

T.C.
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

HEMODİYALİZ HASTALARINDA SEN VİRUS PREVALANSI

UZMANLIK TEZİ
Dr. Recep ŞAHİN

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Çiğdem Banu ÇETİN

Manisa - 2012

ÖNSÖZ

Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji ihtisasım boyunca eğitimim için her türlü desteği veren, bilgi ve tecrübelerini hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Özlem Tünger, Doç. Dr. Çiğdem Banu Çetin, Yrd. Doç. Dr. Şebnem Şenol'a teşekkür ederim.

Tez danışmanım Doç. Dr. Çiğdem Banu Çetin'e hem ihtisas eğitimimde hem de tezimin hazırlanışında vermiş olduğu destek için ayrıca teşekkür ederim. Tez çalışmamda Doç. Dr. Sinem Akçalı'ya yardım ve desteğinden dolayı teşekkür ederim.

Beş yıl boyunca birlikte çalıştığım tüm doktor, hemşire, hasta bakıcı ve personel arkadaşlarıma ayrı ayrı teşekkür ederim.

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

Dr. Recep ŞAHİN

İÇİNDEKİLER	Sayfa
I. GİRİŞ VE AMAÇ	4
II. GENEL BİLGİLER	6
2.1.SEN Virüs (SENV)	6
2.1.1. SEN Virüsün Mikrobiyolojik Özellikleri ve Sınıflandırılması	7
2.1.2. Epidemiyoloji	13
2.1.2.1. Sağlıklı Kan Vericilerinde SENV	14
2.1.2.2. Hemodiyaliz Hastalarında SENV	16
2.1.2.3. Kan Transfüzyon Gereksinimi Olan Diğer Hastalarda SENV	18
2.1.2.4. Non A-E Hepatitlerde SENV	19
2.1.2.5. SENV, HIV, HBV, HCV Koenfeksiyonu	20
2.1.2.6. SENV ile İlgili Diğer Epidemiyolojik Çalışmalar	21
2.1.3. Patogenez	22
2.1.4. SEN virüsün laboratuvar tanısı	24
2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Tekniği	24
2.2.1. PZR Tipleri	28
2.2.1.1. Multipleks PZR	28
2.2.1.2. Broad - Range PZR veya Consensus PZR	28
2.2.1.3. Nested ve Semi - Nested PZR	29
2.2.1.4. IN SITU PZR	29
2.2.1.5. Real - Time PZR	29
2.2.1.6. Hot – Start PZR	30
2.2.1.7. Touchdown PZR	31
III. OLGULAR, GEREÇ VE YÖNTEM	32

3.1. Olgular	32
3.1.1. Hemodiyaliz Grubu	32
3.1.2. Hemodiyaliz Grubu Dışlama Kriterleri	32
3.1.3. Kontrol Grubu	32
3.1.4. Kontrol Grubu Dışlama Kriterleri	32
3.1.5. Serum Örneklerinin Alınması ve Saklanması	33
3.1.6. Verilerin Toplanması ve İstatistik	33
3.1.7. Çalışma Yeri	33
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	34
3.3. Yöntem	36
3.3.1. DNA Ekstraksiyon Aşaması	36
3.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Aşaması	41
IV. BULGULAR	43
4.1. Hasta ve Kontrol Grubunun Genel Özellikleri	43
4.2. Hasta ve Kontrol Grubunda SENV-D, SENV-H ve SENV-D+H Sıklığı	43
4.3. Hemodiyaliz Süresine Göre SENV Sıklığı	44
4.4. Hasta Grubunda Hepatit B ve C Enfeksiyonu Olanlarda SENV Sıklığı	46
4.5. Yaş ve Cinsiyete Göre SENV Sıklığı	46
4.6. Hasta Grubunda Kronik Hastalık Varlığı ve SENV Sıklığı	47
4.7. Hasta ve Kontrol Grubunun Sosyo-Ekonomik Özellikleri ve SENV Sıklığı	49
V. TARTIŞMA	51
VI. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	59
VII. ÖZET	61
VIII. İNGİLİZCE ÖZET	62
IX. KAYNAKLAR	63

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hepatit; metabolik hastalıklar, ilaçlar, alkol, toksinler ve virüsler gibi çeşitli nedenlerle oluşan karaciğer inflamasyonunun genel adıdır. Viral hepatitler, ülkemizde ve tüm dünyada görülen ve geniş kitleleri etkileyen önemli sağlık sorunları oluşturan hastalıklardır. Günümüzde viral hepatit olgularının büyük kısmından, 5 hepatotrop virüs sorumludur. Bunlar; Hepatit A Virüsü (HAV), Hepatit B Virüsü (HBV), Hepatit C Virüsü (HCV), Hepatit D Virüsü (HDV), Hepatit E Virüsü (HEV) 'dir.

Özellikle kan nakli ile bulaşan HCV infeksiyonları, günümüzde uygulanan duyarlılığı yüksek serolojik ve moleküler yöntemler sayesinde önemli ölçüde azalmıştır. Ancak, halen kan nakli sonrası hepatit olgularının %10'u ve toplum kökenli hepatit olgularının %20'sinin etiyolojisi tespit edilememiştir (1). İspanya'da Escorsell ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, 1992 ile 2000 yılları arasında, akut fulminan hepatitli 267 hastanın %32'sinde herhangi bir etkenin saptanamadığı bildirilmiştir (2). Amerika Birleşik Devleti'nde kriptojenik karaciğer hastalığı olan 567 hastada, 3 yıl boyunca yapılan incelemelere rağmen hastaların %4.9' unda herhangi bir etiyolojik ajan tespit edilememiştir (3). Hepatitle ilişkili aplastik anemi olgularının birçoğunda etiyolojik etken bulunamamıştır (4). Günümüzde gelişen serolojik ve moleküler teknikler sayesinde etiyolojisi aydınlatılamayan olguların oranı azalmakla beraber halen görülmeye devam etmektedir. Yıllar içerisinde nedeni açıklanamayan hepatit olgularında farklı virüslerinde rol oynayabileceği düşüncesi hakim olmuştur. İyi tanımlanmış başlıca hepatit virüsleri (hepatit A-E) dışında, tarihsel keşif sırasına göre Hepatit G virüs (HGV), Torgue Teno virüs (TTV), ve SEN virüs (SENV) gibi virüslerin de özellikle kan nakli sonrası non A-E hepatitlerinden sorumlu olabilecekleri öne sürülmüştür (1, 5, 6).

SENV ile ilgili ilk çalışmalar 1999 yılında İtalyan araştırmacı Dr. Daniella Piri ve ekibi tarafından yapılmıştır. HIV (Human immunodeficiency virus, insan bağışıklık yetmezlik virüsü) ile enfekte intravenöz (İ V.) ilaç bağımlısı bir hastanın serumunda farklı bir DNA klonu saptanmıştır. Bu yeni klonun yeni bir virüs olabileceği düşünölmüş ve hastanın isminin baş harfleri olan 'SEN' alınarak isimlendirilmesi yapılmıştır. Daha sonra da SENV'nin kan nakli ile bulaşan yeni bir hepatit virüsü olabileceği açıklanmıştır (1, 7, 8, 9).

SENV genomunun yapılan filogenetik analizlerine göre 9 farklı genotipi tanımlanmıştır (SENV-A, SENV-B, SENV-C, SENV-D, SENV-E, SENV-F, SENV-G, SENV-H ve SENV-I). Özellikle sağlıklı kan verici ve alıcılarında, bu alt tiplerden SENV-D ve SENV-H 'nin yüksek oranda DNA sekans homolojisi göstermesi bu iki virüsün kan nakli ile bulaştığını kuvvetli bir şekilde desteklemiştir. Günümüzde bu virüsün tespitinde, akut ve kronik infeksiyon ayırımında henüz serolojik bir antikor testi mevcut değildir. SEN virüs polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile saptanabilmektedir. SENV-D ve SENV-H karaciğer hastalıkları ile daha çok ilişkilendirilmiş ve kan nakli sonrası hepatit oluşturabileceği düşünölmüştür. Yukarda bahsi geçen diğer SENV genotipleri ise sağlıklı kan vericilerinde çok daha az sıklıkta görölmekle birlikte, kan transfüzyonu ile ilişkili hepatitlerden sorumlu değillerdir (1,10).

Hemodiyaliz hastaları sık parenteral uygulamalara maruz kalan, sık kan transfüzyonu alma ihtiyacı olan, kan yolu ile bulaşan viral infeksiyonlar açısından risk altında olan bir hasta grubudur. Çalışmamızda bu hasta grubunda yeni bir viral hepatit etkeni olabileceği düşünölen SENV sıklığının araştırılması ve sağlıklı kan vericileri ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.SEN Virüs (SENV)

Hepatit virüsleri ile ilgili araştırmalar 50 yıldan daha uzun süredir devam etmektedir. Hepatitlerin %15 - %17' sinin nedeni günümüzde hala aydınlatılamamıştır (11). 20. yüzyılın sonlarında etiyolojisi açıklanamayan hepatit olguları ve gelişen serolojik ve moleküler yöntemler, araştırmacıları hepatite neden olabilecek yeni virüs izolatlarını incelemeye sevk etmiştir. 1995 yılında Simons ve arkadaşları tarafından HGV'nin keşfi, ardından 1997' de Nishizawa ve arkadaşları tarafından TTV'nin keşfi ile bu virüslerin etiyolojisi bilinmeyen non A-E hepatitli hastalarda etken olabilecekleri düşünölmüştür (12,13). Her iki virüste dünyada bölgesel farklılıklar göstermekle birlikte oldukça yaygındır. Ancak hem HGV hem de TTV'nin insanlarda hastalık oluşturduklarına dair kesin kanıtlar yoktur (1,14).

SEN virüs, ilk kez 20.07.1999' da İtalya'nın Saluggia kentinde bulunan DiaSorin Biyomoleküler Araştırma Enstitüsünde, Dr. Daniella Piri ve arkadaşları tarafından, intravenöz ilaç bağımlısı, HIV ile enfekte ve nedeni bilinmeyen transfüzyon sonrası hepatitli bir hastanın serumundan izole edilmiştir. Virüsün keşfi bilimsel bir konferansta ya da bilimsel bir dergide yayımlanmadan önce, bir basın toplantısı ile duyurulmuş ve The New York Times isimli gazetede yayımlanmıştır (7,15). 18.05.2000 tarihinde SENV nükleik asit sekansı tescillenmiştir (16). 2000 yılından sonra birçok araştırmacının SENV ile ilgili çalışmaları yayımlanmıştır. SENV ile ilgili yapılan ilk çalışmalarda bazı genotiplerinin özellikle SENV-H ve SENV-D'nin kan transfüzyonu sonrası hepatit yapabileceği gösterilmiştir (1).

2.1.1. SEN Virüsün Mikrobiyolojik Özellikleri ve Sınıflandırılması

SENV; tek zincirli sirküler DNA (ssDNA) içeren zarfsız bir virüstür. Virüs 26 nm boyutunda, 3600-3800 nükleotid içeren genomu yaklaşık 3,8 kb uzunluğundadır. TTV ile yakın filogenetik benzerliğe sahiptir. SENV TTV ile %55'den az sekans homolojisi ve %37'den az aminoasit homolojisine sahiptir. SENV yeni bir virüs olarak düşünülmüş ama daha sonra yapılan genomik analizler sonucu TTV'nin alt tipi olduğu saptanmıştır (1, 6, 17, 18). İlk zamanlar TTV ile birlikte *Circoviridae* ailesinde ve anellovirus genusu içinde sınıflandırılmıştır. Sonraki yıllarda yapılan TTV DNA sekans analizleri sonunda, bu virüsler ile *Circoviridae* ailesi arasında benzerlik saptanmamıştır (19).

Günümüzde SENV, TTV' nün bir alt türü olarak *Anelloviridae* ailesi içerisinde sınıflandırılmaktadır. 2009 yılında *Circoviridae* - Anellovirus çalışma grubunun raporu doğrultusunda, Uluslararası Virüs Taksonomi Komitesi (*International Committee on Taxonomy of Viruses*, ICTV) tarafından *Anelloviridae* ailesi oluşturulmuştur. Oluşturulan bu aile dokuz cins ve 47 türe ayrılmıştır. SENV-D ve SENV-H *Alphatorquevirus* cinsinin içerisinde sırasıyla *Torque teno virus 15* ve *Torque teno virus 18* türleri olarak sınıflandırılmaktadır (20).

Alphatorquevirus cinsi içinde tanımlanan *Torque teno virus* (TTV), *Betatorquevirus* cinsi içinde tanımlanan *Torque teno mini virus* (TTMV), *Gammatorquevirus* cinsi içinde tanımlanan *Torque teno midi virus* (TTMDV) insan anellovirusları olarak tanımlanmıştır. Diğer TTV varyantları ise hayvan izolatlarıdır (21). *Anelloviridae* ailesinin taksonomisi **Tablo-1**'de gösterilmiştir (22).

Tablo 1: *Anelloviridae* taksonomisi ve SENV (22)

Aile <i>Anelloviridae</i>		
Cins	<i>Alphatorquevirus</i>	(29 tür)
	Tür	<i>Torque teno virus 1</i>
	Tür	<i>Torque teno virus 2</i>
	Tür	<i>Torque teno virus 3</i>
	Tür	<i>Torque teno virus 4</i>
	Tür	<i>Torque teno virus 5</i>
	Tür	<i>Torque teno virus 6</i>
	Tür	<i>Torque teno virus 7</i>
	Tür	<i>Torque teno virus 8</i>
	Tür	<i>Torque teno virus 9</i>
	Tür	<i>Torque teno virus 10</i>
	Tür	<i>Torque teno virus 11</i>
	Tür	<i>Torque teno virus 12</i>
	Tür	<i>Torque teno virus 13</i>
	Tür	<i>Torque teno virus 14</i>
	Tür	<i>Torque teno virus 15 (SENV-D)</i>
	Tür	<i>Torque teno virus 16</i>
	Tür	<i>Torque teno virus 17</i>
	Tür	<i>Torque teno virus 18 (SENV-H)</i>

	Tür	<i>Torque teno virus 19</i>
	Tür	<i>Torque teno virus 20</i>
	Tür	<i>Torque teno virus 21</i>
	Tür	<i>Torque teno virus 22</i>
	Tür	<i>Torque teno virus 23</i>
	Tür	<i>Torque teno virus 24</i>
	Tür	<i>Torque teno virus 25</i>
	Tür	<i>Torque teno virus 26</i>
	Tür	<i>Torque teno virus 27</i>
	Tür	<i>Torque teno virus 28</i>
	Tür	<i>Torque teno virus 29</i>
Cins	<i>Betatorquevirus</i>	(9 tür)
	Tür	<i>Torque teno mini virus 1</i>
	Tür	<i>Torque teno mini virus 2</i>
	Tür	<i>Torque teno mini virus 3</i>
	Tür	<i>Torque teno mini virus 4</i>
	Tür	<i>Torque teno mini virus 5</i>
	Tür	<i>Torque teno mini virus 6</i>
	Tür	<i>Torque teno mini virus 7</i>
	Tür	<i>Torque teno mini virus 8</i>
	Tür	<i>Torque teno mini virus 9</i>

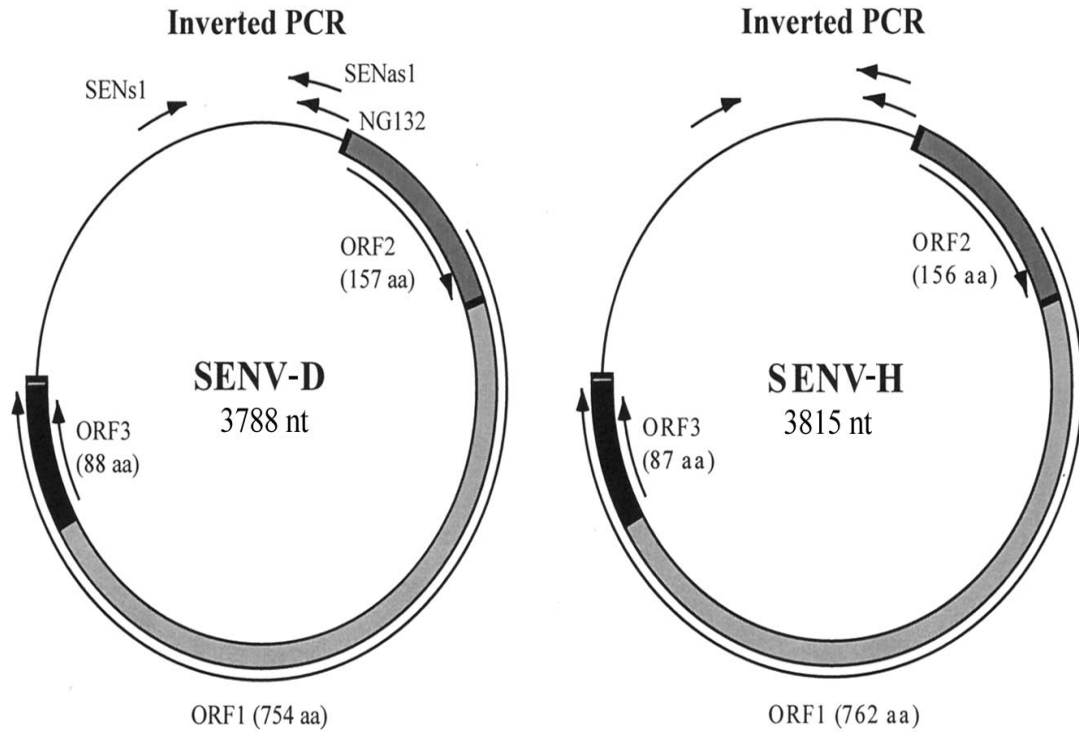
Cins	<i>Deltatorquevirus</i>	(1 tür)
	Tür	<i>Torque teno tupaia virus</i>
Cins	<i>Epsilontorquevirus</i>	(1 tür)
	Tür	<i>Torque teno tamarin virus</i>
Cins	<i>Etatorquevirus</i>	(1 tür)
	Tür	<i>Torque teno felis virus</i>
Cins	<i>Gammatorquevirus</i>	(2 tür)
	Tür	<i>Torque teno midi virus 1</i>
	Tür	<i>Torque teno midi virus 2</i>
Cins	<i>Iotatorquevirus</i>	(2 tür)
	Tür	<i>Torque teno sus virus 1</i>
	Tür	<i>Torque teno sus virus 2</i>
Cins	<i>Thetatorquevirus</i>	(1 tür)
	Tür	<i>Torque teno canis virus</i>
Cins	<i>Zetatorquevirus</i>	(1 tür)
	Tür	<i>Torque teno douroucouli virus</i>

SENV genomununun filogenetik analizine göre 8 farklı genotipi tanımlanmıştır. (SENV-A, SENV-B, SENV-C, SENV-D, SENV-E, SENV-F, SENV-G, SENV-H). 2000 yılında Fiordalisi ve arkadaşları SENV genom çalışmalarında dokuzuncu genotip olan SENV- l'yı tanımlamıştır (23).

SENV' nin en önemli özelliği, çok değişken genom yapısına sahip olmasıdır. Yılda gen lokalizasyonu başına $7,32 \times 10^4$ mutasyon hızı olan

hipervariabl bölgelere sahiptir. SENV' nin persiste etme yeteneğinin bu gen bölgelerinin mutasyon hızı ile doğru orantılı olduğu düşünülmektedir (17,18).

SENV ORF (Open Reading Frame, açık okuma çerçevesi) adı verilen DNA dizilerine sahiptir. ORF' deki nükleik asit farklarından yararlanılarak türler genotiplere ayrılabilir. Her genotip diğerinden en az %25'lik nükleotid sekans değişikliğiyle ayrılır. SENV' nün en az üç adet ORF' si bulunmaktadır (**Şekil 1**). Bunlar ORF1, ORF2 ve ORF3 olarak isimlendirilmektedir (17,18). Diğer TTV varyantları ise 3 ya da 4 ORF (ORF1, ORF2, ORF3 ve/veya ORF4) içerir (24).



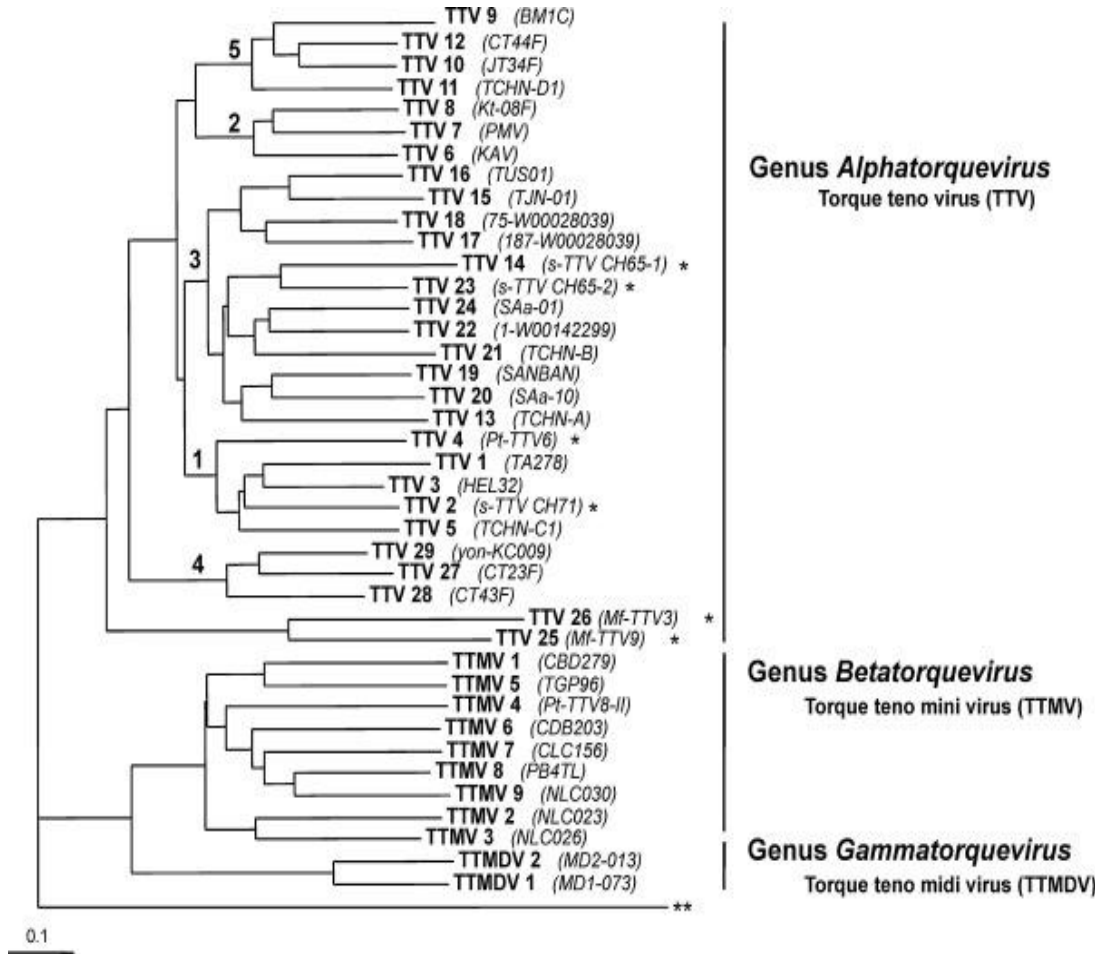
Şekil 1. ORF1-3 gösteren SENV-D ve SENV-H gen haritası (17)
(aa; aminoasit, nt; nükleotid)

ORF uzunluğu her SENV genotipinde farklıdır. ORF1 arjinin ve lizinden zengin bölgeler içeren, hidrofilik bir yapıya sahip olan en büyük ORF' dir ve dört farklı protein kodlar. Üçüncü protein tüm SENV' lerde benzer aminoasit dizilimi gösterir ve replikasyondan sorumludur. Protein 1, 2 ve 4 ise sadece bazı genotiplerde mevcuttur ve aminoasit diziliminde farklılıklar bulunmaktadır. Bu özellik sınıflamada kullanılmaktadır (17).

ORF1'de; SENV-A, SENV-B, SENV-C, SENV-D, SENV-E, SENV-G ve SENV-H genotiplerinde sırasıyla 642, 679, 753, 754, 743, 758, 763 ve 762 adet aminoasit bulunmaktadır (17).

Anelloviridae ailesindeki ilk üç cins insan anellovirusları olarak tanımlanmıştır. (*Alphatorquevirus*, *Betatorquevirus* ve *Gammatorquevirus*). Cinsler arası % 56'dan fazla ORF1 nükleotid dizilim farklılığı vardır. İnsan anellovirusları ORF1 deki farklılıklara göre beş genogruba ayrılmıştır (25).

TTV-15 (SENV-H) ve TTV-18 (SENV-D) üçüncü grupta yer almıştır. Her bir izolatin ORF1 nükleotid dizilim farklılığı >%20 ise farklı bir tür olarak tanımlanmıştır (25). **Şekil-2**'de insan anellovirüslerinin ORF1 varyasyonlarına dayandırılarak oluşturulmuş filogenetik dendogramı gösterilmiştir.



Şekil-2; İnsan anellovirüsleri ORF1 dizi varyasyonlarına dayandırılarak oluşturulmuş filogenetik dendogram (25).

ORF2'nin fonksiyonu anlaşılamamakla birlikte genotipe göre aminoasit sayısı değişmektedir. SENV-A, SENV-B, SENV-C, SENV-D, SENV-E, SENV-F, SENV-G ve SENV-H' de sırasıyla 166, 156, 157, 157, 152, 160, 146 ve 156 adet aminoasit içermektedir. ORF3 'ünde DNA topoizomeraz I enzimi ile benzer homolojiye sahip bir protein kodladığı ve viral replikasyonda rolü olduğu düşünülmektedir (17, 18).

2.1.2. Epidemiyoloji

SENV' nün 1999 yılında tanımlanmasından sonra yapılan çalışmalar incelendiğinde, dünya genelinde farklı coğrafi bölgelerde, farklı sıklıkta görüldüğü anlaşılmaktadır. SENV' nün tüm genotipleri insanlarda değişik oranlarda saptanmıştır. Tüm SENV' lerin ölçümü pratik bir yaklaşım değildir

ve SENV-D ve SENV-H' nin dışındaki diğer SENV genotiplerinin insanlarda hepatite neden olmadığı düşünülmektedir (1). Bu yüzden 2000 yılından sonra yapılan pek çok çalışmada SENV-D ve SENV-H üzerine odaklanılmıştır.

2.1.2.1. Sağlıklı Kan Vericilerinde SENV

Değişik coğrafi bölgelerde ve ülkelerde sağlıklı kan vericilerinde yapılan çalışmalarda SENV-D ve SENV-H sıklığının farklı olduğu dikkati çekmektedir. SENV-D sıklığının %0.5 ile %60.8 arasında, SENV-H sıklığının %0 ile % 85.8 ve SENV-D+H ko-enfeksiyon sıklığının ise %0 ile % 55.8 arasında değiştiği bildirilmektedir. İran'ın kuzey bölgesinde Karimi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, SEN-D (%60.8), SENV-H (%85.8) ve SENV-D+H (%55.8) sıklığının, daha sıcak iklimdeki Tahran merkezli yapılan diğer çalışmalara oranla daha yüksek çıkması, kullanılan metotların farklılığı ile ilişkili olabileceği gibi, aynı ülkede farklı iklim koşulları olan bölgelerde SENV'nin sıklığının farklı olabileceği, iklim ve çevresel koşullardan etkilenebileceği şeklinde vurgulanmıştır (26). İtalya'da ki bir çalışmada SENV pozitifliğinin erkek kan vericilerinde daha sık görülmesi, SENV'nin cinsel yolla bulaşabileceğini düşündürmüştür (27). SENV-D, SENV-H ve her iki virüsle koenfekte sağlıklı bireylerde klinik ve laboratuvar açıdan karaciğer hastalığını düşündürecek bulgu olmaması, SENV ' nin patojenitesi konusunda kuşku ile yaklaşmamız gerektiğini düşündürmektedir. Parenteral bulaş açısından herhangi bir risk taşımayan sağlıklı kan vericilerinde SENV' nün değişik oranlardaki sıklığı, asıl bulaş yolunun kan ve kan ürünleri olmasına karşın, diğer yollarla da bulaşabileceğini göstermektedir (26, 28). **Tablo-2'** de farklı ülkelerden kan vericilerindeki SENV-D, SENV-H, SENV-D+H ko-enfeksiyonu verileri özetlenmiştir. SENV-H oranının birçok çalışmada, SENV-D'ye göre daha yüksek olduğu dikkat çekmektedir.

Tablo-2: Sağlıklı kan vericilerinde SENV-D, SENV-H, SENV-D+H sıklığı
(* Oran belirtilmemiş)

Ülke	Örnek Sayısı	SENV-D %	SENV-H %	SENV-D+H %	Kaynak
Almanya	100	3.0	5	0	Umemura ve ark.(59)
Almanya	226	*	16.8	*	Schröter ve ark.(32)
Almanya	122	2.5	7.4	0	Sagir ve ark.(57)
Amerika	436	0.9	0.9	0	Umemura ve ark.(59)
Çek Cumh.	144	2.1	28.5	6.25	Thom ve ark.(20)
Çin	135	6.7	5	19	Mu ve ark.(64)
Gana	198	9.6	45.4	15.6	Thom ve ark(20)
İskoçya	192	0.5	10.9	1	Thom ve ark(20)
İskoçya	200	0.5	13	0	Thom ve ark(20)
İran	260	1.5	18.08	3.4	Sharifi ve ark.(58)
İran	120	60.8	85.8	55.8	Karimi ve ark.(26)
İran	60	10	13.3	*	Dehkordi ve ark.(28)
İtalya	99	9.1	24	*	Spataro ve ark.(27)
Japonya	277	7	3	10	Shibata ve ark(41)
Japonya	58	14	2	7	Umemura ve ark.(59)
Mısır	25	20	0	0	Mohamed ve ark(61)
Mısır	20	5	5	*	Samah ve ark (29)
Slovakya	100	10	15	1	Schreter ve ark (60)
Tayland	100	1	3	1	Tangkijv ve ark.(62)
Tayvan	120	18.3	5.8	*	Dai ve ark. 2005 (31)
Tayvan	223	19.7	5.8	*	Dai ve ark. 2004 (68)
Tayvan	200	32	30.5	11.5	Huang ve ark.(63)
Tayvan	43	16.3	23.4	7	Liu ve ark (33)
Türkiye	100	10	15	*	Serin ve ark.(56)
Türkiye	120	5	20	*	Tezcan ve ark(34)
Türkiye	43	*	16.2	*	Çakaloğlu ve ark(65)
Türkiye	100	5	16	*	Öğütmen ve ark(66)
Yunanistan	100	16	7	1	Umemura ve ark.(59)

2.1.2.2. Hemodiyaliz Hastalarında SENV

Hemodiyaliz hastaları kan yolu ile bulaşan hastalıklar açısından risk altında olan bir hasta grubudur. Bu hasta grubunda tedavi uygulamaları sıklıkla parenteral uygulamaları kapsar (18).

Mısır'da 63 hemodiyaliz, 20 hemodiyalize girmeyen kronik böbrek yetmezliği (KBY) hastası ve 20 sağlıklı kan vericisinin karşılaştırıldığı çalışmada, hemodiyaliz grubunda SENV-D %14.3, SENV-H %36.5, hemodiyalize girmeyen KBY hastalarında SENV-D %5, SENV-H %50, sağlıklı kan vericisi grubunda SENV-D %5 SENV-H %5 oranında saptanmıştır ve hemodiyaliz hastalarında SENV sıklığı anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p=0.003$). Hemodiyalize girmeyen KBY hastalarında SENV-H' nin yüksek bulunmasının nedeni, bu hastalarda invaziv girişimlerin sık olmasına dayandırılmıştır. Bu çalışmada SENV pozitifliği ile yaş, cinsiyet, hemodiyaliz süresi, karaciğer hastalığı arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Bazı hastalardaki ALT yüksekliği, anti-HCV pozitifliği ile ilişkilendirilmiştir (29). 189 hemodiyaliz hastası ve 60 kan vericisinin dahil edildiği başka bir çalışmada, SENV-D ve SENV-H DNA'sı hemodiyaliz hastalarında PZR yöntemiyle %38 pozitif bulunurken, kan vericilerinde ise bu oran %22 olarak saptanmış ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p=0.012$). Diğer çalışmada olduğu gibi bu çalışmadaki SENV pozitif hastalardaki ALT yüksekliğinin HCV ile ilişkili olduğu ancak SENV viremi ile ilişkili olmadığı saptanmıştır. Kan transfüzyonu sayısı ve hemodiyaliz süresinin HCV enfeksiyonu ile ilişkili olduğu ancak SENV enfeksiyonu ile ilişkisi olmadığı belirtilmiştir. SENV pozitif hemodiyaliz hastalarının %3'ünde, SENV negatif hemodiyaliz hastalarının %5' inde ALT yüksekliği görülmüş, SENV prevalansının hemodiyaliz hastalarında yüksek olmasına karşın, SENV ile hepatit arasında ilişki kurulamamıştır (30). Tayvan'da yapılan 99 hemodiyaliz hastası ve 120 sağlıklı kan vericisinin dahil edildiği çalışmada ise, hemodiyaliz grubunda SENV-D ve SENV-H sıklığı sırasıyla %46.5 ve %27.3 oranında saptanmış ve kontrol grubu olan sağlıklı kan vericilerine kıyasla oldukça yüksek bulunmuştur ($p<0.0001$). SENV-D'nin hem hemodiyaliz grubunda hem de kontrol grubunda daha yüksek olduğu

belirtilirken SENV sıklığı ile hemodiyaliz süresi ve transfüzyon öyküsü arasında bir ilişki kurulamamıştır. HCV-SENV ko-enfekte hastalarda interferon ya da interferon + ribavirin kombinasyonunun HCV ve SENV'yi eradike etmede yeterli ve etkin olduğu bildirilmiştir (31). Başka bir çalışmada 78 hemodiyaliz hastası ve 226 sağlıklı kontrol grubunda SENV-H DNA araştırılmıştır. SENV-H prevalansı hemodiyaliz hasta grubunda %12.8 ve sağlıklı kontrol grubunda %16.8 saptanmıştır. SENV-H viremisi olan vakalarda klinik ve biyokimyasal olarak karaciğer hastalığı bulguları saptanmadığı ve bu nedenle, SENV-H viremik hastalarda hemodiyaliz cihazlarının ayrılmasının gerekmediği bildirilmiştir (32). Liu ve arkadaşlarının Tayvan'da 119 hemodiyaliz hastası ve 43 sağlıklı kontrol grubunda yaptığı çalışmada şaşırtıcı sonuçlar bildirilmiştir. Hemodiyaliz grubunda SENV-D, SENV-H ve SENV-D+H oranı sırasıyla % 4.2, % 7.6, % 0.8 iken sağlıklı kontrol grubunda ise % 16.3, %23.4, % 7 olarak saptanmıştır. Hemodiyaliz grubunda, sağlıklı kontrol grubuna göre prevalans daha düşük bulunmuş ve istatistiksel olarak SENV infeksiyonu ile yaş, cinsiyet, kan transfüzyonu öyküsü, AST/ALT seviyesi, HBsAg durumu arasında bir ilişki bulunmadığı bildirilmiştir (33).

Ülkemizde, Tezcan ve arkadaşlarının Mersin Üniversitesi'nde yapmış oldukları çalışmada 100 hemodiyaliz hastası incelenmiş olup, SENV-D için %33, SENV-H için %22 pozitiflik saptanmıştır. 120 sağlıklı kan vericisinden oluşan kontrol grubunda SENV-D %5, SENV-H %20 oranındadır. SENV-D oranı hasta grubunda daha yüksek bulunurken ($p<0.05$), SENV-H oranında hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$) (34). **Tablo-3** de farklı ülkelerden hemodiyaliz hastalarındaki SENV-D, SENV-H ve SENV sıklığı verileri gösterilmiştir.

Tablo-3: Hemodiyaliz hastalarında SENV-D, SENV-H, SENV sıklığı

(* Oran belirtilmemiş)

Ülke	Örnek Sayısı	SENV-D %	SENV-H %	SENV %	Kaynak
Almanya	78	*	12.8	*	Shröter ve ark.(32)
Japonya	189	*	*	38	Kobashi ve ark(30)
İtalya	171	*	*	40.9	Pirovano ve ark(67)
Mısır	63	14.3	36.5	*	Samah ve ark.(29)
Mısır	60	*	*	45	Mohamed ve ark(61)
Slovakya	72	27.8	34.7	50	Schreter ve ark(60)
Tayvan	99	46.5	27.3	*	Dai ve ark.(31)
Tayvan	119	4.2	7.6	*	Liu ve ark.(33)
Tayvan	50	22	68	*	Kao ve ark(55)
Türkiye	100	33	22	55	Tezcan ve ark.(34)

2.1.2.3. Kan Transfüzyon Gereksinimi Olan Diğer Hastalarda SENV

Hemodiyaliz hastaları dışında özellikle hematolojik kanserli hastalar, talasemi hastaları ve cerrahi uygulanan hastalarda da sıklıkla kan ve kan ürünleri kullanılmaktadır.

İran'da Karimi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 120 sağlıklı kan vericisi ile 100 talasemik hasta SENV pozitifliği açısından araştırılmıştır. Talasemik hastalarda SENV-D, SENV-H, SENV-D+H oranları sırasıyla, % 86, % 93, % 81, kontrol grubunda ise % 60.8, % 85.8, % 55.8 olarak saptanmış ve talasemik hastalarda anlamlı düzeyde yüksek olduğu bildirilmiştir (p<0.05). SENV pozitif talasemik hastalarda ve kontrol grubunda, SENV negatiflere göre AST, ALT değerlerinde fark olmadığı görülmüştür. Sağlıklı kan vericilerinde ve talasemik hastalarda benzer SENV homolojisi görülmesi, sağlıklı kan vericilerinin, talasemik hastaları enfekte ettiğini ve SENV

bulaşında kan transfüzyonunun önemini göstermiştir. Diğer taraftan çalışmada sağlıklı kan vericilerindeki yüksek SENV pozitiflik oranı, bulaşta kan yolu dışındaki diğer yollarında olabileceği görüşünü desteklemektedir (26).

ABD’de kardiyak cerrahi yapılan hastalar operasyon sonrası SENV pozitifliği açısından incelenmiştir. Operasyon sırasında transfüzyon almayan hastalarda %3, transfüzyon alanlarda %30 oranında SENV DNA pozitiflik saptandığı bildirilmiştir. Hastanede transfüzyon almadığı halde SENV enfeksiyonu gelişen hastalar olması SENV’nin nozokomiyal olarak bulaşabildiğini düşündürmektedir. Transfüzyon sonrası enfekte olan hastaların %55’i enfeksiyondan 6 ay sonra ve %74’ünün de 5 yıllık izlemde SENV DNA’larının kaybolduğu saptanmıştır (1).

Ülkemizde hematolojik kanserli 80 hasta ile daha önce kan transfüzyon öyküsü olmayan farklı tanılarla hastanede yatan 80 gönüllü hastada yapılan çalışmada, hematolojik kanserli hastalarda SENV-D ve SENV-H sıklığı sırasıyla, %18.8, %30, kontrol grubunda ise %16.3, % 42.5 saptanmış, her iki grup arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p=0.111$). Transfüzyon öyküsü olmayan hastalarda yüksek SENV pozitifliği, başka bulaş yollarının olabileceğini düşündürmüştür. Çalışmada nötropenik hastalarda daha düşük oranda SENV viremisi saptanması, benzer çalışmalarda bağışık yetmezlikli hastalarda ve sık kan transfüzyonu alanlarda SENV sıklığının fazla olması, SENV’nin karaciğer dışında, kemik iliğinde de replike olabileceğini veya beyaz küreler ile taşınıyor olabileceğini düşündürmüştür. Ayrıca, hematolojik kanserli hastalara verilen kan ürünlerinin büyük bir kısmının ışınlanıyor ve lökosit filtresinden geçiriliyor olmasının SENV’nin geçişinin azalmasına neden olabileceği görüşü de vurgulanmıştır (35).

2.1.2.4. Non A-E Hepatitlerde SENV

Birçok araştırmacı etiyolojisi açıklanamayan non A-E hepatitlerinde SENV’lerin, özellikle SENV-D ve SENV-H genotiplerinin bu hastalarda rolü olabileceği hipotezini savunmuşlardır (1, 10, 17).

Çin’de Tang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 30 non A-E hepatit hastası ile 30 sağlıklı kan vericisi karşılaştırılmıştır. Non A-E hepatit

olgularının % 53.3'ünde, sağlıklı kan vericilerinin % 10'unda SENV DNA'sı tespit edilmiştir. Non A-E hepatit olgularında SENV' nün anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür ($p=0.0002$) (36). Umemura ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada transfüzyon sonrası non A-E hepatit gelişen 12 olgunun 11'inde (%92) SENV DNA pozitifliği saptanırken, transfüzyon almış ancak hepatit gelişmemiş 225 olgunun ise 55' inde (%24) SENV DNA pozitifliği bildirilmiştir. Bu iki grup karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.01$). SENV ile enfekte hastaların hepsinde hepatit gelişmemesine rağmen, bazı hastalarda posttransfüzyon hepatit nedeni olabileceği düşünülmüştür (1).

Japonya'da non A-E karaciğer hastalığı ile ilişkili 67 hastada (Hepatoselüler karsinom (HSK), siroz, kronik hepatit, akut hepatit) ve 49 kan vericisinde SENV DNA prevalansının araştırıldığı bir çalışmada; non A-E karaciğer hastalığı olan hastalarda SENV prevalansı yüksek bulunmuştur. Akut hepatitli hastalarda (%48), HSK' da (%42), sirozlularda (%57), kronik hepatitli (%56), kontrol grubunda (%28.6) SENV DNA saptanmış. Ancak SENV pozitif ya da SENV negatif olan karaciğer hastalarında klinik açıdan farklılık bulunmamıştır (37).

Ülkemizde, Serin ve arkadaşlarının ALT, AST değerleri yüksek HBV/HCV' si negatif 100 hasta ile ALT, AST değerleri normal HBV/HCV' si negatif 50 hastanın kontrol grubu olarak alındığı çalışmada; hasta grubunda SENV-D ve SENV-H oranı sırasıyla %5, %8 (toplam %13), kontrol grubunda ise %4, %6 (toplam %10) bildirmişlerdir. Hasta ve kontrol grubunda SENV sıklığında anlamlı bir fark olmadığı belirtilmiştir ($p>0.05$) (38).

2.1.2.5. SENV, HIV, HBV, HCV Koenfeksiyonu

İlk kez HIV pozitif bir hastada keşfedilen SENV için Sagir ve arkadaşlarının Almanya'da 217 HIV ile enfekte hasta üzerinde yaptıkları çalışmada, SENV-D %0.9, SENV-H %23 ve her ikisi ile birlikte enfekte olanların oranı ise %25.6 olarak gözlenmiştir. SENV-H'nin HIV pozitif hastalarda kan vericilerine göre daha yüksek oranda bulunduğu gösterilmiştir ($p<0.001$) (39). İtalya'da Pirovano ve arkadaşları ise İV ilaç kullanımı ile HIV

pozitif olan hastalarda SENV prevalansı %71, seksüel yolla HIV pozitif olan hastalarda SENV prevalansını %26 olarak saptamışlar ve parental bulaşın önemini vurgulamışlardır (40). SENV prevalansı kronik hepatit B ve C enfeksiyonlu hastalarda sağlıklı bireylerden yüksek bulunmuştur ($p < 0.0001$) (41). SENV ile koenfekte kronik HCV hastalarında, SENV'nin interferon alfa tedavisine yanıtı etkilemediği, tedavi alan hastalarda SENV DNA'nın negatifleştiği ve SENV'nin interferon alfa'ya duyarlı olduğu bildirilmiştir (42). SENV ile koenfekte kronik HCV hastalarında yapılan başka bir çalışmada, pegile interferon + ribavirin kombinasyon tedavisi alan koenfekte hastalarda ve SENV negatif kronik HCV hastalarında HCV eradikasyonunun değişmediği ve SENV'nin kombinasyon tedavisine yanıtı etkilemediği belirtilmiştir (43). SENV ile koenfekte kronik hepatit B hastalarında yapılan başka bir çalışmada ise SENV pozitifliğinin lamivudin tedavisine olan yanıtı da etkilemediği bildirilmiştir (44).

2.1.2.6. SENV ile İlgili Diğer Epidemiyolojik Çalışmalar

SENV'nin kan transfüzyonu olmayan bireylerde de yüksek oranda saptanıyor olması tek bulaş yolunun kan transfüzyonu olmadığı görüşünü desteklemektedir.

Anneden bebeğe SENV geçişi ile ilgili bir çalışmada, SENV pozitifliği olan 15 gebenin bebekleri doğum sonrası izlenmiş ve 13'ünde SENV pozitifliği saptanmıştır. Bunlardan bir bebek doğumda, sekiz bebek doğumdan sonraki altı ay içinde ve dört bebekte daha sonraki aylarda SENV DNA pozitifliği saptanmıştır. Anne ve bebeklerdeki SENV sekans homolojisinin benzer olması, SENV'nin vertikal yolla bulaşabileceğini düşündürmüştür. SENV pozitif bebeklerin gözleminde herhangi bir klinik bulguya rastlanmamıştır (45).

Karaciğer transplantlı 58 hasta üzerinde yapılan bir çalışmada, SENV pozitifliği %51.7 oranında saptanmış. SENV pozitif hastalardaki ALT yüksekliğinin SENV'den kaynaklanmadığı, bu hastalardaki HCV enfeksiyonu ile ilişkili olduğu düşünülmüştür. SENV ve HCV negatif hastalarda ALT yüksekliği görülmemiştir. SENV enfeksiyonunun karaciğer transplant alıcılarında daha sık görüldüğü ancak graft disfonksiyonuna neden olmadığı düşünülmektedir (46).

ABD'de San Francisco şehrinde 531 İV ilaç kullanıcısında, SENV A %45.7, SENV C/H %35.6, SENV D %10.3 oranında tespit edilmiş. İV ilaç kullanıcılarında sürekli maruziyetten dolayı SENV infeksiyon süresinin daha uzun olduğu belirtilmiştir (47).

Servikal biyopsi alınan 117 kadında, biyopsi sonucu servikal kanser çıkan 45 olgunun dördünde SENV pozitifliği saptanmış, biyopsi sonucu servisit tanısı konan 72 olgunun 22'sinde SENV pozitif bulunmuş. SENV serviks kanserli olgulara kıyasla servisit olgularında anlamlı derecede yüksek olarak gözlenmiştir ($p < 0.05$). Etiyolojisi bilinmeyen kronik servisit hastalarında SENV' nün rolü olabileceği ancak ileri çalışmalara gerek duyulduğu bildirilmiştir (48).

2.1.3. Patogenez

SENV ile ilgili ilk çalışmaları yapan Umemura ve arkadaşları SENV ile non A-E hepatitler arasında ilişki kurabilmek için, SENV'nin hepatotropik olduğunun ve hepatositler içinde replikasyonunun gösterilmesi gerektiğini belirtmişlerdir (1).

2001 yılında yapılan çalışmada hepatoselüler karsinomu olan iki hastada, tümör dokusu ve etrafındaki sağlam karaciğer dokusunu DNAaz işleminden geçirerek, hücresel ve viral DNA ortamdan uzaklaştırılmıştır. Ortamda kalan RNA'lardan revers transkriptaz enzimi ile komplementer DNA'lar (cDNA) elde edilmiştir. Hem tümürlü dokuda hem de sağlıklı karaciğer dokusunda SENV'ye ait cDNA ları göstererek SENV'nin karaciğerde replike olduğu ispatlanmıştır (1). Benzer bir çalışmayı Momosaki ve arkadaşları 2005 yılında yapmıştır. Çalışmada hepatosellüler karsinomu olan hastaların karaciğer dokuları incelenmiş, hem sağlam karaciğer dokusunda, hem de tümürlü dokuda SENV varlığı teyit edilmiştir (49).

Umemura ve arkadaşlarının aynı çalışmasında kan transfüzyonu öncesi SENV negatif olan ve kan transfüzyonu sonrası SENV infeksiyonu gelişen hastalar incelenmiştir. Kan transfüzyonu sonrasında PZR ile SENV tespitinin yaklaşık 4–8 hafta sonra olduğu belirtilmiştir. SENV viremili 31 hastanın 17' sinde SENV viremi 6 ay sürmüştü, üç hastanın iki yıl içinde SENV viremi

sona ermiş ve iki yıl sonunda viral klirens %65 olarak bildirilmiştir. Dört hastanın SENV viremisi 2–7 yıl devam etmiş, yedinci yılın sonunda viral klirens %77 saptanmıştır. Geriye kalan 7 hastada ise SENV viremisinin 12 yıla kadar devam ettiği belirtilmiştir. Bu hastalardan ikisinin aynı zamanda non A-E hepatit hastası olduğu, bu hastalardaki SENV viremisinin en az 4–8 yıl devam ettiği ve kronik ALT yüksekliğinin de eşlik ettiği bildirilmiştir. SENV bu hastalarda kronik non A-E hepatiti ile ilişkilendirilmiştir (1).

SENV genomundaki hipervariabl bölgeleri ile yüksek mutasyon yeteneğine sahiptir ve yıllarca viremi yapabilmektedir. Bu özelliği ile diğer DNA virüslerinden ziyade HCV gibi RNA virüslerine benzetilmiştir (50).

Umemura ve arkadaşlarının çalışmasında kan transfüzyonu sonrasında non A–E hepatit gelişen 12 hastanın 11 inde (%92), transfüzyon öncesi SENV negatif iken, transfüzyon sonrası SENV pozitifliği gelişmesi, ayrıca SENV viremi düzeyi ile ALT yüksekliğinin paralel olması, SENV' nün hepatit ile ilişkilendirilmesindeki en güçlü kanıt gibi durmaktadır. Ancak transfüzyon sonrası SENV pozitif olan olguların çoğunda hepatit gelişmemesi, sağlıklı kan vericilerinde yüksek oranda SENV saptanması, SENV pozitif non A–E hepatitli olgu sayısının az olması, SENV ile hepatit arasında ilişkinin kesinleşmesinde kuşku oluşturmaktadır (1).

SENV ile hastalık arasında nedensel bir ilişki kurmak zordur. Bu mikroorganizmalar patojen olmayabilir ya da bakterilerde olduğu gibi normal viral flora üyesi olabilirler. Bağışıklığı normal olan bireylerde, hepatit A ve hepatit B infeksiyonlarında olduğu gibi SENV bazı kişilerde semptomatik bazı kişilerde ise asemptomatik seyir gösterebilir ya da kazanılmış bağışıklık yetmezliği durumu gibi özel durumlarda patojen olabilirler. Çalışmalar sonrası oluşan SENV non A–E hepatit ya da ekstrahepatik hastalık etkeni midir, eğer öyleyse sıklığı ve klinik önemi nedir, hastalık etkeni ise kan vericilerinde SENV testi yapılmalı mıdır gibi soruları yanıtlamak için ise veriler henüz yetersizdir (1).

2.1.4. SEN Virüsünün Laboratuvar Tanısı

SENV ilk kez Diasorin araştırma merkezinde geliştirilen DNA enzime immunoassay (DEİA) yöntemi ile tespit edilmiştir. Bu yöntemde viral DNA PZR ile çoğaltılmakta, sonrasında biotinle işaretlenmiş problarla EİA yöntemi ile saptanmaktadır (17, 47). Sonraki yıllarda EİA yönteminden daha duyarlı ve özgün olduğu kabul edilen genotip spesifik PZR yöntemleri ön plana çıkmıştır. SENV tespitinde PZR-Southern blot, single step PZR sonrası ethidium bromid jel elektroforez, yarı nested PZR, nested PZR ve çalışmamızda olduğu gibi gerçek zamanlı PZR (real time PZR) yöntemleri kullanılabilir (9, 10, 43).

Kojima ve arkadaşları genel SEN-V izleme ve genotip spesifik teknik adı verilen 2 PZR tekniğini geliştirmişlerdir. PZR izleme ile gösterilen bütün SEN-V genotiplerinin ve SEN-V ile ilişkili sekansların özgüllüğü 20/20'dir (%100). Genotip spesifik PZR ile SENV-D ve SENV-H'nin özgüllüğü 7/7 (%100) ve 7/11 (%64) olarak bildirilmiştir. SEN-V'nin tespit edildiği PZR yönteminin duyarlılığı kullanılan primerlere bağlıdır. SEN-V prevalansının; aynı hastalarda farklı primerleri kullanan araştırmacıların çalışmalarında, değişik oranlarda olduğu görülmektedir. Bunun nedeni SENV genomundaki yüksek heterojenitedir (10,18).

SENV infeksiyonlarında infeksiyonun seyrini izlemede, akut, kronik ayırımı yapmada henüz SENV antikorlarının tespiti için geliştirilmiş serolojik bir test yoktur. Umemura ve arkadaşları, SENV antikorlarının tespitine yönelik serolojik testlerin geliştirilmesinin SENV'yi daha iyi anlamamıza yardımcı olacağını belirtmişlerdir (1, 17).

2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Tekniği

Tıp biliminde moleküler tanı yöntemleri içinde geniş uygulama alanına sahip olan PZR ilk kez 1983 yılında Karry Mullis tarafından tanımlanmıştır. Aynı tarihte Karry Mullis' in *Thermus aquaticus*' dan izole ettiği *Taq* DNA polimerazın PZR tekniğinde başarı ile uygulanması, spesifik DNA bölgelerinin in vitro şartlarda çoğaltılmasını mümkün hale getirmiştir.

PZR, nükleik asitlerin in vitro şartlarda replikasyonu için geliştirilmiş, bir test tüp 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' da, in vivo çoğalma örnek olarak alınmıştır. Yalnızca DNA polimeraz enzimi yardımı ile genomun tamamı değil, spesifik bölgelerin kopyalanması gerçekleştirilir. PZR çalışmalarında reaksiyonunun gerçekleşmesi için küçük miktarda hedef DNA (1-100 ng kadar) içeren örnek, çalışma solüsyonu içerisine ilave edilir. Daha sonra örnekteki hedef çift sarmal (ds) DNA'nın, tek sarmal (ss) DNA'ya dönüştürülmesi sağlanır (denatürasyon). Tek sarmal DNA iplikçiklerinin karşıtı, 2030 baz çifti (bç) uzunluğundaki sentetik oligonükleotit diziler, RNA/DNA heterodupleksini oluşturmak üzere primer gibi kullanılır. Spesifik bir bölgenin amplifikasyonu için hedefi sınırlamak amacıyla ikinci primer kullanılır. Primerler den birisi ssDNA zincirinde başlatıcı bölgeyi oluştururken, ikincisi de diğer zincir üzerinde sonlandırıcı bölgeye bağlanır (annealing). *Taq* DNA polimeraz enziminin yardımıyla, primerlerin bağlandığı bölgeden itibaren her ssDNA zincirinin komplementeri oluşturulur (extension). Böylece iki adet dsDNA oluşur. Oluşan dsDNA'lar, yeni amplifikasyon için kalıp görevini üstlenirler. Bu işlem 30 siklus tekrarlandığında birkaç saat içerisinde, hedefin milyarlarca kopyası elde edilebilir (52).

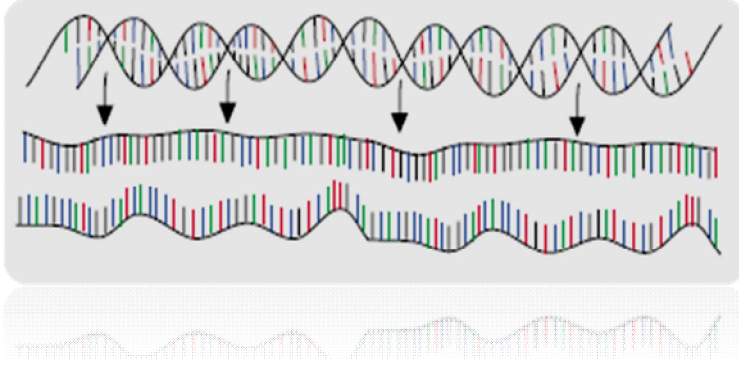
PZR temel olarak tekrarlayan üç aşamalı bir yöntemdir. Bunlar;

1-Denatürasyon: Çift iplikli DNA'nın birkaç saniye 94-96°C ısı ile tek iplikli DNA'ya ayrılmasıdır. Bazı çalışmalarda; amplifikasyon siklusları başlamadan önce 3-5 dakikalık bir ön denatürasyon işleminin, özellikle denatürasyonu zor olan kalıp DNA'lar için yararlı olduğu bildirilmiştir.

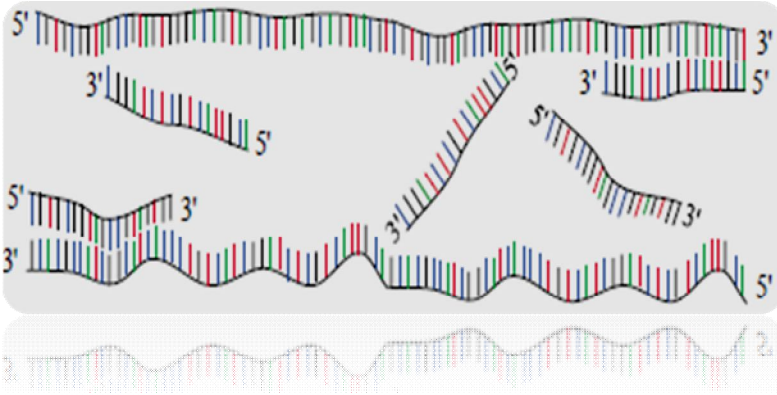
2-Bağlanma (annealing): Örnek, birkaç dakika 30-60°C'de tutularak, primerin (spesifik sentetik oligonükleotitler) ssDNA'daki hedef bölgelere hibridizasyonu sağlanır. Bu, hidrojen bağlarının yardımı ile olur. Bağlanma ısı sadece DNA/DNA eşleşmesine imkan sağlayacak kadar yüksek olmalıdır. Isı, primerlerin yapısı ve Tm derecelerine göre hesaplanarak

optimize edilebilirse de, yaklaşık olarak 20 bç uzunluğuna sahip primerlerin kullanılması halinde 54°C olarak belirlenmesi optimal sonuçları vermektedir.

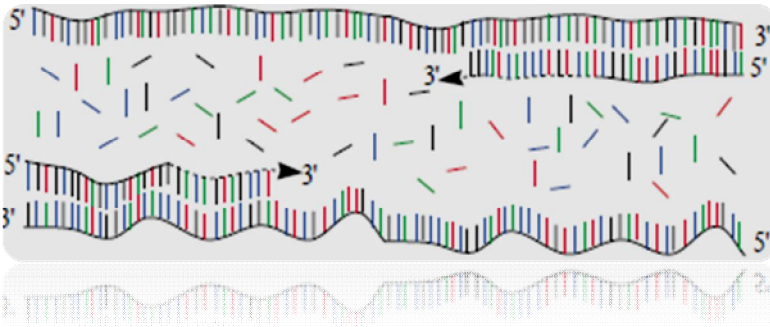
3-Uzama (extension): Polimeraz enzimi yardımı ile ssDNA kalıplarına bağlanan primerlerin 5'—3' yönde uzatılmasıdır. Uzama işlemleri 65-72°C'de birkaç dakika içinde gerçekleşir. **Şekil-3'** de PZR' ın temelini oluşturan üç basamak gösterilmiştir.



1. Aşama
Denatürasyon



2. Aşama
Primer
Bağlanması



3. Aşama
Uzama

Şekil-3: PZR basamakları (51)

Bağlanma sikluslarını takiben, orijinal DNA segmenti yeni komplementer DNA'lar ve yeni kalıp DNA'lar oluşturur. Böylece her PZR siklusunda mevcut spesifik DNA miktarı iki katına çıkar. Bu işlem 30 defa tekrarlanarak milyardan fazla hedef DNA eldesi mümkün hale gelir. Eğer örnekte rRNA veya mRNA araştırılacaksa; o zaman RT-PZR kullanılır. Önce reverz transkriptaz ve bir primer yardımı ile RNA'dan cDNA üretilir. Meydana gelen rRNA/cDNA heterodupleksi, polimeraz enziminin RNaz aktivitesi ile parçalanır. cDNA tek iplikçik haline döner. Bağlanma sırasında, cDNA'daki hedef diziyeye bağlanan primer, *Taq* DNA polimeraz için hedef haline gelir ve uzamayı başlatır. Böylece 30 siklus sonunda milyarlarca rRNA üretilir. Amplifikasyondan sonra PZR ürünleri genellikle agaroz jel üzerindeki kuyucuklara yüklenir ve daha sonra elektroforez uygulanır (52).

2.2.1. PZR Tipleri

2.2.1.1. Multipleks PZR

PZR teknolojisinin bir versiyonu olan multipleks PZR yöntemi, birçok enfeksiyonun tanısında kullanılmaya başlanmıştır. Bu yöntemle; amplifikasyon tüpü içerisine klinik örnekte bulunabilecek her mikroorganizma veya aynı bakteri geni üzerindeki farklı hedef bölgeler için özgül olan primerler kullanılarak, çok sayıda hedef aynı zamanda çoğaltılabilmektedir. Her bir primer çiftine özgül, farklı büyüklükteki amplifikasyon ürünlerinin agaroz jelde gözlenmesi ile klinik örnekte mikroorganizmaların varlığı ve identifikasyonu aynı anda yapılabilmektedir (53).

2.2.1.2. "Broad-Range" PZR veya "Consensus" PZR

Bu yöntemde, bütün patojenler veya bir cinsin tüm türleri için ortak olan gen bölgesini çoğaltabilecek özellikte bir çift primer ile amplifikasyon yapılmaktadır. Takiben ya amplikonun baz dizi analizi yapılarak veya belirli bir patojene özgül proba hibridizasyon uygulanarak spesifik etkenin tanısı konulmaktadır (53).

2.2.1.3. "Nested" ve "Semi-Nested" PZR

İki aşamalı amplifikasyon yöntemleridir. "Nested" PZR' de, ilk aşamada iki adet dış (outer) primer kullanılarak hedef molekül üzerinde uzunca bir bölgenin amplifikasyonu yapılmaktadır (15-30 siklus). Sonra bu amplifikasyon tüpünden alınan örnekteki DNA'nın daha kısa bir bölümü iç (inner) primerlerle çoğaltılmaktadır (15-30 siklus). Örnekte tek bir hedef DNA molekül bulunsa bile, iki aşamalı olarak yapılan amplifikasyonlarla çok sayıda DNA elde etmek mümkün olmaktadır. Böylece amplifikasyon sonucu oluşan fazla miktardaki hedef molekül -herhangi bir yalancı negatiflik olmadan- kolayca gözlenebilmektedir. Bu yöntemler ile pozitif sonuç alma olasılığı arttığı için testin duyarlılığı da artmaktadır. Duyarlılığın çok yüksek olmasına bağlı olarak gözlenebilen önemli bir dezavantaj; birinci amplifikasyondan sonra tüpteki DNA ikinci amplifikasyon tüpüne aktarılırken, ürün çok az miktarda dahi çevreye saçılırsa sonraki denemelerde hava yolu ile kontaminasyona yol açabilmektedir.

Nested PZR' nin ilk aşamasında "broad-range" PZR, ikinci aşamasında multipleks PZR uygulanarak, klinik örneklerde bulunabilecek birden fazla mikroorganizmanın aynı anda, duyarlı bir şekilde saptanması mümkün olabilmektedir (53).

2.2.1.4. "IN SITU" PZR

PZR ile ilgili çalışmalarda diğer önemli bir aşama, lam üzerine tespit edilen enfekte hücrede bulunan mikroorganizmaya ait hedef DNA'nın amplifikasyonu ve sonucun "in situ" hibridizasyon ile gösterilmesidir. Bu yöntemin en önemli avantajı, amplifikasyon hücre içinde gerçekleştiği için amplikonlara bağlı kontaminasyon olmamasıdır (53).

2.2.1.5. "Real -Time" PZR

Nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresans sinyalin ölçülmesiyle kısa sürede, kantitatif sonuç verebilen PZR yöntemidir. PZR' ın her döngüsünde, reaksiyon sırasındaki amplikon üretimini, floresan yayılımını indikatör olarak kullanarak, klasik kantitatif PZR yöntemlerine zıt bir şekilde, end-point deteksiyonu görüntüler. Real-time PZR kantitasyonu PZR

sonrası işlemleri ortadan kaldırır. Bu da daha duyarlı sonuçların elde edilmesine olanak sağlarken, aynı zamanda kontaminasyon riskini azaltır ve potansiyel hata kaynağı olan PZR sonrası işlemleri elimine eder. Diğer yandan Real-time PZR konvansiyonel PZR ile karşılaştırıldığında, $10^1 - 10^8$ gibi çok daha geniş bir dinamik aralığı saptar. Dinamik aralığın genişlemesi kantitasyonun doğruluğunu daha da arttırmıştır.

Real-time PZR sistemi floresan reporterin deteksiyonu ve kantitasyonu esasına bağlıdır. Bu sinyal artışı reaksiyondaki PZR ürün miktarı ile doğru orantılıdır. Her döngüde floresan emisyon miktarının kaydı ile, eksponansiyel fazda PZR ürün miktarında ilk anlamlı artış ile başlangıç hedef "template" miktarı arasındaki bağlantıya bağlı olarak reaksiyonu görüntülemek mümkündür.

Real-time teknolojisi reaksiyonun erken evrelerinde amplifikasyonun saptanmasına olanak verir. Reaksiyon kinetiğinin erken evrelerde saptanabilmesi geleneksel PZR yöntemlerine göre belirgin bir avantaj sağlar. Geleneksel yöntemlerde son evrede ya da reaksiyonun son noktasında amplifikasyon ürününün saptanması için agaroz jel kullanılır. Agaroz jel sonuçları reaksiyonun son noktasında elde edilir. Son nokta saptaması (endpoint detection) çok zaman alıcıdır. Sonuçlar bazen günlerce elde edilemez; çok doğru olmayan büyüklük ayırımına dayalıdır. Son nokta örnekten örneğe değişkenlik gösterir.

Real-time PZR kısa sürede kantitatif sonuç verebilmektedir. Tüpler açılmadan tanıya gidildiği için kontaminasyon riski düşüktür. Ayrıca floresan veren probalar kullanılarak hedef nükleik asitteki mutasyonlar saptanabilmektedir (53).

2.2.1.6. "Hot – Start" PZR

Normal PZR protokolünde amplifikasyon karışımı hazırlanırken hedef DNA ve primerler arasında özgül olmayan bağlanmalar olabilmekte, bu bağlanmaların polimeraz enzimi ile uzatılması sonucunda çok sayıda istenmeyen bant ortaya çıkabilmektedir. Bunu önlemek için geliştirilmiş olan "hot-start" PZR tekniğinde temel maddelerden (Polimeraz, nükleotitler, Mg^{2+} 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 bandı elde edilir (53).

2.2.1.7. "Touchdown" PZR

"Touchdown" PZR, optimal primer bağlanma derecesini saptamak amacıyla geliştirilen bu yöntemde, bağlanma sıcaklığı, sikluslar arasında, 1-2°C düşürülerek uygun derece belirlenmekte ve bu sıcaklıkta kalan amplifikasyon siklusları tamamlanmaktadır. Amplifikasyonun ilk siklusunda, bağlanma derecesi olarak, hesaplanan T_m derecesinin yaklaşık 15°C üzerinden başlanmakta, takip eden sikluslar esnasında 1-2 derece düşürülerek T_m derecesinin takriben 5°C üzerine kadar gelinmektedir. Böylece hedef bölgeye özgü ampikonlar elde edilmektedir (53).

3. OLGULAR, GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Olgular

3.1.1. Hemodiyaliz Grubu

25/02/2011 ile 25/02/2012 tarihleri arasında Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi hemodiyaliz ünitesinde ve Manisa ilinde onayı alınan üç hemodiyaliz merkezinde tedavi gören 70 erkek, 30 kadın toplam 100 kronik hemodiyaliz hastası çalışmaya dahil edilmiştir.

3.1.2. Hemodiyaliz Grubu Dışlama Kriterleri

- 1) 18 yaşından küçük olmak.
- 2) Gebe olmak.

3.1.3. Kontrol Grubu

25/02/2011 ile 25/02/2012 tarihleri arasında Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi kan merkezine bağış için başvuruda bulunan, kan transfüzyonu ile bulaşan infeksiyon hastalıkları açısından herhangi bir risk faktörü bulunmayan ve tarama testleri negatif olan, 70 erkek, 30 kadın toplam 100 sağlıklı kan vericisi çalışmaya dahil edilmiştir.

3.1.4. Kontrol Grubu Dışlama Kriterleri

- 1) 18 yaşından küçük olmak.
- 2) Gebe olmak
- 3) VDRL, HBsAg, Anti-HCV, Anti-HIV testlerinin herhangi birinde pozitiflik.

3.1.5. Serum Örneklerinin Alınması ve Saklanması

Çalışmaya alınan olgulara yaş, cinsiyet, meslek gibi sosyodemografik bilgileri, ne kadar süredir ve ne sıklıkta hemodiyaliz uygulandığı, ne sıklıkta kan transfüzyonuna ihtiyaç duydukları, HBV, HCV, HIV seropozitiflikleri, karaciğer sirozu, hepatosellüler karsinom ve eşlik eden diğer hastalıkların varlığını belirleyen bir anket formu doldurulmuştur. Hemodiyaliz ve kontrol grubunda yer alan her olgudan, çalışma hakkında bilgilendirilme ve onamlarının alınmasını takiben, yaklaşık 8-10 ml kadar kan örneği alındı. Serumun ayrılması için kan örnekleri 5.000 devir/dakikada, üç dakika santrifüj edildi. Tüpün üst kısmından ayrılan serumlar çalışmanın gerçekleşeceği zamana kadar steril eppendorf tüplerine konularak -20°C' de saklandı.

3.1.6. Verilerin Toplanması ve İstatistik

Hemodiyaliz ve kontrol grubuna ait veriler "SPSS 15.0 for Windows" istatistik programı kullanılarak değerlendirildi. Hasta ve kontrol grubundaki olguların yaş, cinsiyet, meslek gibi sosyodemografik bilgileri, ne kadar süredir ve ne sıklıkta hemodiyaliz uygulandığı, ne sıklıkta kan transfüzyonuna ihtiyaç duydukları, HBV, HCV, HIV seropozitiflikleri, karaciğer sirozu, hepatosellüler karsinom ve eşlik eden diğer hastalıkların varlığını belirleyen bilgiler programa kayıt edildi. Hastaların sosyal sınıflandırılmasında Boratav sosyo-ekonomik sınıflandırılması kullanılmıştır (51).

İstatistiksel analizler için ki-kare (χ^2) testi kullanıldı. Çalışmada $p < 0.05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.1.7. Çalışma Yeri

Çalışmamız Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı seroloji laboratuvarında yapılmıştır.

3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

Çalışmada aşağıda türü, cinsi, markası yazılı olan araç ve gereçler kullanılmıştır.

- Soğutmalı Hettich Rotina 35 R santrifüj cihazı
- Soğutmalı Hettich EBA 21 mikro santrifüj cihazı
- Smart Accumax 100 – 1000 µl mikropipet
- Smart Accumax 10 – 100 µl mikropipet
- Arçelik marka buzdolabı (maximum soğutma -20)
- Grenier bio-one FT 1000 G pipet ucu
- Grenier bio-one FT 100 G pipet ucu
- Grenier bio-one FT DNAaz ve RNAaz'dan arındırılmış steril eppendorf tüpü
- Cat VM3 220 V 50 Hz vorteks cihazı
- GFL 1092 Benmari cihazı
- Mikro pipet Seti (Gilson- PİPETMAN- P 10-P100-F1000)
- Thermo scientific nanodrop 2000 spektrofotometre cihazı
- Eppendorf 5430 plate santrifüj cihazı
- Roche® marka Light cycler 480-2 PZR cihazı
- Roche® marka viral nükleik asit izolasyon kiti:
 - 1) Binding Buffer (Bağlayıcı tampon): Guanidium-HCl, TritonX-100
 - 2) Proteinaz K
 - 3) Poly A: RNA taşıyıcı Poly(A)

- 4) Removal Buffer (İnhibitör uzaklaştırıcı tampon); Guanidium-HCl
 - 5) Wash Buffer (Yıkama tamponu); NaCl, Tris-HCl
 - 6) Eluation Buffer (Elüsyon tamponu); Nükleazdan arındırılmış, steril ve 2 kez damıtılmış su
 - 7) Toplayıcı tüpler
 - 8) Filtreli tüpler
- Roche[®] marka Lightcycler PZR kiti:
 - 1) Enzim: (Taq polimeraz + kofaktör olarak magnezyum)
 - 2) Primerler: Çalışmada kullanılan primerler Sagir ve arkadaşlarının real-time PZR yöntemini kullandıkları çalışmadaki makaleden seçilmiştir (43). SENV-D için primerler ORF1 bölgesindeki 76 bazlık korunmuş bölgeye göre, SENV-H için primerler ORF1 bölgesindeki 69 bazlık korunmuş bölgeye göre hazırlanmıştır.
 - a) SENV-D' nin sense (F1) primer dizilimi
CCAGACTTTRTGCAAAGTTCCTCTTG (R = A/G)
 - b) SENV- D' nin antisense (R1) primer dizilimi
GTGGTGAGCAGAACGGATGTT
 - c) SENV-H'nin sense (F1) primer dizilimi
GGTTAACCKSAGCTGACTTCA (K= G/T; S = G/C)
 - d) SENV-H' nin antisense (R1) primer dizilimi
GGAAGGTGTAGCAAGGGTTGTC
 - 3) İşaretleyici molekül (Taqman prob):
SENV-H için floresan TaqMan® işaretleyici molekülü:
(5'-FAM TTTCCGTTCTGCTCACCAAAA3'TAMRA)
SENV-D için floresan TaqMan® işaretleyici molekülü:
(5'-FAM AACTTTGCGGTCAACTGCCGCTG3'TAMRA)
 - 4) DNAaz ve RNAaz dan arındırılmış, steril moleküler grade su.

3.3. Yöntem

SENV'nin tespitinde henüz SENV antikorlarını saptamaya yönelik geliştirilmiş serolojik bir test yoktur (1). SENV tespitinde PZR-Southern blot, single step PZR sonrası ethidium bromid jel elektroforez, yarı nested PZR, nested PZR ve çalışmamızda olduğu gibi gerçek zamanlı PZR (real time PZR) yöntemleri kullanılabilir (9, 10, 43). Nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı artan floresans sinyalin ölçüm esasına dayanan gerçek zamanlı PZR yönteminin üç ticari tipi bulunmaktadır. Bunlar Lightcycler, Taqman ve İcycler'dır. Gerçek zamanlı PZR ile kısa sürede kantitatif sonuçlar elde edilebilmekte ve tüpler açılmadan sonuç alınabildiği için kontaminasyon riski düşük olmaktadır (53). Çalışmamızda Lightcycler gerçek zamanlı PZR tekniği kullanılmıştır. İşlemimiz DNA ekstraksiyonu ve PZR uygulaması olmak üzere iki aşamada gerçekleştirilmiştir.

3.3.1. DNA Ekstraksiyon Aşaması

Roche marka viral nükleik asit izolasyon kitindeki kullanım kılavuzunda belirtilen kurallara ve aşamalara dikkatle uyularak spin kolon yöntemi ile DNA ekstraksiyonu yapıldı. Hemodiyaliz grubu ve kontrol grubuna ait serum örnekleri farklı günlerde ve yirmişerli gruplar halinde çalışılarak kontaminasyon oranı en aza indirilmeye çalışıldı. DNA ekstraksiyon aşamaları aşağıda belirtildiği şekilde uygulanmıştır.

- Çalışmaya dahil edilen hasta serumları -20°C ' den çıkartılarak oda sıcaklığında eriyene dek bekletildi.
- Eriyen serum örneklerinin homojen olması için vorteks işleminden geçirildi.
- Proteinaz K ve polyA -20°C ' den çıkartılarak oda sıcaklığında eriyene kadar bekletildi. Kullanıldıktan sonra da proteinaz K ve polyA tekrar -20°C 'ye kaldırıldı.
- Eppendorf tüpünün içerisine 2500 μl bağlayıcı tampon konuldu. Aynı eppendorf tüpün içine 50 μl polyA konularak karıştırıldı.

- Hazırlanan karışım, her bir hasta için 200 µl' ler şeklinde ayrı eppendorf tüplerine dağıtıldı. Bu tüplere 50 µl proteinaz K konularak karıştırıldı.
- Hazırlanmış olan her bir karışımın içerisine ayrı ayrı hastaların 200 µl serumu filtreli mikropipet uçları değiştirilerek konuldu ve tekrar karıştırıldı. Eppendorf tüplerinin üzerine örnek sıra numaraları yazıldı.
- Karışımlar 72°C' de 10 dakika bekletildi.
- Ardından kapaklar açılarak her bir karışımın üzerine 100 µl bağlayıcı tampon eklendi.
- Her bir örnek için toplayıcı tüpün içine geçecek şekilde filtreli tüpler yerleştirildi.
- Karışımlar her bir hasta için hazırlanmış olan filtreli tüplerin içerisine pipetlenerek konuldu.
- 8000 xg' de bir dakika santrifüj edildi.
- Toplayıcı tüplerin içerisinde biriken karışımlar toplayıcı tüpler ile birlikte atıldı.
- Filtreli tüpler hiçbir yere değdirilmeden yeni toplayıcı tüplerin içine konuldu.
- Filtreli tüplerin kapakları açılarak üzerlerine 500 µl inhibitör uzaklaştırıcı tampon eklendi ve 8000 xg' de bir dakika santrifüj edildi.
- Toplayıcı tüplerin içerisinde biriken karışımlar, toplayıcı tüpler ile birlikte atıldı.
- Filtreli tüpler herhangi bir yere konulmadan yeni toplayıcı tüplerin içine konuldu.
- Filtreli tüplerin kapakları açılarak 450 µl yıkama tamponu eklendi ve 8000 xg' de bir dakika santrifüj edildi.
- Toplayıcı tüplerin içerisinde biriken karışımlar toplayıcı tüpler ile birlikte atıldı.
- Yıkama işlemi 450 µl yıkama tamponu ile bir kez daha tekrar edildi.
- Toplayıcı tüplerin içerisinde biriken karışımlar toplayıcı tüpler ile birlikte atıldı.

- Filtreli tüpler herhangi bir yere değdirilmeden yeni toplayıcı tüplerin içeresine konuldu.
- 13000 xg' de bir dakika santrifüj edildi.
- Toplayıcı tüpler atıldı ve filtreli tüpler eppendorf tüplerinin içine yerleştirildi.
- Filtreli tüplerin içlerine 50 µl elüsyon tamponu konuldu.
- 8000 xg bir dakika santrifüj edildi.
- Filtreli tüpler atıldı. Eppendorf tüpler içinde kalan viral nükleik asit PZR aşamasına kadar -20°C' ye konularak saklandı.

200 µl serum içine ← PolyA ile karıştırılmış 200 µl bağlayıcı tampon

+

50 µl proteinaz K



72 °C' de 10 dakika bekletilir

+

100 µl bağlayıcı tampon



Örnek toplayıcı tüpler içindeki filtreli tüplere aktarılır



8000 devirde 1 dakika santrifüj edilir



Toplayıcı tüpler atılır, filtreli tüpler yeni toplayıcı tüplere yerleştirilir



← 500 µl uzaklaştırıcı inhibitör tampon

8000 devirde 1 dakika santrifüj edilir



Toplayıcı tüpler atılır, filtreli tüpler yeni toplayıcı tüplere yerleştirilir

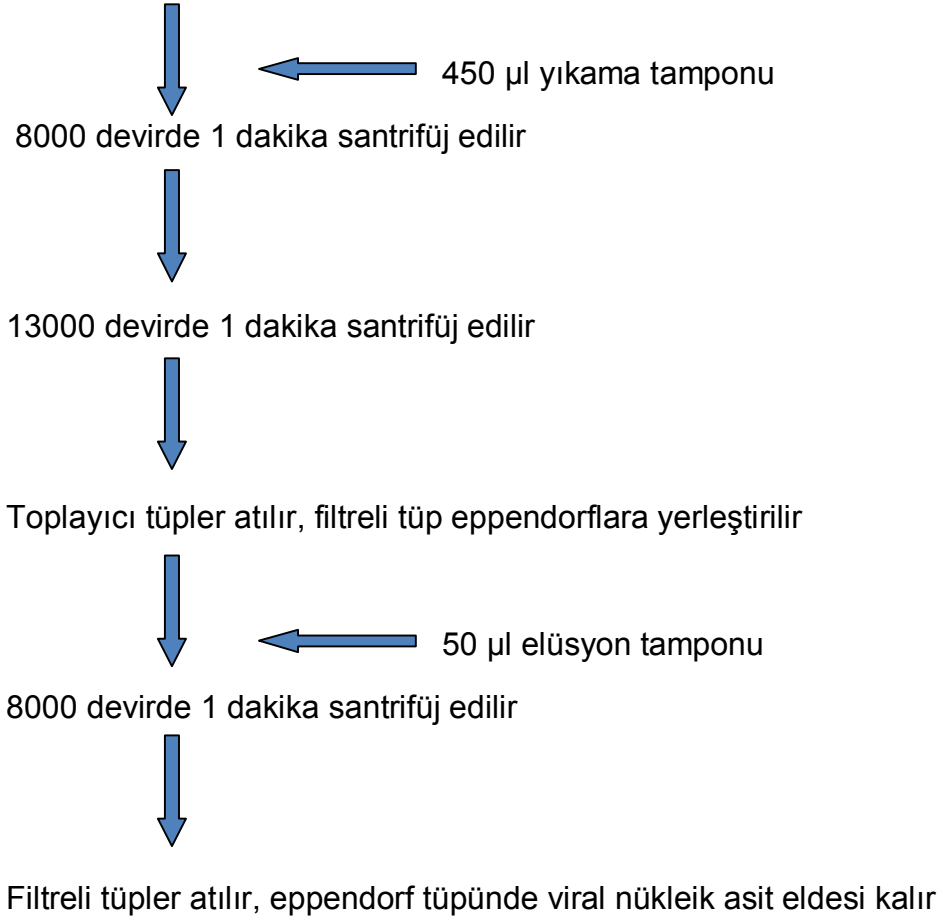


← 450 µl yıkama tamponu

8000 devirde 1 dakika santrifüj edilir



Toplayıcı tüpler atılır, filtreli tüpler yeni toplayıcı tüplere yerleştirilir



Şekil-4: Kullanım kılavuzuna göre DNA ekstraksiyon aşamaları

3.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Aşaması

PZR aşaması öncesinde izole edilen DNA'nın 260 nanometrede spektrofotometre ile DNA konsantrasyonu ve saflığı kontrol edilerek, yeterli ve uygun DNA varlığı tespit edildi. PZR aşamaları aşağıda belirtildiği şekilde uygulandı.

- Liyofilize halde bulunan primerler ve proplar 100 μ M olacak şekilde sulandırıldı.
- Çalışmada bir kuyucuk içerisinde primerler 0.5 μ M, Taqman probu ise 0.2 μ M konsantrasyonunda olması gerektiği için, hacimsel işlemlerin kolaylaştırılması için, 100 μ M konsantrasyondaki primer ve Taqman proplarını 20 μ M konsantrasyonda olacak şekilde su ile seyreltildi.
- Her bir reaksiyon 10 μ l' lik bir hacimde gerçekleşeceği için hacim hesabı yapılarak her bir hasta için reaksiyon bileşenleri, pipetlerin ucu değiştirilerek **Tablo-4'** de gösterildiği sıra ile hazırlandı.

Tablo-4: SENV-D ve SENV-H için PZR reaksiyon bileşenleri

	SENV-D	SENV-H
Reaksiyon Bileşenleri	Kullanılacak Miktar (μ l)	Kullanılacak Miktar (μ l)
Moleküler Grade Su	1.90	1.90
Primer 1 (Forward) (20 μ M)	0.25	0.25
Primer 2 (Reverse) (20 μ M)	0.25	0.25
Taqman probu (20 μ M) (işaretleyici molekül)	0.1	0.1
Enzim karışımı (2x)	5	5
DNA örneği	2.5	2.5
Toplam	10	10

Bu karışımlar 50 reaksiyonluk parçalar halinde karıştırılarak hazırlandı. Her bir plate kuyucuğuna bu karışımdan 7.5 μ l dağıtıldı, ardından 2.5 μ l DNA örneği eklendi. Sonrasında buharlaşmayı minimize etmek için plate' in açıkta kalan üst kısmı seffaf bir folyo ile kaplandı (sealing foil). Ardından plate

santrifüj kullanılarak 2500 rpm' de 10 saniye santrifüj edildi. Tek bir PZR çalışmasında 2 ayrı 50 reaksiyonluk karışım hazırlandı. 96 kuyucuklu plate kullanılan işlemde, bir tanesi negatif kontrol olmak kaydıyla SENV-D ve SENV-H için 48 örnek incelendi. Bu işlem toplam 4 kez tekrarlandı. Kalan örnekler ise 5. bir PZR reaksiyonunda incelendi.

PZR işlemi için hazırlanan karışım Light cycler 480-2 PZR cihazına yerleştirildi, problar 6-FAM (6-carboxyfluorescein) boyası ile işaretli olduğu için tanımlama kanalı olarak 465- 510 nm dalga boyunda olan FAM kanalı seçildi. Amplifikasyon aşamaları **Tablo-5'** de belirtildiği sırayla uygulandı ve sonuçlar elde edildi.

Tablo-5: Amplifikasyon basamaklarının sıcaklık, süre ve döngü sayısı

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre (saniye)	Döngü Sayısı
Ön ısıtma (Başlangıç denatürasyonu)	95	600	1
Denatürasyon	95	10	45
Primer bağlanması (Annealing)	55	30	
Zincir uzaması (Elongasyon)	72	1	
Soğuma (Cooling)	40	30	1

4. BULGULAR

4.1. Hasta ve Kontrol Grubunun Genel Özellikleri

Yaptığımız çalışmada 100 kronik hemodiyaliz hastası ile 100 sağlıklı kan vericisinden oluşan kontrol grubunun serum örnekleri SENV-D ve SENV-H sıklığı açısından real-time RZR yöntemi ile çalışıldı.

Çalışmamıza hasta grubunda 100, kontrol grubunda 100 olmak üzere toplam 200 kişi dahil edilmiştir. 100 hasta grubunun 70'i (%70) erkek, yaş ortalaması 47.5 ± 10.1 yıl, 30'u (%30) kadın ve yaş ortalaması 46.5 ± 9.3 yıl ve olguların yaş dağılımı 22 ile 62 arasında, 100 kontrol grubunun ise 70'i (%70) erkek, yaş ortalaması 44.7 ± 5.9 yıl, 30'u (%30) kadın yaş ortalaması ise 45.8 ± 8.9 yıl olduğu ve olguların yaş dağılımının 25 ile 59 arasında olduğu saptanmıştır.

4.2. Hasta ve Kontrol Grubunda SENV-D, SENV-H ve SENV-D+H Sıklığı

Hasta grubunda yer alan hastaların %28'i SENV-D viremisi açısından pozitif saptanırken, kontrol grubunda ise SENV-D viremisi pozitifliği %12 saptanmıştır. SENV-D sıklığı açısından hasta grubunda daha yüksek bir pozitiflik saptanmış olup, her iki grup arasında bu ilişki anlamlı bulunmuştur ($p=0.038$).

SENV-H viremisi açısından ise hasta grubunda %53 pozitiflik saptanmış olup, kontrol grubunda ise %58 pozitiflik saptanmıştır. Her iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0.760$).

SENV-D+H ko-enfeksiyon sıklığı incelendiğinde ise hasta grubunda %20 pozitiflik saptanırken, kontrol grubunda ise %9 pozitiflik saptanmıştır. Her iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0.080$). Hasta ve kontrol grubundaki SENV-D, SENV-H ve SENV-D+H sıklığı **Tablo-6'** da gösterilmiştir. Hasta grubunda toplam SENV pozitifliği (en az bir genotip

pozitifliği) %81 iken, kontrol grubunda toplam SENV pozitifliği %70 olguda saptanmış olup, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (p=0.071). SENV-H pozitifliği hem hasta hem de kontrol grubunda SENV-D'ye göre daha yüksek olarak saptanmıştır.

Tablo-6: Hasta ve kontrol grubunda SENV-D, SENV-H ve SENV-D+H sıklığı

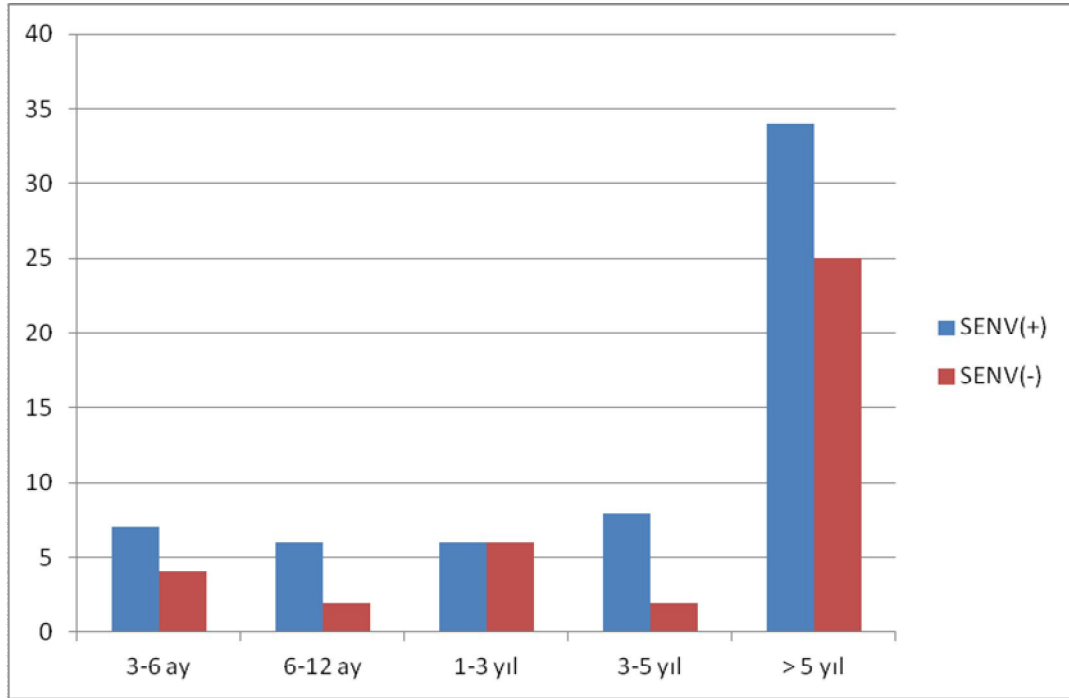
Çalışma grubu	SENV-D (+) %	SENV-H (+) %	SENV-D+H (+) %
Hasta grubu (n=100)	28	53	20
Kontrol grubu (n=100)	12	58	9
p değeri	0.038	0.760	0.080

4.3. Hemodiyaliz Süresine Göre SENV Sıklığı

Hemodiyaliz uygulanma süresi uzadıkça, hastaların parenteral uygulamalara maruz kalma oranı artmaktadır. Hasta grubunda hastaların büyük kısmının (%59) beş yıldan daha uzun süredir hemodiyaliz hastası olduğu dikkat çekmektedir. En az bir SENV genotipi ile enfekte olan hastalar ve SENV negatif hastalar arasında hemodiyaliz süresi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (p=0.541). **Tablo 7'**de hemodiyaliz uygulanma süresine göre SENV sıklığı verilmiştir. Tablo-7'nin grafiksel görünümü **Şekil-5'**de gösterilmiştir.

Tablo 7: Hemodiyaliz süresi ve SENV sıklığı

Hemodiyaliz Süresi	SENV (+)		SENV (-)		Toplam		p değeri
	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)	
3-6 ay	7	63.6	4	36.4	11	100	0.541
6-12 ay	6	75	2	25	8	100	
1-3 yıl	6	50	6	50	12	100	
3-5 yıl	8	80	2	20	10	100	
> 5 yıl	34	57.6	25	42.4	59	100	



Şekil-5: Hemodiyaliz süresine göre SENV sıklığı

4.4. Hasta Grubunda Hepatit B ve C Enfeksiyonu Olanlarda SENV Sıklığı

Yaptığımız bu çalışmada hasta grubu olarak seçtiğimiz 100 hemodiyaliz hastasının dördünde HBV(+) pozitif, iki hastada ise HCV(+) saptanmıştır. HBV + HCV ko-enfeksiyonuna rastlanmamıştır. HBV(+) dört hastanın üçünde SENV-H(+) iken hiçbirinde SENV-D pozitifliğine rastlanmamıştır. HCV (+) iki hastadan bir tanesinde SENV-H pozitif iken yine SENV-D varlığına rastlanmamıştır. HBV(+) ya da HCV(+) olan hastalar, kan yoluyla bulaşan hastalık taşımayan, yani HBV ve HCV'si negatif olan hastalarla karşılaştırıldığında SENV varlığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (p=0.707).

4.5. Yaş ve Cinsiyetlere Göre SENV Sıklığı

Çalışmaya alınan hasta grubu ve kontrol grubu birlikte değerlendirildiğinde, SENV(+) olguların yaş ortalamasının, SENV(-) olguların yaş ortalaması ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (p=0.077) **Tablo-8**'de SENV(+) ve SENV(-) olguların yaş ortalaması verilmiştir.

Tablo-8: SENV(+) ve SENV(-) olguların ortalama yaşı

SENV Varlığı	Ort.yaş ± std	p değeri
SENV (+) (n = 122)	47.0 ± 8.3	0.077
SENV (-) (n = 78)	44.7 ± 8.9	

SENV pozitifliği cinsiyetler açısından karşılaştırıldığında, erkeklerde SENV pozitifliğinin daha yüksek olduğu görülmüştür (p=0.037). **Tablo-9**'da cinsiyetlere göre SENV sıklığı gösterilmiştir.

Tablo-9: Cinsiyetlere göre SENV sıklığı

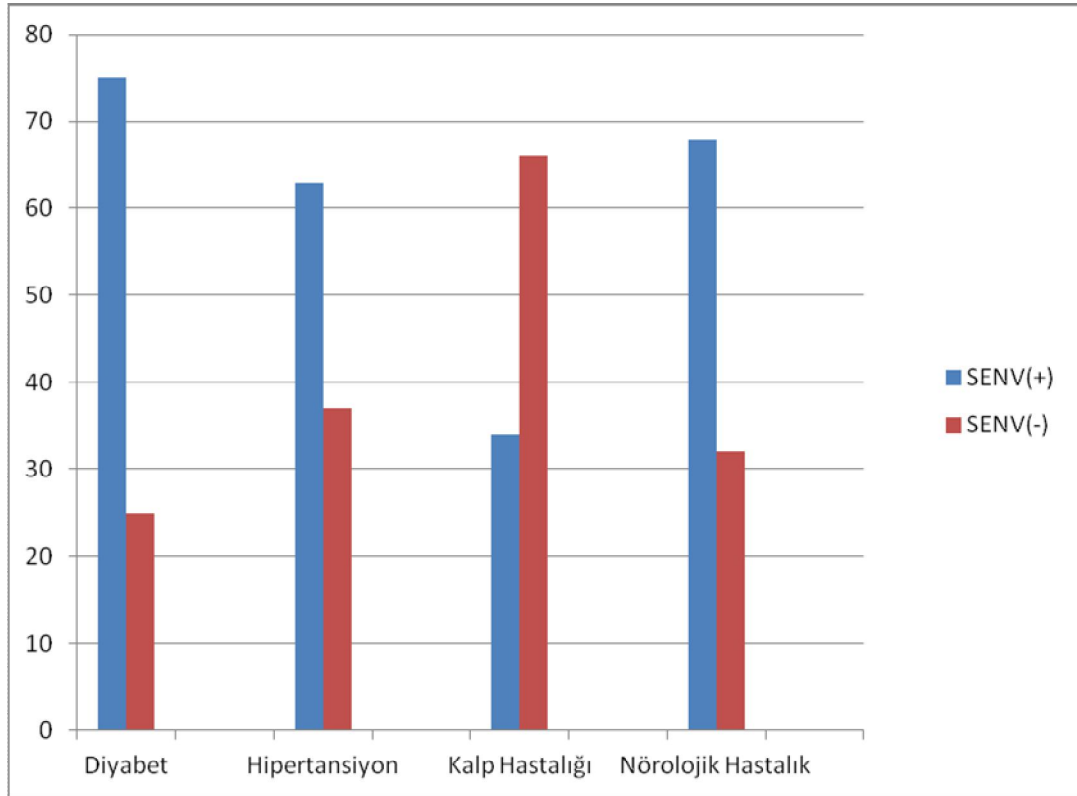
Cinsiyet	SENV(+)		SENV(-)		Toplam		p değeri
	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)	
Erkek (n = 140)	92	65.7	48	34.3	140	100	0,037
Kadın (n = 60)	30	50	30	50	60	100	
Toplam (n = 200)	122	61	78	39	200	100	

4.6. Hasta Grubunda Kronik Hastalık Varlığı ve SENV Sıklığı

Hasta grubu olarak seçtiğimiz 100 hemodiyaliz hastasının aynı zamanda %44'ünde eşlik eden en az bir kronik hastalık bulunduğu görülmüştür. Bu hastaların %20'sinde diyabet, %16'sında hipertansiyon, %3'ünde kalp hastalığı, %5'inde ise nörolojik bir hastalık olduğu saptanmıştır. Kronik hastalık varlığı ile SENV sıklığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0.192$). **Tablo-10**'da hasta grubunda kronik hastalık varlığı durumunda SENV sıklığı ve mevcut ek hastalık tanılarına göre SENV sıklığının grafiksel görünümü **Şekil-6**'da sunulmuştur.

Tablo-10: Hasta grubunda kronik hastalık varlığı ve SENV sıklığı

Kronik Hastalık Varlığı	SENV(+)		SENV(-)		Toplam	
	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)
Evet	30	68.2	14	31.8	44	100
Hayır	31	55.4	25	44.6	56	100
p değeri = 0.192						



Şekil-6: Hasta grubunda kronik hastalık tanılarına göre SENV sıklığı

4.7. Hasta ve Kontrol Grubundaki Olguların Sosyo-Ekonomik Özellikleri ve SENV Sıklığı

Hem hasta grubuna, hem de kontrol grubuna anketimizde yönelttiğimiz sorularla, çalışmaya katılan olguların sosyodemografik yapısı incelenmiştir. Eğitim durumu, iş, sosyal güvence, gelir düzeyi, ikamet edilen konut tipi sorgulanmıştır. Sosyal sınıf belirlemede Boratav'ın skalası kullanılmıştır (54). Olguların sosyo-ekonomik özellikleri ile SENV varlığı arasında, belirtilen parametreler doğrultusunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. **Tablo-11**'de olguların sosyo-ekonomik özellikler ile SENV sıklığı oranları belirtilmiştir.

Tablo-11: Sosyo-ekonomik özellikler ve SENV sıklığı

Sosyo-ekonomik Özellik		SENV(+)		SENV(-)		Toplam		p değeri
		(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)	
Eğitim	İlk öğretim / altı	88	59.5	60	40.5	148	100	0.451
	Lise / üzeri	34	65.4	18	34.6	52	100	
Sosyal Sınıf	Alt sosyal sınıf	72	61	46	39	118	100	0.995
	Üst sosyal sınıf	50	61	32	39	82	100	
Sosyal Güvence	SGK	113	60.8	73	39.2	186	100	0.794
	Yeşilkart	9	64.3	5	35.7	14	100	
Gelir Düzeyi	Gelir az	35	63.6	20	36.4	55	100	0.844
	Gelir=Gider	83	59.7	56	40.3	139	100	
	Gelir fazla	4	66.7	2	33.3	6	100	
Ev Tipi	Apartman Dairesi	76	59.4	52	40.6	128	100	0.227
	Müstakil Ev	44	66.7	22	33.3	66	100	
	Gecekondu	2	33.3	4	66.7	6	100	

5. TARTIŞMA

Etiyolojisi açıklanamayan infeksiyöz hepatit olgularında etken olabileceği öne sürülen SENV ile ilgili ilk çalışmalar İtalyan araştırmacı Dr. Daniel Primi ve ekibi tarafından yapılmıştır (7). 2001 yılında Umemura ve arkadaşlarının SENV'nin hem tümoral hem de sağlıklı karaciğer dokusunda saptaması virusun hepatotropik olduğunu düşündürmüştür. Kan transfüzyonu yapılan hastalarda, verici kanları ile benzer aminoasit diziliminde SENV varlığının gösterilmesi ise SENV'ün kan nakli ile bulaştığını ve posttransfüzyon hepatitinden sorumlu olabileceğini ortaya koymuştur (1).

SENV'nin birçok genotipi olmasına rağmen özellikle SENV-D ve SENV-H'nin sıklıkla kan transfüzyonu ile bulaşabileceği ve diğer genotiplere göre daha patojen olabilecekleri belirtilmiştir (1, 10, 32).

Çeşitli yayınlarda SENV'nin kan yolu ile bulaştığının vurgulanması nedeni ile çalışmamızda hasta grubunu sıklıkla parenteral uygulamalara ve kan transfüzyonuna gereksinim duyan kronik hemodiyaliz hastaları, kontrol grubunu ise parenteral bulaş açısından daha düşük riske sahip olan sağlıklı kan vericileri oluşturmuştur. Hasta grubunda yer alan hastaların %28'i SENV-D açısından pozitif saptanırken, kontrol grubunda ise pozitiflik %12 olarak bulunmuştur. SENV-D sıklığı açısından hasta grubunda daha yüksek pozitiflik saptanmış olup istatistiksel olarak her iki grup arasındaki ilişki anlamlıdır ($p=0.038$). SENV-H sıklığı ise hasta grubunda %53, kontrol grubunda ise %58 olarak saptanmış ve her iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0.760$). SENV-D ve SENV-H ko-enfeksiyon sıklığı değerlendirildiğinde ise pozitiflik hasta grubunda %20, kontrol grubunda ise %9'dur ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p=0.080$). Hasta grubunda toplam SENV pozitifliği %81 iken, kontrol grubunda ise bu oran %70 olup, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı

bir fark bulunmamıştır ($p=0.071$). SENV-H viremi hem hasta hem de kontrol grubunda SENV-D'ye göre daha yüksek düzeydedir.

Ülkemizde Mersin ilinde Tezcan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, 100 hemodiyaliz hastası ile 120 sağlıklı kan vericisi çalışmaya dahil edilmiş, hasta grubunda SENV prevalansı %55 (%33'ü SENV-D ve %22'si SENV-H) kontrol grubunda ise %25 (%5'ü SENV-D ve %20'si SENV-H) olarak saptanmıştır (34). Hemodiyaliz uygulanan hastalardan elde edilen sonuç sağlıklı kan vericilerinden elde edilen sonuç ile karşılaştırıldığında, hemodiyaliz hastalarındaki SENV-D pozitiflik oranları hasta ve kontrol grubunda farklı olarak bulunmuştur ($p<0.05$), SENV-H pozitiflik oranları ise hasta ve kontrol grubunda farklı değildir ($p>0.05$). Çalışmalarında sonuç olarak SENV sıklığının hemodiyaliz hastalarında kontrol grubuna göre oldukça yüksek olduğu belirtilerek bu durumun hemodiyaliz hastalarına uzun süreli kan transfüzyonu ve parenteral ilaç uygulamalarından kaynaklanabileceği öne sürülmüş ve SENV bulaşmasında parenteral yolun önemi vurgulanmıştır. Bizim çalışmamızda ise, SENV prevalansı hasta grubunda % 81, kontrol grubunda ise % 70 olarak bulunmuş ve her iki grup arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p=0.071$). SENV'nin tanımlanmasından itibaren yapılan birçok çalışmada, SENV'nin parenteral yolla bulaştığı belirtilmesine rağmen, transfüzyon ve invazif girişim riski olmayan sağlıklı kan vericilerindeki yüksek SENV prevalansları SENV bulaşmasındaki temel yolun yalnızca parenteral yolla geçiş olmadığını düşündürmektedir. Tezcan ve arkadaşlarının çalışmasında olduğu gibi bizim çalışmamızda da SENV-D sıklığı hasta grubunda anlamlı düzeyde yüksek iken, SENV-H oranları her iki grupta da benzerdir. Çalışmamızda SENV-D sıklığının hemodiyaliz hastalarında yüksek saptanması, SENV-D'nin primer bulaş yolunun parenteral yol olduğunu düşündürmektedir.

Serin ve arkadaşlarının Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde sağlıklı kan vericilerinde SENV-D ve H genotipini araştırdıkları, 100 olgunun dahil edildiği çalışmada ise SENV-D, SENV-H ve SENV prevalansı % 10, %15, %25 olarak tespit edilmiştir (56). Bu çalışmada da SENV-H varlığının

bizim çalışmamızda olduğu gibi parenteral yolla bulaş riski olmayan kişilerde SENV-D'ye göre daha yüksek olduğu görülmektedir.

İstanbul'da Çakaloğlu ve arkadaşlarının 85 kronik viral hepatitli hasta (30 HCV, 30 HBV, 25 HDV) ve 43 sağlıklı kan vericisinde SENV- H viremisini araştırdıkları çalışmada; sağlıklı kan vericilerinde SENV-H prevalansı %16.2 olarak saptanmıştır (65).

Yine İstanbul'da Öğütmen ve arkadaşlarının 100 sağlıklı kan vericisi ve 43 periton diyalizi hastasında SENV-D ve H varlığının araştırıldığı çalışmada, periton diyalizi uygulanan hastalarda SENV-D ve H sırasıyla, %23.2, % 20.9, sağlıklı kan vericilerinde ise % 5, % 16 olarak saptanmıştır (66). SENV-D periton diyalizi uygulanan hastalarda, sağlıklı kan vericilerine göre anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p=0.001$). Bu çalışma ile hasta grubumuz farklı olsa da, periton diyalizi hastalarının invaziv girişimlere, hemodiyaliz hastalarında olduğu gibi sık maruz kaldıkları bilinmektedir.

Yaptığımız çalışmada Manisa ilinde hem hasta hem de kontrol grubunda SENV pozitifliğinin ve özellikle SENV-H pozitifliğinin Mersin ve İstanbul'da yapılan çalışmalardaki sonuçlara göre daha yüksek olması, SENV ve SENV genotiplerinin aynı ülkede, farklı coğrafi bölgelerde, farklı dağılım sergileyebileceğini düşündürmektedir. Bizim çalışmamızda yöntem olarak bahsi edilen çalışmalarda kullanılan jel elektroforez yerine, farklı bir yöntem olan gerçek zamanlı PZR yöntemi veya farklı primerlerin kullanılmış olması da böyle bir sonucun nedeni olabilir.

2011 yılında İzmir Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde Aktaş ve arkadaşlarının çalışmasında, hemodiyaliz hastaları gibi sık kan transfüzyonu ve parenteral uygulamalara maruz kalan hematolojik kanserli hastalarda SENV varlığı araştırılmıştır. Hematolojik kanserli 80 hasta ile daha önce kan transfüzyon öyküsü olmayan, farklı tanılarla hastanede yatan 80 gönüllü hastada yapılan çalışmada, hematolojik kanserli hastalarda SENV-D ve SENV-H sıklığı sırasıyla, %18.8, %30, kontrol grubunda ise %16.3, %42.5 saptanmış, her iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0.111$). Çalışmacılar, bağışık yetmezlikli ve sık kan transfüzyonu uygulanan olgularda SENV sıklığının yüksek olmasına karşın nötropenik hastalarda

daha düşük oranda SENV pozitifliği saptanmasını, SENV'nin karaciğer dışında, kemik iliğinde de replike olabileceği veya beyaz küreler ile taşınıyor olabileceği şeklinde açıklamışlardır (35). Aynı yöntemi kullanmış olmamıza rağmen bizim çalışmamızdaki daha yüksek SENV pozitifliğinin, hasta gruplarının farklı olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Ayrıca, Aktaş ve arkadaşlarının çalışmasında belirtildiği gibi, hematolojik kanserli hastalara verilen kan ürünlerinin büyük bir kısmının ışınlanıyor ve lökosit filtresinden geçiriliyor olması SENV geçişinin azalmasına neden olmuş olabilir. Aktaş ve arkadaşlarının kontrol grubunda SENV-D (%16.3) sıklığının, çalışmamız kontrol grubundaki SENV-D (%12) sıklığına göre nispeten yüksek olması, grubun kan transfüzyon öyküsü olmasa da hastanede yatan hastalardan oluşması ve SENV' ün olası nozokomiyal bulaşından kaynaklanmış olabilir. Yine kontrol grubunda, SENV-H sıklığının bizim çalışmamızda (%58), Aktaş ve arkadaşlarının çalışmasından (%42.5) daha yüksek düzeyde bulunması, aynı coğrafi bölgede olan farklı şehirlerde bile SENV dağılımının farklı olabileceğini düşündürmektedir.

Dünyada SENV ile ilgili diğer çalışmalar incelendiğinde; aynı ülkenin farklı coğrafik bölgelerinde, farklı SENV prevalansları izlenmektedir. Dai ve arkadaşlarının çalışmasında Tayvan'ın güney bölgesindeki hemodiyaliz hastalarında SENV, SENV-D, SENV-H prevalansı %61, %46.5, %27.3 olarak saptanmış ve sağlıklı kan vericilerine göre daha yüksek olduğu görülmüştür (31). Tayvan'ın doğu bölgesinde Liu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise hemodiyaliz hastalarında, SENV, SENV-D, SENV-H prevalansı %10.9, %4.2, %7.6, sağlıklı kan vericilerinde ise %32.6, %16.3, %23.4 olarak bildirilmiş ve hemodiyaliz hastalarında SENV prevalansının sağlıklı kan vericilerine göre daha düşük olduğu gözlenmiştir (33). Hasta grubunda düşük olmasının nedeni farklı coğrafi bölgelerde dağılımın farklı olabileceğinin yanısıra, virüsün bulaşmasında parenteral yol dışında farklı bulaş yollarının da rol oynayabileceği şeklinde açıklanmıştır. Liu ve arkadaşları hemodiyaliz hastalarındaki düşük SENV prevalansının Tayvan'da hemodiyaliz cihazlarının dezenfeksiyonunda % 6'lık hipoklorit sodyum kullanılması ile ilişkili olabileceğini belirtmişlerdir (33).

Tayvan gibi bir diğerk uzak doğu ÷lkesi olan Japonya'da Kobayashi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, hemodiyaliz hastalarında SENV prevalansı %38, sağlıklı kan vericilerinde ise %22 olarak bildirilmiştir (30). Hemodiyaliz hastalarındaki SENV viremisinin yüksek olmasının, Japonya' da zaten toplumda SENV pozitifliğinin yüksek olması ile ilişkili olabileceği ve bu yüksekliğinde virüsün bulaşmasında parenteral yol dışında fekal-oral yolunda rol oynamasından kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir. Kobayashi ve arkadaşları SENV(-) hemodiyaliz hastalarının izlemlerinde, kan transfüzyonu yapılmamasına rağmen, hastalarda SENV(+)'liği saptamışlar, ayrıca hemodiyaliz uygulanması sırasında kullanılan araçların tek kullanımlık olmasından dolayı, hemodiyaliz uygulaması esnasında SENV bulaşının zor bir olasılık olduğunu vurgulamışlardır (30). Kao ve arkadaşları akut hepatit A infeksiyonu geçirenlerde sağlıklı erişkinlere göre yüksek SENV pozitifliği saptamış olmaları fekal-oral yol gibi parenteral olmayan bulaş yolu hipotezini desteklemektedir (55).

Çalışmamızda SENV-H genotipinde hemodiyaliz ve sağlıklı kan vericileri arasından anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0.760$). Almanya'da Schröter ve arkadaşlarının çalışmasında hemodiyaliz hastaları ile sağlıklı kan vericilerinde SENV-H varlığı araştırılmış, her iki grup arasında kendi çalışmamızda olduğu gibi SENV-H sıklığının benzer olduğu gör÷lmüştür. SENV-H(+) hastalarda klinik ve biyokimyasal olarak karaciğerk hastalığına rastlanmamış ve HCV(+) hastalarda eşlik eden SENV(+) liğinin herhangi bir klinik kötüleşmeye neden olmadığı, HCV(+) hastalarda olduğu gibi SENV(+) hastalarda diyaliz cihazlarının ayrılmasına gerek olmadığını belirtmişlerdir (32).

Sağlıklı kan vericilerinde SENV ve SENV genotiplerinin sıklığı ÷lkeler arasında da farklılık göstermektedir. SENV-D sıklığı %0.5 ile %60.8 arasında, SENV-H sıklığı %0 ile % 85.8, SENV-D ve SENV-H ko-enfeksiyon sıklığı ise %0 ile % 55.8 arasında değişmektedir. Amerika ve Avrupa ÷lkelerinde SENV-D ve SENV-H prevalansının Afrika ve Asya ÷lkelerine göre daha düşük olduğu dikkat çekmektedir (Tablo 2). Farklı kıtalarda birçok ÷lkede yapılan çalışmalarda ve kendi ÷lkemizdeki çalışmalarda olduğu gibi bizim

çalışmamızda da sağlıklı kan vericilerinde SENV-H, SENV-D'ye göre daha yüksek oranda saptanmıştır. Sağlıklı kan vericilerinde yüksek oranda SENV viremi olmasına rağmen, klinik ve biyokimyasal olarak herhangi bir hastalık oluşturduğuna ilişkin kanıt olmaması, SENV'nin klinik önemi ve patojenliği hakkında kuşku oluşturmaktadır. Bağışıklığı normal olan bireylerde, HAV, HBV, CMV, EBV enfeksiyonlarında olduğu gibi SENV bazı kişilerde semptomatik bazı kişilerde ise asemptomatik enfeksiyon oluşturuyor ya da kazanılmış bağışık yetmezliği gibi özel durumlarda virulan bir klinik seyir gösteriyor olabilir (1). Bu nedenle, SENV ile ilgili henüz aydınlanmamış birçok soruya yanıt verebilmek için daha geniş çalışmalara gerek vardır.

HBV ve HCV gibi parenteral yolla bulaşan virüsler, hemodiyaliz hastalarında sağlıklı bireylere göre daha sıktır. Çalışmamızda hemodiyaliz hastalarında HBV ve HCV ile SENV birlikteliği arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p=0.707$). Hemodiyaliz hastalarında yapılan birçok çalışmada da HBV ve HCV ile SENV sıklığı arasında bir ilişki görülmemiştir (31, 32, 55, 60). Ülkemizde Öğütmen ve arkadaşlarının yaptığı, hasta grubu olarak hemodiyaliz hastalarında olduğu gibi sık parenteral uygulamalara maruz kalan periton diyalizi hastalarının dahil edildiği çalışmada da SENV ile HCV arasında bir birliktelik saptanmamıştır (66). Liu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada SENV(+) hemodiyaliz hastalarında HCV pozitifliği daha düşük bulunmuş ve bunun nedenini HCV(+) hastaların diyaliz cihazlarının ayrılması ile ilişkili olabileceğini belirtmişlerdir (33).

Hemodiyaliz süresi ile SENV pozitifliği arasındaki ilişkiye bakacak olursak, çalışmamızda hemodiyaliz hastalarının büyük bir kısmının (%59) beş yıldan daha uzun süredir hemodiyalize girdiği görülmektedir. Daha uzun süreden beri hemodiyaliz uygulanan hastaların daha çok parenteral girişime maruz kalmasına rağmen, bizim çalışmamızda hemodiyaliz süresi ile SENV pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p=0.541$). Bu durum yine SENV bulaşın da parenteral yol dışında diğer bulaş yollarının yer alabileceği görüşünü desteklemektedir. Farklı ülkelerde hemodiyaliz hastalarında yapılan diğer tüm çalışmalarda, hemodiyaliz süresi ile SENV sıklığı arasında bir ilişki saptanmamıştır (29, 30, 31, 32, 61, 67).

Çalışmamız verileri cinsiyetlere göre incelendiğinde SENV pozitifliğinin, erkeklerde kadınlara göre yüksek olduğu gözlenmiştir (Erkeklerde: %65.7 Kadınlarda: %50) Kobayashi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da erkeklerde SENV viremisi kadınlara göre daha yüksek bulunmuştur (30). Bu durum SENV bulaşın da cinsel yolun önemli olabileceğini düşündürmektedir. SENV prevalansının sağlıklı bireylerde hem bizim çalışmamız hem de ülkemizdeki diğer çalışmalarda yüksek olarak tespit edilmiş olması, Japon toplumunda olduğu gibi, SENV'nin ülkemizde de sık rastlanabilen bir etken olduğunu ve bulaşmasında parenteral yol dışında diğer bulaş yollarının da yer alabileceği görüşünü desteklemektedir.

SENV pozitifliği ile yaş faktörü incelendiğinde çalışmamızda istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmemiştir ($p=0.077$) Farklı ülkelerde yapılan birçok çalışmada, çalışmamızda olduğu gibi SENV ile yaş arasında bir ilişki kurulamamıştır (29, 30, 33, 61, 67).

Çalışmamızda hemodiyaliz hastalarında eşlik eden kronik hastalık (diyabet, hipertansiyon, kalp hastalığı, nörolojik hastalık gibi) varlığı ile SENV pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p=0.192$). Sonuçlar, bu tür hastalıkların varlığında hem parenteral hem de invaziv işlemlerin daha sık uygulanıyor olmasına karşın hemodiyaliz hastaları bu işlemler açısından zaten risk grubunda olduğundan eşlik eden kronik hastalıkların ayrı bir risk yaratmadığı şeklinde yorumlanmıştır.

Thom ve arkadaşlarının İskoçya, Çek Cumhuriyeti ve Gana'da SENV-D ve SENV-H prevalansını araştırdıkları çalışmada, Gana'da her iki genotipinde İskoçya ve Çek Cumhuriyeti'ne göre daha yüksek olması, coğrafi farklılığın, iklim koşullarının, ülkelerin gelişmişlik düzeylerinin ve sağlık şartlarının dünyadaki SENV dağılımında etkili olabileceği şeklinde açıklanmıştır (20). Bu nedenle çalışmamızda olguların eğitim, sosyal sınıf, sosyal güvence, gelir düzeyi gibi sosyo-ekonomik özellikleri de bir anket formu aracılığı ile sorgulanmış ancak bu özellikler ile SENV pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır.

Sağlıklı popülasyonda SENV prevalansının yüksek olması, SENV(+) hemodiyaliz hastalarında bildirilen akut hepatit olgusu olmaması, Umemura

ve arkadaşlarının bildirdiği kan transfüzyonu sonrası gelişen SENV(+) non A-E hepatit olgularının sayısının az olması, SENV ile karaciğer hastalığı arasındaki ilişkinin henüz net bir şekilde kanıtlanmış olmaması, SENV pozitifliğinin diyaliz cihazlarının ayrılması için gerekli bir neden oluşturmadığı şeklinde yorumlanabilir.

Çalışmamızda; SENV-D pozitifliği hemodiyaliz hastalarında sağlıklı kan vericilerine göre anlamlı düzeyde yüksek olarak bulunmuştur. Bu sonuç, SENV-D'nin bulaşında parenteral yolun SENV-H'ye göre daha önemli olduğunu düşündürmektedir. Hem hasta hem de kontrol grubunda izlenen SENV-H yüksekliği ise SENV-H'nin yayılımında farklı bulaş yollarının da rol oynayabileceğini göstermektedir. Ayrıca SENV'nin erkeklerde kadınlara göre daha yüksek olması cinsel yolla bulaşın bu yollardan biri olabileceği şeklinde yorumlanabilmektedir. Ancak SENV hakkında daha kesin sonuçlara varabilmek için daha geniş çalışmalar yapılması gerekmektedir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yaptığımız çalışmada, parenteral bulaş açısından riskli bir hasta grubu olan hemodiyaliz hastaları ile sağlıklı kan vericilerinde, yeni bir viral hepatit etkeni olarak öne sürülen SENV'lerin iki genotipi olan SEN-D ve SENV-H sıklığı araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar aşağıda belirtilmiştir.

1. SENV-D pozitifliği hemodiyaliz hastalarında, sağlıklı kan vericilerine göre anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur. SENV-H ise her iki grupta da benzer orandadır. Her iki grupta toplam SENV oranı açısından anlamlı bir fark gözlenmemiştir. SENV-H hem hasta hem de kontrol grubunda, SENV-D'ye göre daha yüksek olarak saptanmıştır.
2. Hemodiyaliz hastalarında, hemodiyaliz süresi ile SENV sıklığı arasında anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir.
3. Hemodiyaliz hastalarında parenteral yol ile bulaşabilen HBV ve/veya HCV varlığı ile SENV birlikteliği arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır.
4. Yaş, eşlik eden kronik hastalık varlığı, sosyo-ekonomik özellikler ile SENV sıklığı arasında anlamlı bir ilişki bulunmamasına karşın, erkeklerde kadınlara göre daha yüksek oranda SENV viremi saptanmıştır.

Elde edilen bu veriler doğrultusunda, SENV-D'nin hemodiyaliz grubunda daha yüksek saptanması, SENV-D bulaşında parenteral yolun önemli olabileceğini düşündürmektedir. SENV-H'nin parenteral bulaş açısından risk grubunda olmayan sağlıklı kan vericilerindeki yüksek prevalansı, SENV-H'nin yayılımında diğer bulaş yollarının da yer alabileceğini desteklemektedir. Erkeklerde gözlenen daha yüksek oranda SENV varlığı cinsel yolla bulaş bu

yollardan biri olabilir mi sorusunu akla getirmektedir. Daha uzun süredir hemodiyalize giren hastalar daha çok parenteral girişime maruz kalmalarına rağmen yapılan birçok çalışmada olduğu gibi çalışmamızda da SENV viremi sıklığı ile hemodiyaliz süresi arasında anlamlı bir ilişki bulunmaması, SENV bulaşmasında tek yolun parenteral bulaş olmadığı düşüncesini desteklemektedir. Dünyada SENV pozitiflik oranlarının ülkeler arasında belirgin değişiklik göstermesi, coğrafi şartların, iklim koşullarının, ülkelerin gelişmişlik derecesinin, beslenme alışkanlıklarının ve hijyenik şartların farklılığına bağlanabilir. Ülkemizdeki diğer çalışmalara göre, hem hemodiyaliz hastalarında hem de sağlıklı kan vericilerinde saptanan daha yüksek oranda SENV pozitifliği bu tür nedenlerin yanı sıra çalışmamızda farklı primerler ve yöntemin kullanılmasından kaynaklanmış olabilir.

SENV ile ilişkili hepatit olgularının az sayıda olmasına karşın, sağlıklı bireylerde yüksek oranda SENV viremisi görülmesi, bu kişilerde klinik ve laboratuvar olarak hepatiti düşündürecek bulguların olmaması SENV ile karaciğer hastalığı arasında doğrudan bir ilişki kurmayı zorlaştırmaktadır. SENV ile ilgili günümüzdeki bilgilerimiz doğrultusunda, HCV pozitif hemodiyaliz hastalarında olduğu gibi SENV pozitif hastalarda hemodiyaliz cihazlarının ayrılmasının ve sağlıklı kan vericilerinde rutin SENV taraması yapılmasının gerekli olmadığı düşüncesindeyiz.

Sonuç olarak; SENV'nin patogenezi ve hepatit etiyolojisinde ki rolünün aydınlatılabilmesi için bu konuda daha geniş çalışmalara gereksinim vardır.

7. ÖZET

Hemodiyaliz Hastalarında SEN Virus Prevalansı

Amaç: SEN virus (SENV) kan transfüzyonu ile bulaşan ve etiyojisi açıklanamayan non A-E hepatitlerden sorumlu bulunmuştur. SENV genomunun filogenetik analizi, bu virusun 9 farklı genotipi (A-I) olduğunu göstermiştir. Bu genotiplerden SEN virus genotip D (SENV-D) ve SEN virus genotip H'nin (SENV-H) kan transfüzyonu sonrası gelişen hepatitler ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Çalışmamızda parenteral bulaş açısından riskli bir hasta grubu olan hemodiyaliz hastalarındaki SENV sıklığı ve SENV bulaşında ki olası risk faktörleri incelenmiştir.

Yöntem: Manisa bölgesinde hemodiyalize giren 100 hasta (70 erkek, 30 kadın) ile kontrol grubu olarak parenteral bulaş açısından risk grubunda olmayan 100 sağlıklı kan vericisi (70 erkek, 30 kadın) çalışmaya alındı. Olgulardan alınan örnekler gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile SENV-D ve SENV-H varlığı açısından incelendi.

Bulgular: Hasta grubunda SENV-D viremisi %28 olarak saptanırken, kontrol grubunda %12'dir. SENV-D viremisi hasta grubunda daha yüksek orandadır ve her iki grup arasındaki ilişki anlamlı bulunmuştur ($p=0.038$). SENV-H viremisi ise hasta grubunda %53, kontrol grubunda %58'dir ve her iki grup arasındaki fark anlamlı değildir ($p=0.760$). SENV-D+H ko-enfeksiyon sıklığı hasta grubunda %20, kontrol grubunda %9 olarak saptanmış ve iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0.080$). Hemodiyaliz süresi ile SENV viremisi arasında bir ilişki gözlenmemiştir ($p=0.541$). SENV erkeklerin %65.7'sinde, kadınların %50'sinde pozitif bulunmuş ve cinsiyetler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0.037$).

Sonuç: SENV-D pozitifliği hemodiyaliz hastalarında, kontrol grubuna göre daha yüksektir ve hemodiyaliz hastalarındaki bu yükseklik, SENV-D bulaşında parenteral yolun önemini vurgulamaktadır. Her iki çalışma grubunda SENV-H prevalansının yüksek bulunması, SENV-H'nin yayılımında diğer bulaş yollarının da yer alabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: SENV, SENV-D, SENV-H, Hemodiyaliz

8. SUMMARY

The Prevalence of SEN Virus among Hemodialysis Patients

Aim: SEN virus (SENV) was thought to be responsible for unknown etiologies of non-A–E hepatitis and transmitted by blood transfusions. Phylogenetic analysis of SENV has shown nine different strains (A-I). SEN virus genotype D (SENV-D) and SEN virus genotype H (SENV-H) is indicated to be related to the development of hepatitis after blood transfusion. In our study, SENV incidence and possible risk factors for SENV transmission was investigated in hemodialysis patients who were at high risk group for parenteral transmission.

Methods: 100 hemodialysis patients (70 males, 30 females) and 100 healthy blood donors (70 males, 30 females) who are not in risk group for parenteral transmission as a control group were involved in to the study in Manisa region. Samples were studied for presence of SENV-D and SENV-H by real time polymerase chain reaction.

Results: SENV-D viremia among hemodialysis patients (28%) was more significant according to the control group (12%) ($p=0.038$). There was no difference in SENV-H viremia between hemodialysis patients (53%) and control group (58%) ($p=0.760$). No significant difference was found in SENV-D + H co-infection between hemodialysis patients (20%) and control group (9%) ($p=0.080$). There was no significant correlation between duration of hemodialysis with SENV viremia ($p=0.541$). SENV viremia was higher in males (65.7%) than females (50%) ($p=0.037$).

Conclusions: SENV-D is more prevalent in hemodialysis patients than healthy blood donors. The high frequency of SENV-D infection among hemodialysis patients emphasized the importance of parenteral route in transmission. Because of high SENV-H prevalence in both study groups, other transmission routes in the distribution of SENV-H might be considered.

Key Words: SENV, SENV-D, SENV-H, Hemodialysis

9. KAYNAKLAR

1. Umemura T, Yeo AE, Sottini A, et al. SEN virus infection and its relationship to transfusion-associated hepatitis. *Hepatology* 2001;33:1303-11.
2. Escorsell A, Mas A., de la Mata M. Acute liver failure in Spain: analysis of 267 cases. *Liver Transpl* 2007;13:1389-95.
3. Kodali VP, Gordon SC, Silverman AL ,et al. Cryptogenic liver disease in the United States: further evidence for non-A, non-B, and non-C hepatitis. *Am J Gastroenterol* 1994;89:1836-9.
4. Brown KE, Tisdale J, Barrett AJ, et al. Hepatitis-associated aplastic anemia. *N Engl J Med* 1997;336:1059-1064.
5. Linnen J, Wages J, Jr., Zhang-Keck ZY, et al. Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: a transfusion-transmissible agent. *Science*1996;271:505-8.
6. Bowden S. New hepatitis viruses: contenders and pretenders. *J Gastroenterol Hepatol*, 2001;16(2):124–131.
7. LK A. Baffling Hepatitis Virus Is Isolated, Scientists Say. <http://www.nytimes.com/1999/07/20/science/baffling-hepatitis-virus-is-isolated-scientists-say.html?pagewanted=all> (Erişim tarihi: 14/05/2012)
8. Habeck M. New hepatitis virus discovered. *Mol Med Today*, 1999;5(11):462.
9. Akiba J, Umemura T, Alter Hj, et al. SEN virus: epidemiology and Characteristics of a transfusion–transmitted virus. *Transfusion*, 2005; 45:1084–1088.
10. Kojima H, Kaita KD, Zhang M, et al. 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.
11. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Principles and Practicise of Infectious Diseases Acute Viral Hepatitis 7th ed. 2010; 1578.

12. Simons JN, Leary TP, Dawson GJ et al. Isolation of novel virus-like sequences associated with human hepatitis. *Nat Med* 1995; 1: 564–569.
13. Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, et al. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochemical and Biophysical Research Communication*; 1997; 24: 92–97.
14. Simmonds P, Davidson F, Lycett C, et al: Detection of a novel DNA virus (TTV) in blood donors and blood products. *Lancet* 1998 ; 352:191–195.
15. Allain JP. (2000): Emerging viruses in blood transfusion. *Vox Sanguinis*; 78 (suppl 2) :243-248.
16. Primi D, Fiordalisi G and Mantero GL.(2000): Identification of SENV genotypes. International Publication: WO 00/28039, inventors; DiaSorin S.R.L. assignee. Available from: <http://v3.espacenet.com/textdoc?DB = EPODOC&IDX = WO0028039&F = 0&QPN = WO0028039>.
17. Tanaka Y, Primi D, Wang RY, et al. 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;183:359-67.
18. Sagir A, Kirschberg O, Heintges T, et al: SEN virus infection. *Rev Med Vir*, 2004, 14:141–148.
19. Mushahwar İK, Erker JC, Muerhoff AS, et al Molekular and biophysical characterization of TT virus: Evidence for new virus Family infecting humans *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:3177-82.
20. K. Thom, A. Cleland, M. Salakova, et al. Prevalence and genetic heterogeneity of SEN virus genotypes D and H in blood donors from Central and Western Europe and West Africa *Transfusion Medicine*, 2011, 21, 42–50
21. ICTV Official Taxonomy: Updates since the 8th Report, 2007. *075axxVAnelloviridae* http://talk.ictvonline.org/files/ictv_official_taxonomy_updates_since_the_8th_report/m/vertebrate-2008/default.aspx?pi3174=2 (Erişim tarihi: 14/05/2012)
22. <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009&bhcp=1> (Erişim tarihi: 14/05/2012)
23. Fiordalisi G, Bonelli M and Olivero P.(2000): Identification of SENV Genotypes. Requested Patent WO0028039.

24. Okamoto H: TT viruses in animals. *Curr Top Microbiol Immunol* 2009, 331:35-52.
25. Maggi F and Bendinelli M. Human anelloviruses and the central nervous system *Rev. Med. Virol.* 2010; 20: 392–407.
26. Karimi-Rastehkenari A, Bouzari M. High frequency of SEN virus infection in thalassemic patients and healthy blood donors in iran *Virology Journal* 2010, 7:1
27. Spataro P, Di Pietro A, Scoglio ME, et al. Prevalence of SENV-H and SENV-D virus: epidemiological study in blood donors and dialysis patients. *Ren Fail* 2006;28:441-8.
28. Dehkordi P.G, Doosti A. The prevalence of *SEN virus* infection in blood donors and chronic hepatitis B and C patients in Chaharmahal Va Bakhtiari province, *Journal of Cell and Animal Biology* 2011 Vol. 5(8), pp. 182-186
29. Samah A.L, Mohamed M.H, Massoud W.A et al. SEN virus infection in Egyptian patients undergoing maintenance hemodialysis: prevalence and clinical importance *J Microbiol Immunol Infect.* 2009;42:464-470
30. Kobayashi N, Takana E, Umemura T, et al. Clinical significance of SEN virus infection in patients on maintenance haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18: 348-352.
31. Dai CY, Chuang WL, Chang WY, et al. SEN virus infection among patients on maintenance hemodialysis in southern Taiwan. *J Infect* 2005; 51 : 110-5.
32. Schröter M, Laufs R, Zöllner B, et al. A novel DNA virus (SEN) among patients on maintenance hemodialysis: prevalence and clinical importance. *J Clin Virol* 2003; 27: 69-73.
33. Liu T.T, Lin.H.H, Wang L.Y et al. SEN Virus Infection in Patients on Maintenance Hemodialysis in Eastern Taiwan *Tzu Chi Med J* 2006 ;18,No. 3
34. Tezcan S. Prevalence of SEN virus genotype-D and genotype-H among haemodialysed patients. *Turk J Med Sci* 2009;39:397-403.
35. Aktaş E. Hematolojik maligniteli hastalarda SEN virus sıklığının ve kan transfüzyonu ile ilişkisinin incelenmesi (TezJ. İzmir: Dokuz Eylül Üniversitesi, 2011. 51 .

36. Tang ZH., Chen HX., Yu YS., et al. Prevalence and clinical significance of SEN virus infection in patients with non A-E hepatitis and volunteer blood donors in Shanghai *World J Gastroenterol* 2008 July 14; 14(26): 4204-4208
37. Mukini M, Moriyama M, Tanaka N, et al. SEN virus infection does not affect the progression of non A to E liver disease. *J Med Virol* 2002; 67: 624-629.
38. Serin MS., Koksak F., Oksuz M. et al. 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, 349-52
39. Sagir A, Adams O, Antakyali M, et al. SEN virus has an adverse effect on the survival of HIV-positive patients. *AIDS* 2005;19:1091-6.
40. Pirovano S, Bellinzoni M, Matteelli A, et al. High prevalence of a variant of SEN-V in intravenous drug user HIV-infected patients. *J Med Virol* 2002;68:18-23.
41. Shibata, M., Wang, R.Y., Yoshida, M., et al. The presence of a newly identified infectious agent (SEN virus) in patients with liver diseases and in blood donors in Japan. *Journal of Infectious Diseases*, 2001 184, 400–404.
42. Umemura T, Alter HJ, Takana E, et al. SEN virus: Response to interferon alfa and influence on the severity and treatment response of coexistent hepatitis C. *Hepatology* 2002; 35:953-959.
43. Sagir A, Adams O, Kirschberg O, et al. SEN virus does not affect treatment response in hepatitis C virus coinfecting patients but SEN virus DNA concentration. *World J Gastroenterol* 2004; 10 (13): 1893-1897
44. Xu D, Tian DY, Zhang ZG, et al. Effect of SEN virus coinfection on outcome of lamivudine therapy in patients with hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2004; 10 (7): 968-971.
45. Pirovano S, Bellinzoni M, Ballerini C, et al. Transmission of SEN virus from mothers to their babies. *J Med Virol.* 2002; 66: 421-427.
46. Yoshida EM, Buczkowski AK, Giulivi A, et al. A cross sectional study of SEN virus in liver transplant recipients. *Liver Transpl* 2001; 7: 521-525.

47. Pfeiffer RM, Tanaka Y, Yeo AE, et al. Prevalence of SEN viruses among injection drug users in the San Francisco Bay area. *J Infect Dis* 2003;188:13-8.
48. Bahabadineja M., Bouzari M., Talebi A. Frequency of SEN Virus in Cervicitis and Cervical Cancers in Isfahan *Journal of Isfahan medical school* 20011 vol: 29 No: 147
49. Momosaki S, Umemura T, Scudamore CH, et al. SEN virus infection in patients with hepatocellular carcinoma. *J Viral Hepat* 2005;12:435-8.
50. Umemura T, Tanaka Y, Kiyosawa K, et al. Observation of positive selection within hypervariable regions of a newly identified DNA virus (SEN virus). *FEBS Lett*, 2002;510(3):171–174.
51. Vierstraete A. <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>. (Erişim tarihi; 26/04/2012)
52. Kksal F. Nükleik asit oğaltma yöntemleri, Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji. 2001, 1. baskı. s; 15-34
53. Durmaz R. Polimeraz zincir reaksiyonunun tipleri, Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji. 2001, 1. s; 35-43
54. Boratav K. Sınıfların ve grupların sosyoekonomik nitelikleri. 2. Baskı. Ankara İmge kitapevi yayınları. 2004, s.33-60
55. Kao JH, Chen W, Chen PJ, et al: Prevalence and implication of a newly identified infectious agent (SEN virus) in Taiwan. *J Infect Dis* 2002; 185 389-392.
56. Serin M.S., Tezcan S., Delialioğlu N., Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi hastanesi kan dnrlerinde SEN virus genotip-D ve H varlığının araştırılması, Mikrobiyoloji Bült. 2006, 40: 39-45
57. Sagir, A., Adams, O., Oette, M., et al. SEN virus prevalence in HIV positive patients: association with immunosuppression and HIV replication. *Journal of Clinical Virology*, 2005, 33, 183–187.
58. Sharifi Z. , Shooshtari M., Talebian A. The Prevalence of SEN Virus Infection in Blood Donors in Iran *Arch Iranian Med* 2008; 11 (4): 423 – 426
59. Umemura, T., Tanaka, E., Ostapowicz, G. *et al.* (2003) Investigation of SEN virus infection in patients with cryptogenic acute liver failure, hepatitis-

- associated aplastic anemia, or acute and chronic non-A-E hepatitis. *Journal of Infectious Diseases*, 2003 188, 1545–1552
60. Schreter I., Kristian P., Jarcuska P. et al. Detection of SEN Virus in the general population and different risk groups in Slovakia. *Folia Microbiol.* 2006. 51 (3), 223–228
61. Mohamed İ.S., Thabit A.G., Abd-El Rahman S.A., Prevalence of SEN Virus Infection in Multitransfused Patients in Assiut University Hospitals, Egypt. *Journal of American Science*, 2011;7(1)
62. Tangkijvanich, P., Theamboonlers, A., Sriponthong, M., et al. SEN virus infection in patients with chronic liver disease and hepatocellular carcinoma in Thailand. *Journal of Gastroenterology* ,2003 38, 142–148.
63. Huang, L.R., Wang, H.H., Lin, W.S. et al. The prevalence of SEN virus infection in blood donors inTaiwan. *Journal of Infection*, 2005 51, 30–34.
64. Mu S.J., Du, J., Zhan, L.S., et al. Prevalence of a newly identified SEN virus in China. *World Journal of Gastroenterology*, 2004 10, 2402–2405.
65. Çakaloğlu Y., Akyüz F., Bozacı M., et al. Prevalence and clinical significance of SEN-H virus in chronic hepatitis B, C and delta infections in Turkey *Turk J Gastroenterol* 2008; 19 (2): 104-108
66. Öğütmen B.M., Midilli K., Tuğulular S., ve ark. Periton Diyalizi Hastalarında Sen Virüsü Varyantı Olan Senv-D ve Senv-H'nin Prevalansı *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi* 2009 Cilt 18, No, 3, Sayfa : 107-111
67. Pirovano S., Gregorini G., Malacarne F., et al. 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;48:216–222
68. Dai C.Y., Yu L.M., Lin Y.Z., et al. Prevalence and Clinical Significance of SEN Virus Infection Among Volunteer Blood Donors in Southern Taiwan, *Digestive Diseases and Sciences*, 2004 Vol. 49, pp. 1181–1185

