZA, Bulut Y, Aksoy A, Özdarendeli A, Seyrek A.** Hemodiyaliz hastalarında SEN-D ve SEN-H virus prevalansı. 3. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi. Program ve bildiri özet kitabı. Ankara, 28 Haziran- 1 Temmuz, **2004**:216.
57. **Tangkijvanich P, Theamboonlers A, Sriponthong M, Thong-Ngam D, Kullavanijaya P, Poovorawan Y.** SEN virus infection in patients with chronic liver disease and hepatocellular carcinoma in Thailand. *J Gastroenterol*, **2003**;38:142–148.

## 8. ÖZGEÇMİŞ

01.11.1979 tarihinde Mersin ilinde doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Mersin’de tamamladı. 1996 yılında Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesinde lisans eğitimine başladı ve 2001 yılında mezun oldu. 2003 yılında Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladı. 2004 yılında araştırma görevlisi kadrosuna geçti.

Halen Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda araştırma görevlisi olarak görev yapmaktadır.