

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ENFEKSİYON HASTALIKLARI VE
KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

**HEMATOLOJİK MALİGNİTELİ HASTALARDA
SEN VİRÜS SIKLIĞININ
VE
KAN TRANSFÜZYONU İLE İLİŞKİSİNİN
İNCELENMESİ**

DR. ERAY AKTAŞ

TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. NEDİM ÇAKIR
DOÇ. DR. ZİYA KURUÜZÜM

UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2011

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ENFEKSİYON HASTALIKLARI VE
KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

**HEMATOLOJİK MALİGNİTELİ HASTALARDA
SEN VİRÜS SIKLIĞININ
VE
KAN TRANSFÜZYONU İLE İLİŞKİSİNİN
İNCELENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. NEDİM ÇAKIR
DOÇ. DR. ZİYA KURUÜZÜM

DR. ERAY AKTAŞ

İÇİNDEKİLER

ÖZET	1
SUMMARY	3
1.GİRİŞ	5
2.GENEL BİLGİLER	7
2.1. SEN VİRÜS.....	7
2.1.1. <i>SEN virüsün genel özellikleri ve sınıflandırılması</i>	7
2.1.2. <i>Epidemiyoloji</i>	12
2.1.2.1. <i>Sağlıklı kan donörlerinde SEN virüs sıklığı</i>	13
2.1.2.2. <i>Değişik komorbid faktörlerin varlığında SEN virüs sıklığı</i>	14
2.1.2.3. <i>Ülkemizde SENV çalışmaları</i>	15
2.1.3. <i>Patogenez</i>	16
2.1.4. <i>SEN Virüsünün Laboratuvar Tanısı</i>	17
2.2. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU.....	17
2.2.1. <i>Nükleik Asit İzolasyonu</i>	18
2.2.1.1. <i>Silika Yöntemi</i>	19
2.2.2. <i>Nükleik Asitin Çoğaltılması</i>	19
2.2.2.1. <i>Denatürasyon</i>	20
2.2.2.2. <i>Bağlanma</i>	21
2.2.2.3. <i>Uzama</i>	22
2.2.3. <i>Nükleik Asitlerin Saptanması</i>	22
2.2.3.1. <i>Jel Elektroforezi</i>	22
2.2.3.2. <i>Hibridizasyon</i>	23
2.2.4. <i>Polimeraz zincir reaksiyonu bileşenleri</i>	24
2.2.4.1. <i>Enzim</i>	25
2.2.4.2. <i>Deoksiribonükleotid Trifosfatlar</i>	25
2.2.4.3. <i>PZR Tampon İçeriği</i>	26
2.2.4.4. <i>Oligonükleotid Primerler</i>	26
2.2.5. <i>Polimeraz Zincir Reaksiyonu Tipleri</i>	26
3. OLGULAR, GEREÇ VE YÖNTEM	28
3.1. OLGULAR.....	28

3.1.1. Çalışma yerleri.....	28
3.1.2. Hasta grubu.....	28
3.1.3. Hasta grubu dışlama kriterleri.....	29
3.1.4. Kontrol grubu.....	29
3.1.5. Kontrol grubu dışlama kriterleri.....	29
3.1.6. Örnek büyüklüğünün hesaplanması.....	29
3.1.7. Serum örneklerin alınması ve saklanması.....	30
3.1.8. Hastaların gruplara ayrılması.....	30
3.1.9. Etik kurul.....	31
3.1.10. Aydınlatılmış onam.....	31
3.1.11. Veri toplanması.....	31
3.1.12. İstatistik.....	32
3.2. ARAÇ VE GEREÇLER.....	32
3.3. YÖNTEM.....	33
3.3.1. DNA ekstraksiyonu.....	33
3.3.2. İzolasyon sonrası DNA miktarının ve saflığının saptanması.....	37
3.3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Uygulaması.....	37
4. BULGULAR.....	38
4.1. Hasta ve kontrol grubunun genel özellikleri	38
4.1.1. Hasta ve kontrol grubundaki SENV sıklığı.....	39
4.1.2. Hasta ve kontrol grubunun hepatit açısından değerlendirilmesi.....	40
4.2. Hasta grubunun kendi içersinde değerlendirilmesi.....	40
4.2.1. Hastaların tanımlara göre değerlendirilmesi.....	40
4.2.2. Hastaların beyaz küre sayısına göre değerlendirilmesi.....	41
4.2.3. Olguların kan nakli süresine göre değerlendirilmesi.....	42
4.2.4. Olguların kan ürünü sayısına göre değerlendirilmesi.....	43
4.3. Kontrol grubunun değerlendirilmesi.....	43
5. TARTIŞMA.....	45
5.1. Hasta grubunun diğer çalışmalarla karşılaştırılması.....	45
5.2. Kontrol grubunun diğer çalışmalarla karşılaştırılması.....	48
5.3. Hasta ve kontrol grubunun karşılaştırılması.....	50
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	51

7. KAYNAKLAR	52
---------------------------	----

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Anelloviridae ailesinin taksonomisinde SENV'nin yeri	8
Tablo 2: SENV ve TTV için Nükleotid/aminoasit sekans dizilimi homolojisi	12
Tablo 3: Ükelere göre kan donörlerindeki SENV-D ve SENV-H sıklığı	14
Tablo 4: SENV-D ve SENV-H'nin PZR reaksiyon karışımları	37
Tablo 5: Uygulanan amplifikasyon sıcaklık ve süreler.....	38
Tablo 6: Hasta grubundaki olgu tanılarının dağılımı	39
Tablo 7: Hasta ve kontrol grubunda SENV ve alt genotiplerinin sıklığı	40
Tablo 8: Lenfoma ve lösemi olgularında SENV sıklığının karşılaştırılması	41
Tablo 9: Olguların, beyaz küre sayılarına göre değerlendirilmesi	42
Tablo 10: Kan nakli süresine göre SENV sıklığının değerlendirilmesi	42
Tablo 11: Olgularda kan nakil sayısına göre SENV sıklığının değerlendirilmesi	43
Tablo 12: Kontrol grubunda kan alım zamanına göre SENV sıklığı	44

Tablo 13: Kontrol grubunda kan alım zamanına göre SENV sıklığı.....	44
--	----

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: ORF1-3 gösteren SENV-D ve SENV-H gen haritası	10
Şekil 2: ORF1 dizi varyasyonlarına dayandırılarak oluşturulmuş filogenetik dendogram	11
Şekil 3: Polimeraz Zincir Reaksiyonu aşamaları	20
Şeki 4: Denatürasyon	21
Şekil 5: Primerlerin bağlanması	21
Şekil 6: Uzama.....	22
Şekil 7: Taqman tekniği	23
Şekil 8: Ampliflor tekniği	24
Şekil 9: Lightcycler yöntemi	24

ŞEMA

Şema 1: Spin kolon yöntemi ile ekstraksiyon.....	35
---	----

KISALTMALAR

- cDNA:** Komplementer DNA
DEÜTF: Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
EIA: Enzyme immunoassay
FRET: Floresan Rezonans Enerji Transferi
HGV: Hepatit G virüs
HIV: Human immunodeficiency virüs
ICTV: International Committee on Taxonomy of Viruses
IV: İntravenöz
KCFT: Karaciğer fonksiyon testi
µL: Mikrolitre
ORF: Open Reading Frame
PMV: Panicum Mosaic Virus
PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu
SENV: SEN virüs
SENV-A: SEN virüs genotip A
SENV-B: SEN virüs genotip B
SENV-C: SEN virüs genotip C
SENV-D: SEN virüs genotip D
SENV-E: SEN virüs genotip E
SENV-F: SEN virüs genotip F
SENV-G: SEN virüs genotip G
SENV-H: SEN virüs genotip H
Tm: Melting temperature
TTV: Torgue Teno virüs
Vb.: Ve benzerleri

TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitimim boyunca sundukları bilimsel, destekleyici ve verimli ortam için başta anabilim dalı başkanımız Sayın Prof. Dr. Nedim Çakır' a, değerli hocalarım Prof. Dr. Ayşe Yüce, Doç. Dr. Nur yapar, Doç. Dr. Vildan Avkan Oğuz, Doç. Dr. Ziya Kuruüzüm' e ve Uzm. Dr. Sema Alp Çavuş'a çok teşekkür ederim.

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum arkadaşlarım Uzm. Dr. Oya Özlem Eren, Uzm. Dr. Munir Hancer, Uzm. Dr. Halil Aslan, Uzm. Dr. Bengisu Ay, Uzm. Dr. Sevil Sapmaz Karabağ, Dr. Zeynep Karlıbaş, Dr. Kübra Demir, Dr. Yasemin Balbay, Dr. Gülhan Çallı, Dr. Vecihe Dursun ve Dr. Hatice Köse'ye, kliniğimiz hemşire ve çalışanlarına tüm kalbimle teşekkür ederim.

Bu günlere gelebilmem için hiç bir fedakarlıktan kaçınmayan canım aileme, bana her zaman destek olan eşime, en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Dr. Eray Aktaş

2011- İZMİR

Ölümüyle meslek yaşantıma yön veren, katater enfeksiyonu nedeni ile kaybettiğimiz dayım

Osman Kamalı'nın anısına.....

ÖZET

HEMATOLOJİK MALİGNİTELİ HASTALARDA SEN VİRÜS SIKLIĞI VE KAN TRANSFÜZYONU İLE İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ

AKTAŞ Eray, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 35340, İnciraltı/İZMİR

Amaç: SEN virüs, kan transfüzyonu ile bulaşan ve hepatit tablosu oluşturabilen bir etkidir. Hematolojik maligniteli hastalar tedavileri sırasında sık olarak kan ürünü almaktadır. SEN virüs açısından risk altında olan bu hasta grubunda viremi sıklığını ve bunun kan ürünü nakil sayısı ile ilişkisini incelemeyi amaçladık.

Yöntem: Dokuz Eylül Üniversitesi Hematoloji Bilim Dalı servisinde 27.5.2010 ile 27.5.2011 tarihleri arasında yatarak tedavi gören, gönüllü, hematolojik kanser tanılı, kan ürünü almış olan olgular çalışma kapsamına alındı. Kontrol grubuna ise Dokuz Eylül Üniversitesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı servisinde 27.5.2010 ile 27.5.2011 tarihleri arasında çeşitli tanılar ile yatarak izlenen, gönüllü ve hiç kan ürünü almamış olgular dahil edildi. Olgulardan birer kez örnek alındı ve gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile SEN virüs viremisi açısından değerlendirildi.

Bulgular: Hematolojik maligniteli 80 hastanın 30'unda (%37,5) ve kontrol grubundaki 80 olgunun 40'ında (%50) SEN virüs viremisi saptandı. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı(ki kare=2,535, p=0,1). Lenfoma tanısı ile izlenen 26 olgunun 15'inde (%57,7), lösemi ile izlenen 45 olgunun 10'unda (%22,2) SEN virüs bulundu. İki grup arasındaki fark anlamlı olarak bulundu(ki kare =9,088, p=0,003). Nötropenik 38 olgunun 11'inde (%28,8) SENV saptanırken, bu rakam nötropenik olmayan 42 olgunun 19'unda (%45,2) saptandı ve anlamlı bir fark saptanmadı(ki kare= 2,259 p=0,133). Nötropenik olguların yedisinde (%18,4) SEN virüsün H genotipi saptanırken, nötropenik olmayan hastaların ise 17'sinde (%40,5) saptandı. İki grup arasındaki fark anlamlı olarak saptandı(ki kare= 4,621, p=0,032). Bir ile beş kan ürünü almış 28 olgunun 13'ünde (%46,4), altı ile 30 kan ürünü almış 28 olgunun 11'inde (%39,3), 31 ve üzerinde kan ürünü almış olan 24 olgunun ise 6'sında (%25,0) SEN virüs viremisi saptandı. Fakat, gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmadı(ki kare=2,590, p=0,274).

Sonuç: Hematolojik maligniteli hastalarda SEN virüs sıklığı %37,5 olarak saptandı. Kontrol grubu ile arasında fark saptanmadı. Nötropenik hastalarda SEN virüs genotip H viremi, nötropenik olmayanlara göre düşük saptandı. Bu bulgu virüsün kemik iliğinde replikasyonunu ve beyaz küreler aracılığı ile taşıyor olabileceğini düşündürdü. Kan ürünü sayısı ile SEN viremi sıklığının değişmemesi ise zaman içerisinde immüitenin gelişiyor olabileceğini akla getirdi.

Anahtar Kelimeler: Hematolojik malignite, SEN virüs, kan transfüzyonu

SUMMARY

THE PREVALENCE OF SEN VIRUS IN HEMATOLOGICAL CANCER PATIENTS AND RELATIONSHIP BETWEEN BLOOD TRANSFUSION

AKTAŞ Eray, Department of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, Faculty of Medicine, Dokuz Eylül University Hospital, 35340, İnciraltı/İZMİR

Aim: SEN virus transmitted by the blood transfusion and it can cause hepatitis. Hematologic cancer patients during treatment often takes of blood transfusions. This group of patients are at risk for SEN virus infections. We aimed to find prevalence of viremia and the relationship between the blood transfusions.

Materials and Methods: This study was performed in the Dokuz Eylül Üniversitesi Infectious Diseases And Clinical Service Department and Dokuz Eylül Üniversitesi Hematology Ward Branch Of Science between 27.5.2010 and 27.5.2011. Working group consisted patients with hematologic cancer in blood transfusion. Control group included patients without blood transfusion and non hematologic cancer. Patients blood was collected once. Samples were studied by real time polymerase chain reaction.

Results: Thirty (%37,5) of eight hematologic cancer patients were positive for SEN virus. SEN virus viremia detected in forty (%50) of eight control patients. There was no difference between the two groups($p=0,1$). SEN virus was present in fifteen (%57,7) of the twenty-six patients with lymphoma. Ten (%22,2) of the forty five leukemia patients were positive for SEN virus. This study suggest that SEN virus viremia was significantly more prevalent in patients with lymphoma ($p=0,003$). SEN virus genotip H was detected in seven (%18,4) of thirty eight patients with neutropenia, in seventeen (%40,5) of forty two patients with out neutropenia. This result indicate SEN virus genotip H viremia was significantly more prevalent in patients with out neutropenia($p=0,032$). Thirteen (%46,4) of twenty eight patients positive for SEN virus who received blood transfusion from one to five. SEN virus viremia detected in eleven (%39,3) of twenty eight patients who received blood transfusion from six to thirty. SEN virus detected in six (%25) of twenty four patients who received blood transfusion from thirty one and over. There was no difference between groups.

Conclusions: SEN virus H genotip viremia wasn't more prevalent in patients with neutropenia. This finding suggesting that SEN virus may replicate in bone marrow or may be carried by leukocytes. The number of blood transfusions did not change the frequency of SEN virus.improved immunity. This may be due to the development of immune.

Key Words: Hematologic cancer, SEN virus, blood transfusion

1.GİRİŞ

Hepatit, karaciğerin enflamasyonu olarak tanımlanmıştır. Hepatit yapabilen birçok etken bulunmaktadır. Bunların sıklığı coğrafi bölgelere göre değişmektedir. Virüsler, alkol ve ilaç kullanımı en sık nedenler arasında yer almaktadır. Bunların dışında Wilson hastalığı, otoimmün hepatit, hemakromatoz, iskemik hepatit, mantar zehirlenmesi, Budd Chiari sendromu gibi hastalıklar da hepatit yapabilmektedir. Escorsell ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, 1992 ile 2000 yılları arasında, fulminan hepatit olgularının %32'sinin nedeninin saptanamadığı belirtilmiştir.¹ Akut ve kronik hepatitler açısından etiyojisi aydınlatılmayan olguların oranı bin dokuz yüzlü yılların sonunda %5'leri bulmaktaydı.² Gelişen serolojik ve moleküler teknikler sayesinde etiyojisi aydınlatılmayan olguların oranı düşmekle beraber yüksekliğini günümüzde de korumaktadır. Geçen zaman dilimi içerisinde bu kliniğe neden olabilen başka etkenlerin bulunması keşfedilmemiş başka patojenlerin de varlığını düşündürmüştür. Torgue Teno virüs (TTV), Hepatit G virüs (HGV) ve SEN virüs (SENV) gibi alışılmış etkenlerin dışındaki virüslerin de özellikle kan nakli sonrasında hepatit yapabileceği gösterilmiştir.³⁻⁵

Donör ve alıcılarda aynı aminoasit diziliminde SENV DNA'ların gösterilmesi kan nakli ile geçişini ispatlamıştır. Karaciğer dokularında SENV'ye ait komplementer DNA'ların saptanması ise replikasyonun bu bölgede olduğunu düşündürmüştü fakat SENV ile karaciğer patolojisi arasında net bir ilişki olduğu gösterilememiştir.⁵

SENV enfeksiyonunun doğal seyri ile ilgili olarak çok az bilgi mevcuttur. Retrospektif olarak yapılmış olan bir çalışmada birçok hastanın enfekte olduktan sonra iki ay içerisinde virüsün temizlendiği görülmüştür. Fakat bazı hastalarda ise on yıldan fazla süreli enfeksiyonların da oluşabildiği saptanmıştır. SENV antikörlerini tespit edebilecek serolojik bir test henüz mevcut olmadığı için akut veya kronik enfeksiyon ayrımı yapılamamaktadır. Virüs polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile saptanmaktadır.^{5,6}

Günümüze kadar SENV'nin dokuz adet genotipi tanımlanmıştır. Bunlar A'dan I'ya kadar isimlendirilmişlerdir.⁷ Akut hepatit ile ilişkisi olan genotiplerin SEN virüs genotip D (SENV-D) ve SEN virüs genotip H (SENV-H) olduğu gösterilmiştir. Diğer genotipler sağlıklı kan donörleri arasında daha az sıklıkla bulunmakla birlikte, bu genotipler akut hepatite neden olmamaktadır.⁵

SENV-D ve SENV-H'nin herhangi bir klinik ve laboratuvar bulgusu olmayan sağlıklı bireylerde de saptanabilmesi patojenitesi konusunda kuşku duyulmasına neden olmuştur.⁵

Gönüllü kan donörleri üzerinde yapılan çalışmalarda, SENV-D ve SENV-H'nin görülme sıklığının ülkeler arasında farklılık gösterdiği saptanmıştır. Çalışma yapılan bölgeye göre SENV-D'nin sıklığı %0,9 ile %32, SENV-H'nin sıklığı %0,9 ile %45,4 arasında değişmektedir.^{5, 8, 9} Ülkemizde, sağlıklı kan donörleri üzerinde yapılan çalışmalarda ise SENV-D sıklığı %4 ile %14, SENV-H sıklığı ise %6 ile %20 arasında değişen oranlarda saptanmıştır.^{10, 11}

Diyaliz, kan nakli, intravenöz (IV) ilaç kullanımı, cerrahi operasyon gibi risk faktörlerinin varlığında SENV sıklığının arttığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Transfüzyon ile ilişkili hepatitlerde, kronik karaciğer hastalıklarında, talasemi ve hemodiyaliz hastalarında, IV ilaç bağımlılarında ve hepatosellüler karsinomalı olgularda, sağlıklı yetişkinlere oranla daha sık rastlandığı bildirilmiştir.¹²⁻¹⁷ Bu hasta gruplarında özellikle hastane ve kan ürünleri ile sıklıkla temas halinde bulunmaları dikkat çekmektedir.

Hematolojik kanserli hastalar, gerek hastalıkları nedeni ile, gerekse de aldıkları kemoterapi nedeni ile tedavileri boyunca çok sayıda kan ürünü almaktadırlar. Bundan dolayı, bu hasta grubunun da yüksek oranda SENV enfeksiyonu riski ile karşı karşıya bulunduğu düşünülebilir. Ayrıca, zaman zaman karaciğer fonksiyon testlerinde (KCFT) yükseklik olması nedeniyle almaları gereken kemoterapiler de ertelenebilmektedir. Karaciğer fonksiyon testlerindeki yüksekliğin bir nedeninin de SENV enfeksiyonu olabileceği rahatlıkla varsayılabilir. Pubmed veri tabanı ile yapmış olduğumuz araştırmada, hematolojik kanser hastalarında SENV sıklığı ile ilgili bir çalışmaya ulaşamamız nedeni ile bu çalışmamızda hematolojik kanserli hastalarda SENV-D ve SENV-H'nin sıklığının saptanması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. SEN VİRUS

SEN virüs, ilk olarak 20.07.1999'da IV ilaç bağımlısı olan HIV (Human immunodeficiency virüs, insan immun yetmezlik virüsü) ile enfekte bir hastanın serumundan farklı bir DNA klonu olarak saptanmış ve yeni bir virüs olduğu ortaya konmuştur. Bu virüse hastanın isminin ilk harfleri olan 'SEN' adı verilmiştir.¹⁸

2.1.1. SEN Virüsün Genel Özellikleri ve Sınıflandırılması

İtalya'nın Saluggia kentinde bulunan DiaSorin Biyomoleküler Araştırma Enstitüsünde keşfedilmiştir. Keşfin, The New York Times isimli gazete aracılığı ile duyurulmasına rağmen 2001 yılına kadar herhangi bir bilimsel dergi ve toplantıda bildirim yapılmamıştır.^{7, 18, 19}

SENV ile ilgili yapılan ilk çalışmalarda bazı genotiplerinin kan transfüzyonu sonrası hepatit yapabileceği gösterilmiştir.⁵ Benzer klinik tabloya neden olan TTV ile yakın filogenetik benzerliği yine o dönemde gösterilmiştir. Her iki virüs de tek iplikli, sirküler bir DNA'ya sahip olma ve zarfsız bir virüs olma gibi özellikleri nedeniyle *Circoviridae* ailesine dahil edilmiştir. İlerleyen yıllarda TTV DNA dizi analizi çalışmaları ile *Circoviridae* ailesi arasında uygunluk saptanmamıştır.²⁰⁻²²

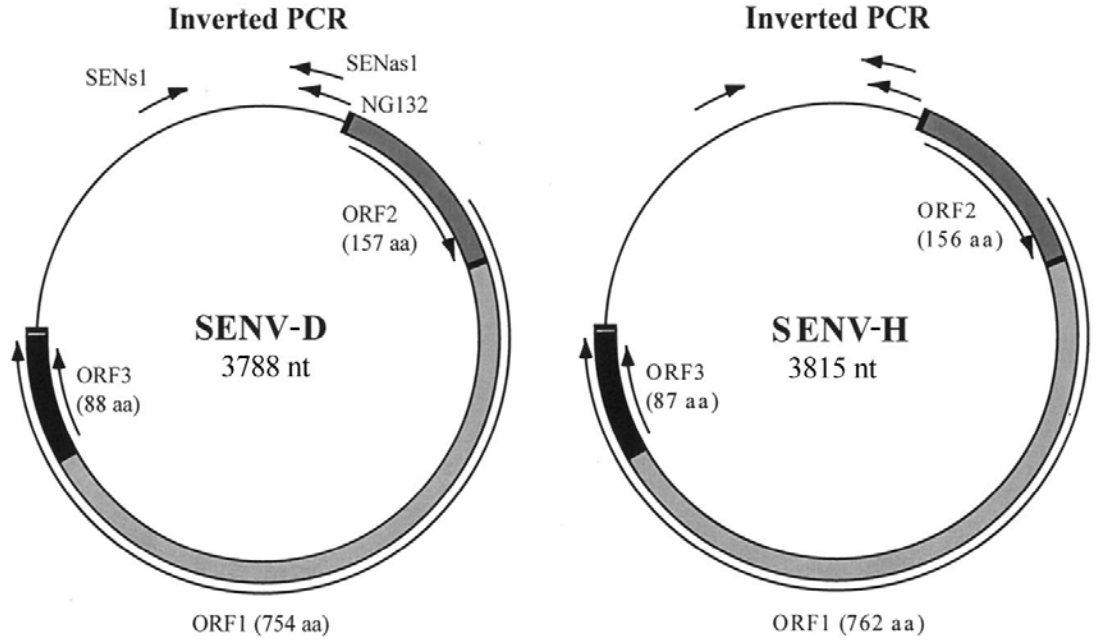
Günümüzde SENV, TTV'nin bir türü olarak *Anelloviridae* ailesi içerisinde sınıflandırılmaktadır. Uluslararası Virüs Taksonomi Komitesi (*International Committee on Taxonomy of Viruses*, ICTV) tarafından *Anelloviridae* ailesi yeni oluşturulmakla birlikte içerik ve virüs isimleri açısından kesin bir uzlaşıya henüz varılamamıştır. Oluşturulan bu aile içerisinde dokuz adet cins bulunmaktadır. Dokuz cinsin içerisinde de toplam 47 tür bulunmaktadır. SENV-D ve SENV-H, *Alphatorquevirus* cinsinin içerisinde sırasıyla *Torque teno virus 15* ve *Torque teno virus 18* türleri olarak sınıflandırılmaktadır. *Anelloviridae* taksonomisi **Tablo-1**'de gösterilmiştir.²³

Tablo 1: Anelloviridae ailesinin taksonomisinde SENV'nin yeri

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>

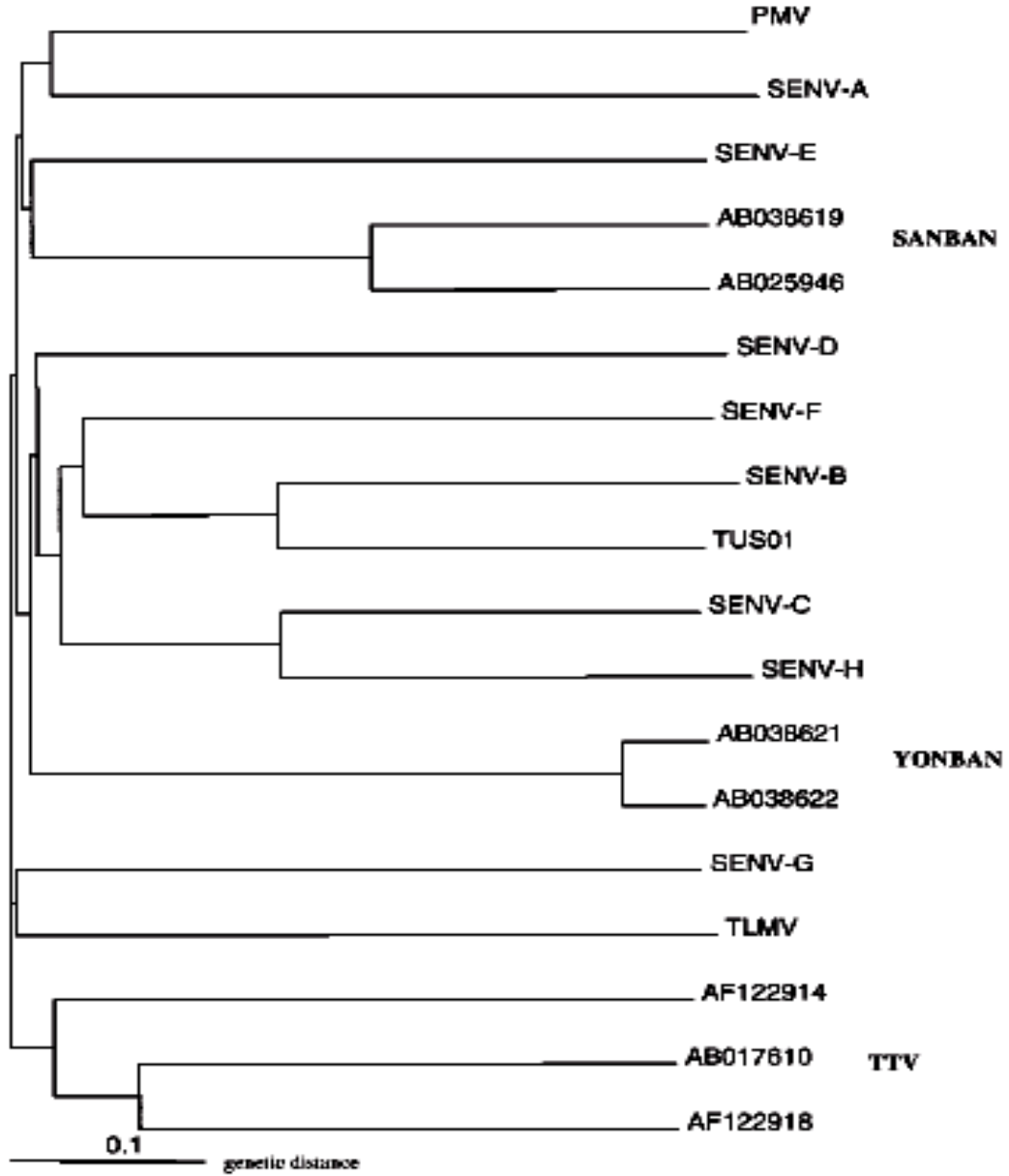
SEN-V; 26 nm büyüklüğünde, zarfsız, tek zincirli sirküler bir DNA virüsüdür. Yaklaşık 3900 nükleotidden oluşmaktadır ve 3,8 kb uzunluğundadır. Genomunda uzunluğu ve birleşimi bilinen bir proteini kodlayan DNA dizileri bulunmaktadır. Bu DNA dizileri açık okuma çerçevesi (ORF=Open Reading Frame) olarak tanımlanmaktadır. ORF'deki nükleik asit farklarından yararlanılarak türler genotiplere ayrılabilir. SENV'nin üç adet ORF'si bulunmaktadır (**Şekil 1**). Bunlar ORF1, ORF2 ve ORF3 olarak isimlendirilmektedir.⁷



Şekil 1. ORF1-3 gösteren SENV-D ve SENV-H gen haritası⁷

TTV'nin ise dört adet ORF'si bulunmaktadır. TTV'nin ORF1'i dört farklı protein kodlamaktadır. Birinci ve üçüncü proteinlerinin replikasyondan sorumlu olduğu düşünülmektedir.²⁴ Benzer şekilde SEN-V'nin de ORF1'i dört protein kodlamaktadır. Özellikle üçüncü proteininin replikasyonda önemli olduğu düşünülmektedir. Bu üçüncü proteinin aminoasit dizilimi SENV'nin bütün genotiplerinde benzer dizilimdedir. Protein 1, 2 ve 4 ise sadece bazı genotiplerde yer almakta ve aminoasit diziliminde farklılıklar bulunmaktadır. Bu özellik sınıflamada kullanılmaktadır.⁷

ORF 1'deki varyasyonlara göre TTV ve benzeri virüsler dört farklı gruba ayrılmışlardır. Bunlar: Grup 1; SANBAN ve YONBAN izolatları, grup 2; prototip TTV izolatları, grup 3; Panicum Mosaic Virus (PMV) izolatları, grup 4 SENV izolatlarıdır.^{7, 25, 26} Şekil 2'de ORF1 dizi varyasyonlarına dayandırılarak oluşturulmuş filo genetik dendogram gösterilmiştir.⁷



Şekil.2. ORF1 dizi varyasyonlarına dayandırılarak oluşturulmuş filogenetik dendrogram⁷

ORF1'deki varyasyonlara göre SENV de kendi içerisinde dokuz adet genotipe ayrılmaktadır. Bunlar A'dan I'ya kadar isimlendirilmişlerdir.⁹ Bu genotipler arasındaki nükleotid sekans farkı %25 kadardır. **Tablo 2**'de ORF1'e göre oluşturulmuş aminoasit ve nükleotid sekans dizilimlerine göre SENV genotipleri ve TTV arasında ki homoloji gösterilmiştir.⁷

Tablo 2: SENV ve TTV için Nükleotid/aminoasit sekans dizilimi homolojisi⁷

	SENV-A	SENV-B	SENV-C	SENV-D	SENV-E	SENV-F	SENV-G	SENV-H
SENV-B	56.0/55.5							
SENV-C	63.4/52.6	60.7/48.5						
SENV-D	66.4/57.3	61.2/51.0	63.5/52.0					
SENV-E	58.9/47.8	59.1/43.7	58.2/46.6	59.0/46.4				
SENV-F	67.2/57.0	60.9/50.7	61.1/49.2	77.6/76.8	59.4/47.6			
SENV-G	56.6/53.5	60.0/47.9	54.7/46.8	54.8/49.2	52.3/39.1	54.6/49.0		
SENV-H	55.7/51.3	59.9/48.1	78.3/76.2	62.1/52.3	57.4/45.9	61.6/49.5	61.1/47.4	
TTV	51.0/33.1	54.0/34.8	52.7/36.5	53.2/36.1	53.3/34.6	52.7/33.7	51.4/35.4	53.4/35.7

ORF1’de; SEN virus A (SENV-A), SEN virus B (SENV-B), SEN virus C (SENV-C), SENV-D, SEN virus E (SENV-E), SEN virus F (SENV-F), SEN virus G (SENV-G) ve SENV-H genotiplerinde sırasıyla 642, 679, 753, 754, 743, 758, 763 ve 762 adet aminoasit bulunmaktadır.⁷

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. SENV-A ve SENV-B dışında ki genotiplerde ORF1’in ve ORF2’nin aminoasitleri üst üste binmektedir. ORF3 ise, ORF1’in 3’ ucu ile üst üste binmektedir. ORF3’ün de viral replikasyonda rol oynuyor olabileceği düşünülmektedir.⁷

2.1.2. Epidemiyoloji

Günümüzde tüm dünyada olduğu gibi, ülkemizde de önemli sağlık sorunlarından birisi viral etiyolojili karaciğer hastalıklarıdır. Viral hepatit yapan başlıca beş etken (*Hepatit A-E*) tanımlanmıştır. Herpes simpleks virüs, Sitomegalo virüs, Epstein Barr virüs, Adenovirus, Rubella, Kızamık, Suçiçeği, Marburg, Parvovirus ve Ebola virüsleri gibi asıl hedefi karaciğer olmayan ama nadir de olsa hepatit yapabilen etkenler de bulunmaktadır.²⁷⁻³⁸ Gelişen serolojik ve moleküler tekniklere karşın akut ve kronik hepatit olgularının hala bir kısmının etiyolojisi aydınlatılamamaktadır.

Etiyolojisi bilinmeyen hepatitli olgular, bu kliniğe neden olabilecek başka patojenlerin de varlığını düşündürmektedir. Özellikle kan nakli sonrası gelişen, etiyolojisi aydınlatılamayan akut hepatit olgularının varlığı bu düşüncüyü kuvvetlendirmektedir.

TTV, HGV ve SENV'nin de özellikle kan nakli sonrasında hepatit yapabileceği gösterilmiştir. Fakat bu virüslerin herhangi bir klinik ve laboratuvar bulgusu olmayan sağlıklı bireylerde de saptanabilmeleri, patojeniteleri konusunda kuşku duyulmasına neden olmaktadır.^{12, 39-41}

2.1.2.1. Sağlıklı kan donörlerinde SEN virüs sıklığı

SENV'nin tüm genotiplerinin çeşitli oranlarda kanda saptanabildiği gösterilmiştir. Kan nakli ile geçişi olan ve kan nakli sonrası akut hepatit ile ilişkisi bulunan genotipler SENV-D ve SENV-H olarak bildirilmiştir. SENV-A, SENV-B ve SENV-E sağlıklı kan donörleri arasında daha az sıklıkla bulunmakta olup, akut hepatit ile ilişkisi gösterilmemiştir.⁵

Gönüllü kan donörlerinde yapılan çalışmalarda SENV-D ve SENV-H sıklığı ülkeler arasında farklılık göstermesine karşı tüm ülkelerde saptanmıştır. Gönüllü kan donörleri üzerine yapılmış olan çalışmalar **Tablo 3**'de özetlenmiştir.

Tablo 3: Ülkelere göre kan donörlerindeki SENV-D ve SENV-H sıklığı

Ülke	Örnek sayısı	SENV-D(%)	SENV-H(%)	Kaynak
Almanya	100	3.0	5.0	Umemura ve ark. ⁴²
Almanya	112	2.5	7.4	Sagir ve ark. ⁴³
Amerika	436	0.9	0.9	Umemura ve ark. ⁴²
Çek cumhuriyeti	144	2.1	28.5	K Thom ve ark. ⁹
Çin	135	6.7	5.0	Mu ve ark. ⁴⁴
Gana	198	9.6	45.4	K Thom ve ark. ⁹
İskoçya	192	0.5	10.9	K Thom ve ark. ⁹
İskoçya	200	0.5	13.0	K Thom ve ark. ⁹
İran	260	1.5	18.0	Sharifi ve ark. ⁴⁵
İtalya	99	9.1	24.0	Spataro ve ark. ⁴⁶
Japonya	277	7.0	3.0	S Shibata ve ark. ⁴⁷
Japonya	58	14.0	2.0	Umemura ve ark. ⁴²
Slovakya	100	10.0	15.0	K Thom ve ark. ⁹
Tayland	100	1.0	3.0	Tangkij ve ark. ⁴⁸
Tayvan	120	18.3	5.8	Dai ve ark. ¹⁵
Tayvan	200	32.0	30.5	Huang ve ark. ⁸
Türkiye	100	5.0	20.0	Tezcan ve ark. ¹¹
Türkiye	50	4.0	6.0	Serin ve ark. ⁴⁹
Yunanistan	100	16.0	7.0	Umemura ve ark. ⁴²

2.1.2.2. Değişik komorbid faktörlerin varlığında SEN virüs sıklığı

Diyaliz, kan nakli, IV ilaç kullanımı, cerrahi operasyon gibi risk faktörlerinin varlığında SENV sıklığının arttığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir.

Kan naklinin, SENV sıklığı üzerindeki etkisini inceleyen ilk çalışmalardan biri de Umemura ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmadır.⁵ Çeşitli nedenlerle ameliyat olacak olan 394 hasta çalışmaya alınmış ve 11'i operasyon öncesinde SENV pozitifliği olması nedeniyle çalışmadan çıkarılmıştır. Operasyon sonrasında kan nakli alan 286 hasta SENV

açısından değerlendirilmeye alınmış ve 16'sında SENV-D, 80'inde SENV-H, 10 hastada da her iki genotipin pozitifliği saptanmıştır. Toplamda, operasyon sonrası kan nakli alan hastaların %30'unda SENV pozitifliği saptanmıştır. Kan nakli olmaksızın sadece ameliyat olan hastalarda ise oran %3 olarak bulunmuştur. Aynı hastanede gönüllü kan donörü bireylerde ise bu oran %3 olarak gözlenmiştir. Aynı çalışmada kan nakli sonrası etiyolojisi bilinmeyen ve akut hepatit gelişen 12 hastada ise %83 oranında SENV pozitifliği saptanmıştır.

Çok sayıda kan nakli alma öyküsü bulunan talasemi hastalarında SENV-D için %52,7'lik, SENV-H için %40'lık pozitiflik saptanmıştır. Hastaların %25,5'i aynı anda her iki etken ile de enfekte olarak bulunmuştur.¹⁴

Intravenöz ilaç bağımlısı olan 531 kişi ile yapılan bir başka çalışmada SENV-A %45,7, SENV-D %10,3 ve SENV-H %35,6 oranında pozitif bulunmuştur.¹³

Karaciğer kanseri olan hasta grubunda pozitiflik oranı %36 olarak saptanmıştır.¹⁶

Sağır ve arkadaşlarının Almanya'da 217 HIV ile enfekte hasta üzerinde yapmış oldukları 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 donörlerine göre daha yüksek oranda bulunduğu gösterilmiştir.⁴³

Dört yüz yetmiş üç kronik hepatit C hastası ile yapılan çalışmada ise SENV %41 sıklıkta saptanmıştır.¹⁴

Kanada'da yapılan bir çalışmada, akut hepatit A'lı hastalarda SENV sıklığı topluma göre yüksek bulunmuş ve SENV'nin parenteral bulaşma yolları dışında başka bulaş yollarının da olduğu ileri sürülmüştür.⁵⁰

SENV pozitifliği olan 15 gebenin bebekleri doğum sonrası izlenmiş ve 13'ünde SENV pozitifliği saptanmıştır. Bebeklerin birinde SENV pozitifliği doğumda, sekizinde ilk altı ayda ve dördünde birinci yıl sonunda saptanmış ancak bebeklerin hiçbirinde klinik bulgu saptanmamıştır.⁵¹

2.1.2.3. Ülkemizde SENV çalışmaları

Ülkemizde diyaliz hastalarında, etiyolojisi aydınlatılamayan akut hepatitlerde SENV-H ve SENV-D'nin sıklığı ile ilgili çalışmalar yapılmıştır.

Serin ve arkadaşlarının 2005 yılında yaptığı çalışmada, etiyojisi aydınlatılmayan KCFT yüksekliği olan 100 hastanın 13 (%13)'ünde SENV pozitifliği saptanmıştır. Aynı çalışmada 50 kontrol hastasında ise %5 pozitiflik saptanmıştır. İki grup arasında anlamlı fark saptanmamıştır.¹⁰

Tezcan ve arkadaşlarının Mersin Üniversitesi'nde yapmış oldukları çalışmada ise 100 hemodiyaliz hastası incelenmiş olup, SENV-D için %33, SENV-H için %22 pozitiflik saptanmıştır.¹¹

2.1.3. Patogenezi

SENV'nin de diğer hepatit virüsleri gibi karaciğer dokusunda replike olduğu 2001 yılında gösterilmiştir.⁵ SENV ile enfekte olduğu bilinen iki karaciğer kanser hastasının tedavi amaçlı karaciğer dokusunun çıkarılmasını takiben, sağlam ve tümörlü dokular ile çalışma yapılmıştır. Bu hastaların tedavi amacıyla karaciğer dokularının çıkartılacak olması, tercih edilmelerinin nedeni olarak gösterilmiştir. İlk olarak elde edilen tümör dokuları ve sağlam karaciğer dokuları DNAaz ile işleminden geçirilerek hem hücresel, hem de viral DNA'ların ortamdaki uzaklaştırıldığı belirtilmiştir. Geriye kalan RNA'lardan revers transkriptaz enzimi yardımı ile komplementer DNA'lar (cDNA) elde edilmiş, elde edilen ürünler PZR ile test edilmiştir. Hem tümörlü hem de sağlam dokudan SENV'ye ait cDNA elde edilerek karaciğer dokusunda SENV'nin replike olduğu gösterilmiştir.

Momosaki ve arkadaşlarının 2005 yılında yaptığı çalışmada hepatosellüler karsinom ile takip edilen hastaların karaciğer dokuları incelenmiştir.¹⁶ Hem sağlam karaciğer dokusunda, hem de tümörlü dokuda SENV varlığı gösterilmiştir. Sekiz hastanın altısında tümör dokusunda, karaciğer dokusunda ve serumda SENV-D, SENV-H birlikte saptanmıştır. Diğer iki hastada ise tümör ve karaciğer dokusunda SENV-D ve SENV-H saptanırken, serumda sadece SENV-D gösterilmiştir.

Yirmi kronik hepatit C hastası ve 11 kriptojenik hepatit hastasının geriye yönelik incelenmesi sonucunda SENV'nin inkübasyon ve viremi süresiyle ilgili veriler elde edilmiştir.⁵ Kan nakli öncesi SENV enfeksiyonu olmayan hastaların kan nakli sonrasında SENV'nin PZR ile saptanma süresinin ortalama dört-sekiz hafta olduğu gösterilmiştir. Otuz bir hastadan 17 hastanın viremi altı ay sürmüş olup üç hastanın iki yıl içinde, altı hastanın

iki-beş yıl, dört hastanın ise dört-on iki yıl içinde PZR'nin negatifleştiği görülmüştür. Hastaların yaklaşık yarısında viral klirensin altı ayda gerçekleştiği gösterilmiştir.

SENV'nin yıllarca viremi yapabilmesinin, yüksek değişkenlik gösteren bölgesindeki mutasyon oranıyla ilişkili olabileceği belirtilmiştir. Yılda 7.32×10^{-4} düzeyinde mutasyon gösterebilmektedir.^{25, 47} Bu mutasyon oranının, diğer DNA virüslerinden daha yüksek olduğu ve hepatit C gibi RNA virüslerindeki mutasyon oranına daha çok benzediği bildirilmiştir.²⁵

2.1.4. SENV Virüsünün Laboratuvar Tanısı

SENV ilk tespit edildiği yıllarda sıklıkla enzyim immünoassay (EIA) yöntemi ile saptanmaktaydı. Bu yöntemde çalışılacak örnek PZR ile çoğaltılmakta ve biotinle işaretlenmiş probalar aracılığıyla EIA yöntemi ile saptanmaktaydı.⁷ Gelişen moleküler teknoloji ile beraber SENV'nin tespit edilmesi jel PZR, yarı nested PZR, nested PZR ve gerçek zamanlı PZR (real-time PCR) ile olabilmektedir. EIA yöntemine göre PZR yöntemlerinin daha duyarlı ve özgün olduğu gösterilmiştir.^{6, 7, 19}

Günümüzde duyarlılığı 5 kopya/ml'ye kadar inebilen primerler mevcuttur. Primerlerin duyarlılığına göre başarı oranları değişmektedir. Farklı primerlerle aynı hasta gruplarında farklı sonuçlar alınabilmektedir.⁶ Bunun nedenlerinden biri SENV'nin yüksek genetik çeşitliliğe sahip olmasıdır. SENV genotipleri arasında nükleotid homolojisi %52–78 olarak, ORF1'in aminoasit sekans homolojisi ise %39–77 olarak saptanmıştır.⁷

SENV antikollarını tespit edebilecek serolojik bir test henüz mevcut değildir.⁷

2.2. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU

PZR, nükleik asitlerin in vitro şartlarda replikasyonu için geliştirilmiş bir tüp test sistemidir. İn vivo ortamda bölünen bir hücre genomunun replikasyon yöntemi örnek alınmıştır. PZR işleminde genomun tamamı değil, yalnızca belli bir bölgesi in vitro ortamda çoğaltılmaktadır.^{52, 53}

Birinci reaksiyonda üretilen bütün nükleik asitlerin bir sonraki reaksiyonda kalıp görevi görmesi ve bu işlemlerin siklus serisi içinde birbirini izlemesi nedeni ile bu işlemler dizisi 'zincir reaksiyonu' olarak adlandırılmıştır.⁵⁴

1985 yılında ilk kez Kary Mullis tarafından keşfedilmiştir. *Thermus aquaticus* isimli bakteriden izole ettiği Taq polimeraz enzimi sayesinde nükleik asitlerin çoğaltılmasını sağlamıştır. Bu enziminin özelliği yüksek ve farklı ısılarda aktivitesini korumasıdır.⁵⁴

Araştırılması yapılacak olan materyalin PZR yöntemi ile incelenmesi 3 ana basamağın uygulanması ile gerçekleşmektedir:

- 1) İncelenecek olan materyalin nükleik asitinin izolasyonu
- 2) Elde edilen nükleik asitin çoğaltılması (amplifikasyon)
- 3) Çoğaltılmış olan nükleik asitin saptanması

2.2.1. Nükleik Asit İzolasyonu

Nükleik asit izolasyon işlemleri, çoğaltılacak olan nükleik asitlerin işlem öncesi mümkün olduğunca saf hale getirilmesini amaçlar. DNA ve RNA yıkımına neden olan enzimler, hemoglobin gibi PZR çalışmasını engelleyen etkenler ortamdan uzaklaştırılır. Nükleik asit, protein kompleksinin birbirinden ayrılmasını ve ayrıca varsa, hücre membranının parçalanarak uzaklaştırılması sağlanır.⁵⁵

Nükleik asit izolasyonu için farklı yöntemler bulunmaktadır. Hangi yöntemin kullanılması gerektiği, izole edilmek istenilen nükleik asitin cinsine (krozomal DNA, organel DNA, RNA vb.), izolasyonun yapılacağı kaynağa (virüs, mantar, memeli hücresi vb.) ve izolasyon sonrası elde edilen nükleik asitin kullanım amacına göre belirlenmesi gerekir. Her izolasyon yönteminin avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır. Örneğin, ucuz olduğu kadar basit de olan kaynatma yöntemi hücre membranlarının parçalanması için kullanılabilir. Fakat uygulama sonrası tek sarmallı DNA elde edildiği için çift sarmallı DNA çalışmalarında kullanılamamaktadır. Fenol/kloroform yöntemi ile diğer yöntemlere göre kısmen daha saf DNA örnekleri elde edilmektedir. Ancak bu yöntemde zaman kaybı önemli bir faktördür. Ayrıca, yapılan işlemlerin fazlalığından dolayı kontaminasyon riski de yüksektir. Silika yöntemi ise son yıllarda kullanımı artan ticari bir yöntemdir. Nükleik asit izolasyonu için zaman kazandıran bir yöntemdir. İzolasyon yöntemleri kendi içlerinde çok farklı gibi gözükse bile hepsinde şu temel aşamalar bulunmaktadır:

- 1) DNA'sı izole edilecek olan hücrenin duvar ya da membranının kimyasal veya enzimatik yöntemlerle parçalanması,

- 2) Hücre artıklarının santrifüj ile uzaklaştırılması,
- 3) Deterjan ve protein parçalayıcı enzimler kullanılarak denatürasyon veya proteoliz yolu ile DNA-protein kompleksinin (histon) ayrılarak çözünür hale getirilmesi,
- 4) DNA'nın suda çözünmesi, alkolde çözünmemesi özelliğinden yararlanılarak etanol veya izopropanol içinde çöktürülerek DNA çökeltisi elde edilmesi,
- 5) DNA koruyucu tampon çözeltisi içerisinde süspanse edilerek amplifikasyona hazır hale getirilmesi.⁵⁵

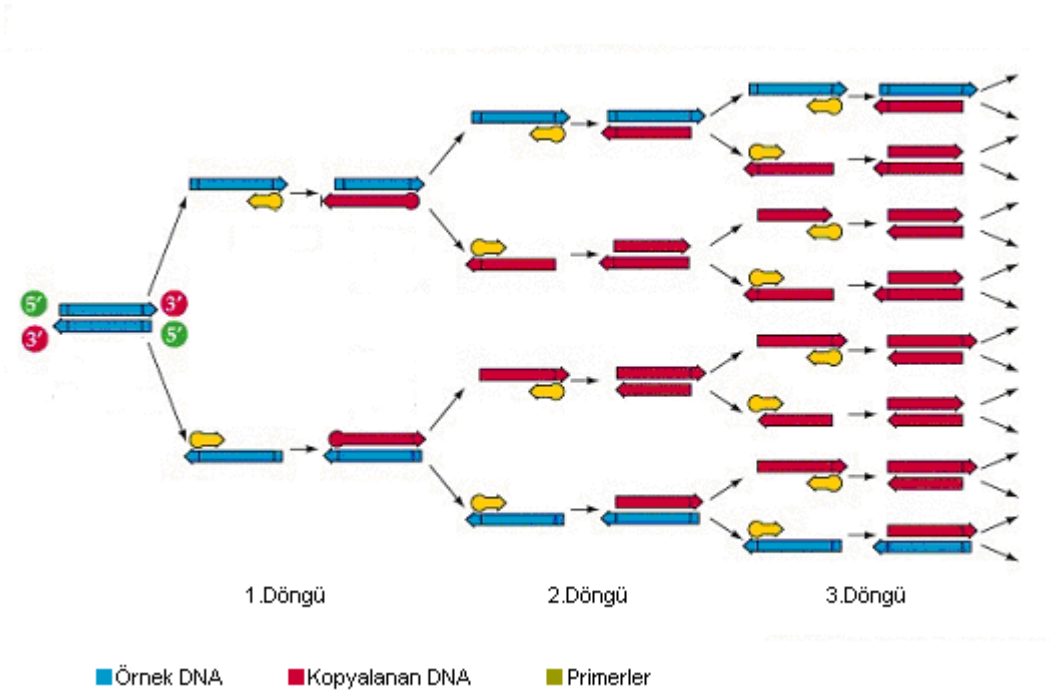
2.2.1.1. Silika Yöntemi

Bu yöntemde hücre zarını parçalamak için Guanidium izotiyosiyanat kullanılmaktadır. Bu maddenin ayrıca her iki molekül ucunda pozitif yüklü amin grubu bulunmaktadır. İşlemler sırasında bir amin grubuna DNA, diğer amin grubuna da silika bağlanmaktadır. Yıkama işlemleri sırasında ortamdaki protein ve istenmeyen maddeler uzaklaştırılırken, DNA silikaya bağlı şekilde tutulmaktadır. Böylece PZR için inhibitör maddeler ortamdan uzaklaştırılırken, saf şekilde DNA elde edilir.⁵⁶

2.2.2 Nükleik Asitin çoğaltılması

İn vivo şartlarda DNA replikasyonu sırasında ilk önce hücre içi enzimler tarafından çift iplikli DNA'nın bazı bölgeleri açılarak iki adet tek iplikli DNA şekline dönüştürülür. Ardından RNA polimeraz aracılığı ile replikasyonun başlangıç bölgesine tek iplikli DNA'yı tamamlayan RNA sentezlenir. Bu RNA sadece birkaç nükleotidden (oligonükleotid) oluşmaktadır ve tek iplikli DNA'nın sadece başlangıç bölgesindeki birkaç nükleotidi tamamlar. DNA ve RNA'dan oluşmuş başlangıç bölgesi DNA polimerazın replikasyona başlaması için bir hedef oluşturur. Ardından her iki tek iplikli DNA'nın karşısına tamamlayıcı (komplementer) bir DNA sentezlenerek iki adet çift sarmallı DNA elde edilir. İn vitro ortamda replikasyon da benzer şartlar sağlanarak gerçekleştirilir. Kısaca üç basamağı bulunmaktadır;

1. Çift iplikli DNA (dsDNA)'nın ısı (90–95°C) ile tek iplikli DNA (ssDNA)'ya dönüştürülmesi (denatürasyonu),
2. Ortamın 40–60°C'ye soğutulmasıyla primerlerin (spesifik sentetik oligonükleotitler) ssDNA'ya bağlanması (bağlanma, annealing),
3. Sıcaklığın 70–75°C'ye yükseltilmesiyle ssDNA kalıplarına bağlanmış olan primerlerden 5'-3' yönünde zincir uzamasının gerçekleşmesi (uzama, elongasyon).⁵⁴

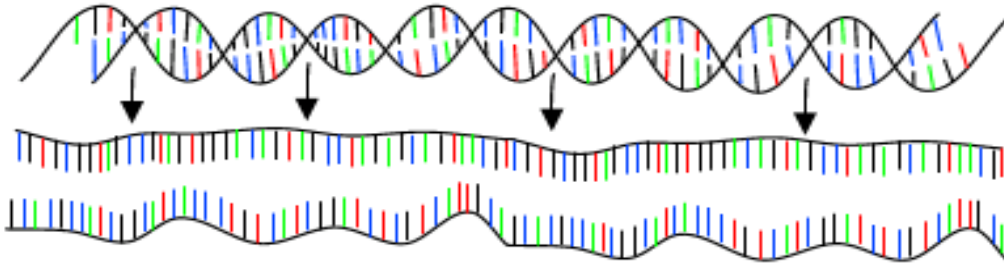


Şekil.3: PZR aşamaları⁵⁷

2.2.2.1. Denatürasyon

Denatürasyon, protein yapılı moleküllerin, nükleik asitlerin ve enzimlerin ısı, ışık, radyasyon gibi nedenlerle yapısında meydana gelen bozulmalardır. Bu olay, geri dönüşüz olarak tanımlanmaktadır. Fakat PZR için daha farklı bir anlam ifade etmektedir.

DNA'nın iki ipliği, karşılıklı olarak yer alan pürin ve pirimidin nükleotidleri arasındaki hidrojen bağları ile bir arada tutulmaktadır. Adenin (A) ile timin (T) arasında iki, guanin(G) ile sitozin(S) arasında da üç hidrojen bağı bulunmaktadır. Bu bağlar, ısı ve ortamın pH değişikliği ile koparılabilmektedir. 94-96°C ısı ile çift iplikli DNA tek iplikli iki adet DNA'ya ayrılabilir. Bu olay, denatürasyon olarak tanımlanmıştır. Koşullar eski haline getirilince tekrar çift iplikli DNA elde edilir. Bu bağların yarısının açıldığı ısıya ise erime sıcaklığı (melting temperature, T_m) adı verilir. Bu ısı derecesi de, DNA'nın içerdiği A-T ve G-S bağlarının oranına göre değişmektedir. G ile S bağı arttıkça erime ısı yükselmektedir.⁵³

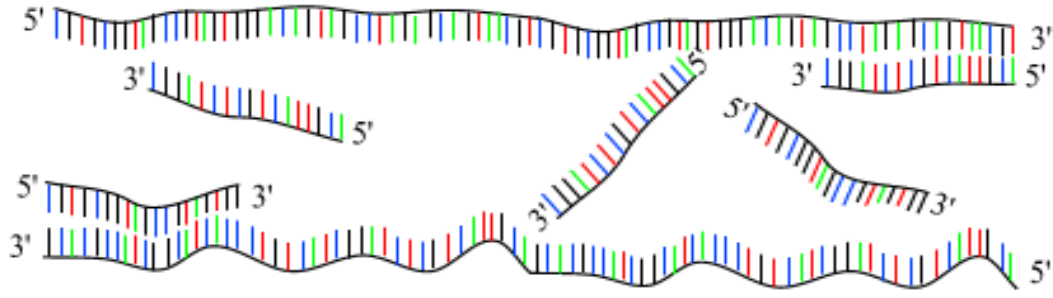


Şekil.4: Denatürasyon⁵⁸

2.2.2.2. Bağlanma

İn vivo ortamda replikasyon sırasında RNA polimeraz tek iplikli DNA'ların karşısına tamamlayıcı özellikte oligonükleotidli RNA sentezler. İn vitro ortamda ise denatürasyon işleminden sonra elde edilen tek iplikli DNA'ların replikasyonunda RNA polimeraz kullanılmaz. Burada varlığı araştırılan nükleik asitin nükleotid dizilimine uygun yapay oligo nükleotidler kullanılır. Bunlara primer adı verilir. Böylece, in vitro ortamda araştırılan nükleik asit varsa, primer ona bağlanarak DNA polimeraz için başlangıç bölgesi oluşturmuş olur ve replikasyon gerçekleşir. Fakat, araştırılan nükleik asit yoksa veya farklı bir nükleik asit varsa birleşme gerçekleşmez ve replikasyon olmaz.^{53, 55}

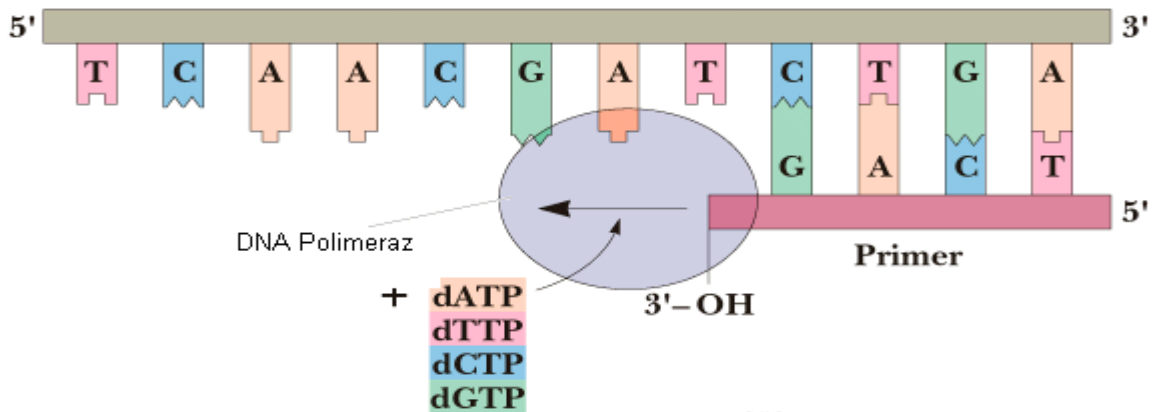
Bu işlem örneğin 30-60°C'de birkaç dakika tutulması ile gerçekleşir. Isı, primerlerin yapısına ve T_m derecesine göre ayarlanır. Ortamın bu ısıda tutulması sadece DNA/DNA eşleşmesine izin verir ve DNA'ya sadece primerlerin bağlanması sağlanır.^{53, 55}



Şekil.5: Primerlerin bağlanması⁵⁸

2.2.2.3. Uzama

Uzama işlemi, DNA polimeraz enzimi ile tek iplikli DNA'nın karşısına nükleotidler eklenmesiyle gerçekleşir. İşlemin gerçekleşmesi için 65-72°C'de birkaç dakika beklenmesi gerekir. Taq polimeraz bu ısıda ortalama 2000 nükleotid/dakika hızında çalışmaktadır. Küçük uzunluktaki ürünlerde denatürasyon problemi yaşanacağı için örnek uzunluğuna göre çalışma ısı 62°C'ye kadar düşürülebilir. Uzama 5' ucundan 3' ucuna doğru olur. İşlem tamamlandığında mevcut DNA'nın iki katı kadar DNA elde edilir. Bu işlem 30 kez tekrarlandığında milyardan fazla DNA elde edilmiş olur.^{53, 55, 59}



Şekil 6: Uzama⁵⁵

2.2.3. Nükleik Asitlerin Saptanması

Çoğaltılan nükleik asitlerin saptanması için elektroforez, spektrofotometri, radyoizotopların kullanımı, immünolojik yöntemler, elektron mikroskopisi ve dizi analizi gibi yöntemler kullanılabilir. Seçilecek olan yöntem çalışmanın amacına göre belirlenmektedir.⁵⁵

2.2.3.1. Jel Elektroforezi

Sık kullanılan geleneksel bir yöntemdir. Elde edilen ürüne elektroforez uygulandıktan sonra etidyum bromür ile boyama gerçekleştirilir. Ultraviyole altında görüntülemesi yapılarak sonuçlar elde edilir.

DNA negatif yüklüdür. Elektroforez sırasında pozitif kutba doğru ilerler. İçinde ilerlediği agaroz jel, porlu bir yapıya sahiptir. Zaman içerisinde DNA molekülleri büyüklüklerine göre jel üzerinde yayılır. Çalışma öncesinde saptanması planlanan nükleik asitin büyüklüğü daha önceki çalışmalara ait literatür bilgilerinden öğrenilir. Hesaplanan büyüklükteki bant hizasında örnek görülmesi pozitif olarak kabul edilir. Hesaplanan büyüklüğün bant üzerinde gösterilmesinde ticari olarak satılan standart DNA molekülü veya pozitif kontrol örneği kullanılabilir.⁵³

Etidyum bromür ile görüntüleme sadece çift iplikli DNA tespitinde kullanılabilir. RNA ve tek iplikli DNA tespiti için cyber green boyasının kullanılması gerekir.

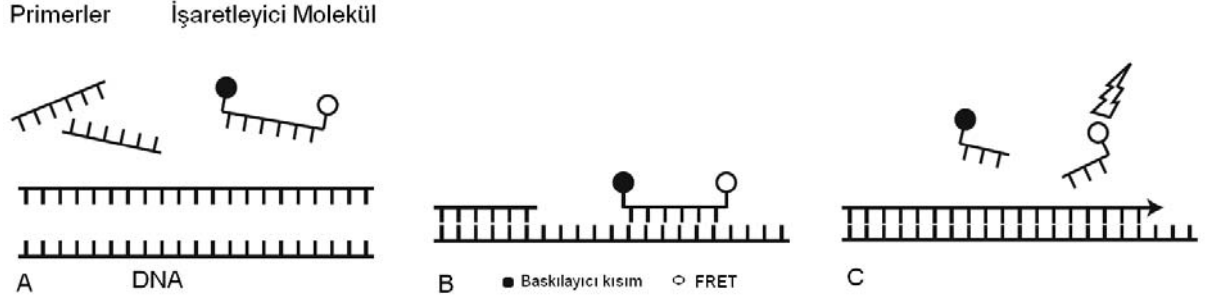
Jel elektroforez, ucuz olmasına rağmen zaman alıcı, zahmetli ve duyarlılığı sınırlıdır.⁵³

2.2.3.2. Hibridizasyon

Floresan yöntemi sayesinde nükleik asitlerin çoğalma aşamasında bile saptanabilmesi sağlanmıştır. Böylece, çoğalan ürünler hem işlem sırasında hem de işlem sonunda görülebilmektedir. Bu da kantitatif olarak örneklerin değerlendirilmesine olanak sağlamıştır. Bugüne kadar konu ile ilgili dört adet teknik geliştirilmiştir. Bunlar Taqman, moleküler beacon (moleküler boncuk), light cycler ve ampliflor teknikleridir. Bu teknikler floresan rezonans enerji transferi (FRET) temeline dayanır.^{53, 59}

Taqman tekniğinde işaretleyici molekülün 5' ucunda FRET, 3' ucunda da baskılayıcı kısım bulunur. Bu iki kısmın bir arada bulunması FRET kısmının floresan yayılımını engeller. Bulunması hedeflenen nükleik asite bağlanması durumunda DNA polimerazın ekzonükleaz aktivitesi ile iki kısım birbirinden ayrılır ve FRET kısmı floresan özelliği kazanır. Nükleik asit

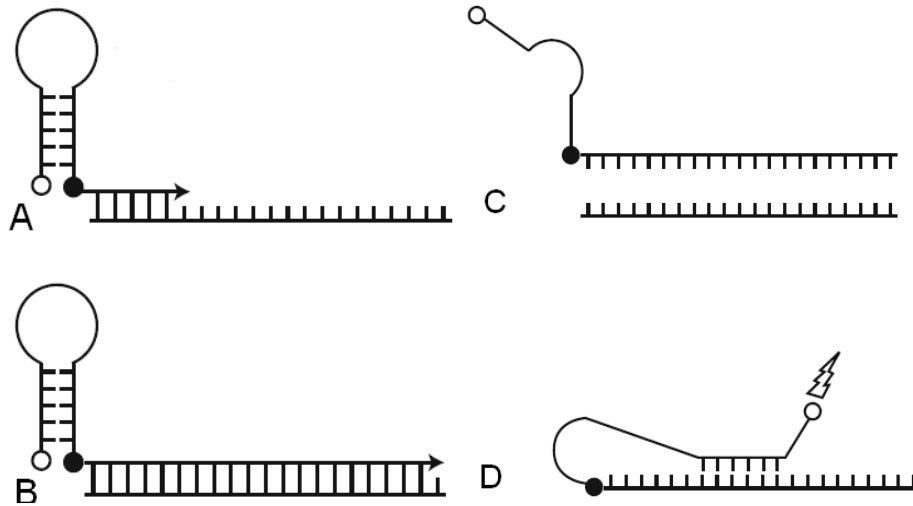
miktarı arttıkça floresan şiddeti artar. Böylece, hem işlem sırasında hem de işlem sonunda floresan şiddetine göre nükleik asit miktarı saptanabilir.^{53, 59}



Şekil 7: Taqman tekniği⁵⁹

- A. DNA, primerler ve işaretleyici molekül
- B. Hedef DNA'ya primer ve işaretleyici molekül bağlanması
- C. DNA polimerazın etkisi ile iki kısım birbirinde ayrılıyor ve ışımaya başlaması

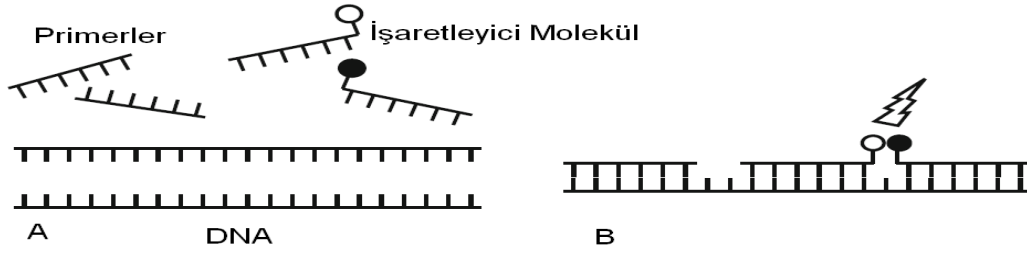
Moleküler beacon metodunda ise, Taqman'dan farklı olarak, iki kısım birbirinden ayrılmadan önce mümkün olduğunca yakın olarak durmakta böylece, bağlanma olmadığı zaman floresan şiddeti en düşük seviyede kalmaktadır.^{53, 60}



Şekil 8: Ampliflor tekniği⁵⁹

- A Primer ve işaretleyici molekülün bağlanması
- B Karşı DNA ipliğinin tamamlanması
- C DNA polimerazın işaretleyici molekülün iki kısmının birbirinden ayrılması
- D İkinci denatürasyonda işaretleyici molekülün DNA'ya bağlanması ve ışımaya gerçekleşmesi

Lightcycler yönteminde ise iki komşu prob kullanılır. Hedefe bağlandıkları zaman birbirleri ile de temas ederler ve floresans oluşturur.



Şekil 9: Lightcycler yöntemi ⁵⁹

A DNA, primerler ve işaretleyici molekül

B İki işaretleyici molekül DNA'ya bağlanması ve yan yana gelince ışınması

2.2.4. Polimeraz zincir reaksiyonu bileşenleri

PZR, genel olarak 94°C'de 20 saniyelik (sn) denatürasyon, 55°C'de 20 sn'lik bağlanma ve 72°C'de 30 sn'lik uzamadan oluşan 30 siklusk bir döngü programıdır. Reaksiyon termal döngülerin programlandığı ve uygulandığı bir cihaz (termal cycler) tarafından gerçekleştirilir. Bütün bu işlemler çalışılacak olan örnek ile birlikte PZR bileşenlerin bulunduğu 50–100 µL'lik bir hacim içerisinde gerçekleşir. ^{53, 55} Bu bileşenler:

- 1) Enzim
- 2) Deoksiribonükleotid Trifosfatlar
- 3) PZR Tampon İçeriği
- 4) Oligonükleotidler (Primer)

2.2.4.1. Enzim

En yaygın olarak kullanılan DNA polimeraz, *Thermus aquaticus*'dan izole edilen Taq polimeraz olmakla birlikte, bunun dışında *T. thermophilus* DNA polimeraz, *Bacillus stearothermophilus* DNA polimeraz ve *Thermococcus litoralis* DNA polimeraz gibi alternatif ısıya dayanıklı enzimler de kullanılabilir.

Enzim konsantrasyonu çalışmalar arasında farklılık göstermesine rağmen çoğunlukla 1–2,5 U/ 100 µL arasındaki konsantrasyonlarda kullanılır. Konsantrasyon, çok yüksek olduğunda uygun olmayan eşleşme, düşük olduğunda ise az ürün elde edilir ⁶⁰.

2.2.4.2. Deoksiribonükleotid Trifosfatlar

Deoksiribonükleotid trifosfatların (dNTP) optimal konsantrasyonu her reaksiyon için ayrı ayrı hesaplanmalı ve Mg^{+2} konsantrasyonu ile uyumlu olarak kullanılmalıdır. Genellikle 20 ile 200 mM arasındaki konsantrasyonlarda kullanılır. Yüksek konsantrasyonlar düşük reaksiyon duyarlılığı ve yüksek maliyet ile sonuçlanırken, düşük konsantrasyonlar normale göre daha az ürün elde edilmesi ile sonuçlanır.⁶⁰

Liyofilize veya nötralize sulu solüsyonlar şeklinde dNTP'ler elde edilebilir. Herbiri -20° derecede birkaç ay stabildir fakat, liyofilize olanların kullanmadan önce KOH ile nötralize edilmeleri gerekebilir.⁶⁰

2.2.4.3. PZR Tampon İçeriği

1988 yılında Saiki ve arkadaşlarının tanımladığı PZR tampon içeriğinin içerisinde 10 mM Tris (pH 8,4) , 50 mM KCl, 1,5 mM $MgCl_2$, %0.01 jelatin, %0.01 NP04 ve %0.01 Tween 20 bulunmaktadır.⁶⁰

Reaksiyona katılan Mg^{+2} , önemli bir enzim kofaktörü olup, sentez olayını katalize etmenin yanında, hedef dizine primerlerin bağlanmasında da ayarlayıcı rolü olan bir elemandır. $MgCl_2$ konsantrasyonunu, kullanılacak olan dNTP konsantrasyonuna göre arttırmak gerekebilir. Genellikle her bir dNTP'nin 200mM konsantrasyonunda bulunduğu bir reaksiyonda, optimal olarak 1,5 mM $MgCl_2$ kullanılabilir. Mg^{+2} konsantrasyonunu gereğinden fazla arttırmak, başlangıçta primer bağlantısının zayıf olmasına ve yanlış eşleşmelere neden olabilmektedir. Diğer taraftan, yüksek Mg^{+2} konsantrasyonu, zayıf reaksiyon özgülüğüne, düşük Mg^{+2} konsantrasyonu ise zayıf reaksiyon etkinliğine neden olabilmektedir.^{53, 60}

2.2.4.4. Oligonükleotid Primerler

Oligonükleotidler genellikle 18–30 baz arasında sentezlenir. Plazmidler veya daha önceden amplifiye edilen DNA'ların çoğaltılması için daha kısa primerler kullanılabilir.

Bir PZR'de, başarılı bir amplifikasyon için önemli değişkenlerden biri primerlerin doğru tasarlanmasıdır. İyi tasarlanmış primerler özgül olmayan ürünlerin oluşmasını engellemeye yardımcı olur. Primer dizilerinin G+C içeriği, amplifiye edilecek bölgenin G+C

içeriğine yakın olmalıdır. Özellikle 3' ucunda sekonder yapılar taşıyan dizilerden kaçınılmalıdır. Primerler birbirleriyle komplementer oluşturacak nitelikte olmamalıdır. Uzun primerler (24–30 bazlık) 60°C ve üzerindeki bağlanma sıcaklığında oldukça iyi çalışmaktadır. Düşük konsantrasyonda primer kullanılması az miktarda reaksiyon ürünü elde edilmesine, yüksek konsantrasyonlarda kullanım ise düşük özgüllüğe neden olur ki, bu durum çok farklı ürünlerin tespiti ile mümkündür. Ancak, yüksek primer konsantrasyonları, primer-dimer artefaktlarının oluşmasına da neden olmaktadır.^{53, 60}

2.2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Tipleri

İnvers (tersine dönmüş) PZR, homopolimerli PZR, insitu PZR, hot start (sıcak başlangıç) PZR, multipleks PZR, kantitatif PZR, nested PZR, revers transkriptaz PZR, touch down PZR, broad range PZR ve gerçek zamanlı PZR vb. gibi çeşitleri bulunmaktadır.⁵⁵

Multipleks PZR, birçok infeksiyonun tanısında kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem, klinik örnek içersinde bulunabilecek farklı mikroorganizmalar veya tek bir mikroorganizmanın farklı bölgelerinin saptanması için kullanılır. Çalışma ortamında birden fazla primer bulunur. Elde edilen ürünler farklı molekül büyüklüğünde olduğu için sonuçlar birbirinden ayrı olarak değerlendirilebilir.⁵⁵

Broad range PZR, sepsis ve menenjitte etken olabilecek bakteri, virus ve parazitlerin hızlı bir şekilde gösterilmesini amaçlamaktadır. Ayrıca, güç üreyen ve kültürü yapılamayan mikroorganizmaların da tanısında kullanılır. Bakteriyel sepsiste bütün bakteriler için ortak olan ve mutasyondan korunmuş bir DNA dizisi primer olarak kullanılır. Bu yöntemin klinik kullanımındaki en büyük problem çevresel kontaminasyonlar ve normal flora bakterileridir.⁵³

Nested PZR ise iki aşamalıdır. İlk aşamada çoğaltılması istenilen nükleik asitin dış kısmı, ikinci de ise iç kısmının amplifikasyonu yapılır. Böylece çok sayıda DNA elde edilir ve negatif sonuçların en aza indirilmesi sağlanır.⁵³

In situ PZR, lam üzerinde tespit edilmiş olan enfekte hücre içersindeki mikroorganizmanın tespitinde kullanılır. Örneğin, çeşitli kimyasal işlemlerden geçtikten sonra hücre içersinde amplifikasyon işlemi yapılır. Böylece, çevreden kontaminasyon riski ortadan kalkmış olur.⁵³

Amplifikasyon için solüsyon hazırlanırken istenmeyen bir şekilde primer ile hedef DNA arasında birleşmeler olabilmekte ve birleşmelerden ortaya anlamı olmayan ve

istenmeyen sonuçlar çıkabilmektedir. Hot start PZR, bunu engellemek için ortama Mg^{+2} , nükleotidler veya DNA polimeraz enzimi denatürasyon işlemi yapıldıktan sonra eklenir.⁵³

Reverse transkriptinaz PZR, mRNA ve viral RNA örneklerinin çoğaltılmasında kullanılır.⁵³

Touchdown PZR'da primerlerin hedef bölgeye bağlanması için gerekli olan sıcaklığın saptaması için kullanılan bir yöntemdir.⁵³

Real-time PZR, nükleik asitlerin çoğalması sırasında ortaya çıkan floresan miktarını ölçerek kısa sürede kantitatif sonuç verebilen bir yöntemdir. Ticari olarak üç tipi geliştirilmiştir bunlar Lightcycler, Taqman ve İcycler'dır.⁵³

Lightcycler, çoğunlukla çift iplikli DNA ile ilgili çalışmalarda kullanılır. Floresan madde olarak cyber green'den yararlanılmaktadır. Bu maddenin özelliği sadece çift iplikli DNA'ya bağlanabilmesidir. Çift iplikli DNA ürünleri ortamda arttıkça onlara bağlanmakta ve ortama daha fazla floresan vermektedir. Bu uygulamada floresan artışı bazen primerlerin birbirlerine bağlanması ile de meydana gelebilmektedir. Bu olumsuz faktörü engellemek için Tm derecesi kullanılarak gerçek ürünlerin gerçek sonuçlarına varılabilmektedir. Çoğaltılması planlanan nükleik asitin uzunluğu, primerlerden uzun olduğu için, Tm derecesinde primerler birbirlerine bağlanamazlar. Nükleik asit ise o sıcaklıkta bağlarının yarısı kopmuş bir şekilde bulunur.⁵³

Denatürasyon işleminden sonra sıcaklık yavaş yavaş yükseltilerek belirli aralıklarla floresan miktarı kaydedilir. Çift iplikli DNA birbirinden ayrılmaya başlayınca cyber green serbest kalmakta ve floresan miktarı azalmaktadır. Aynı koşullarda işleme alınan pozitif kontrol ile örneklerin Tm dereceleri karşılaştırılıp PZR sonucunun doğru veya yanlış olduğuna karar verilebilir.⁵³

Gerçek zamanlı PZR ile kısa sürede kantitatif sonuçların elde edilmesi ve tüpler açılmadan sonuç alınabildiği için kontaminasyon riskinin düşük olması en büyük avantajlarından biridir.⁵³

3. OLGULAR, GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. OLGULAR

3.1.1. Çalışma yerleri

Bu çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi (DEÜTF) Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, DEÜTF Öğrenme Kaynakları Merkezi Araştırma Laboratuvarı ve GENMAR teşhis ürünleri AR-GE laboratuvarında yapılmıştır.

3.1.2. Hasta grubu

27.5.2010 ile 27.5.2011 tarihleri arasında, DEÜTF Hematoloji Bilim Dalı servisinde yatarak tedavi gören, gönüllü hematolojik kanser tanısı olan hastalar çalışma kapsamına alınmıştır. On sekiz yaşından büyük ve en az bir kez kan ürünü transfüzyonu olan hastalar çalışmaya dahil edilmiştir.

3.1.3. Hasta grubu dışlama kriterleri

Hasta grubu için dışlama kriterleri aşağıda belirtildiği gibidir:

- 1) On sekiz yaşından küçük olanlar,
- 2) Gebe olanlar,
- 3) Kan ürünü transfüzyonu olmamış olanlar,
- 4) Hematolojik kanser tanısı bulunmayan hastalar çalışmaya alınmamıştır.

3.1.4. Kontrol grubu

27.5.2010 ile 27.5.2011 tarihleri arasında DEÜTF Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı servisinde çeşitli tanılar ile yatarak izlenen gönüllü hastalar

çalışmaya dahil edilmiştir. On sekiz yaşından büyük olan ve kan ürünü transfüzyonu almamış hastalar çalışmaya dahil edilmiştir.

3.1.5. Kontrol grubu dışlama kriterleri

Kontrol grubu için dışlama kriterleri aşağıda belirtildiği gibidir;

- 1) On sekiz yaşından küçük olanlar,
- 2) Gebe olanlar,
- 3) Kan ürünü transfüzyonu almış olanlar,
- 4) Solid veya hematolojik malignite tanısı olanlar çalışmaya alınmamıştır.

3.1.6. Örnek büyüklüğünün hesaplanması

Örnek büyüklüğünün hesaplanması için DEÜTF Halk Sağlığı Anabilim Dalı'ndan destek alındı. Pubmed veri tabanından yapılan incelemede hematolojik kanserli hastalar için SEN virüs sıklığı ile ilgili bir çalışma bulunamadı. Çok sayıda kan ürünü alan diğer bir hasta grubu olan talasemi hastalarının, çalışılacak hasta grubu ile benzer özelliklere sahip olabileceği düşünülerek, bu çalışma referans alındı[13]. Number Cruncher Statistical Software (NCSS) Power Analysis Sample Size (PASS) programıyla %80 güç ve %5 yanılma düzeyi ile hasta grubu için 80, kontrol grubu için de ayrıca 80 olgunun alınması gerektiği hesaplandı.

3.1.7. Serum örneklerin alınması ve saklanması

Her haftanın son iş günü servisler dolaşarak çalışma kriterleri için uygun, daha önce çalışmaya alınmamış yeni ve eski tanıli hastalar çalışmaya dahil edildi. Hasta ve kontrol grubunda yer alan her olgudan bir kez ve yaklaşık 10 ml kadar kan örneği alındı. Serumun ayrılması için kan örnekleri 5.000 devir/dakikada, üç dakika santrifüj edildi. Tüpün üst kısmından toplanan serumlar çalışmanın gerçekleşeceği zamana kadar DNAaz ve RNAaz'dan arındırılmış steril eppendorf tüplerine konularak -20°C' de saklandı.

3.1.8. Hastaların gruplara ayrılması

Hasta grubunu kendi içersinde değerlendirmek için, hastalar arasındaki farklar göz önüne alınarak tekrar gruplandırılmalar yapıldı.

Dünya Sağlık Örgütü'nün hematolojik kanserli hastalar için önermiş olduğu sınıflama dikkate alınarak tanılara göre gruplama yapıldı. Hastalar lösemi, lenfoma ve myelom tanı başlıkları ile üç gruba ayrıldı. Lösemi grubuna akut myeloid lösemi, akut lenfositik lösemi, kronik lenfositik lösemi, kronik myeloid lösemi ve myelodisplastik sendrom hastaları alındı. Lenfoma grubuna Hodgkin dışı lenfoma, Burkitt lenfoma ve Hodgkin lenfoma hastaları alındı. Myelom grubuna da multiple myelom hastaları alındı.

Hastalar, ayrıca nötrofil sayılarına göre nötropenik olan ve nötropenik olmayanlar olarak ikiye ayrıldı. Çalışma için kan alımı sırasında nötrofil sayısı 500 hücre/mm^3 altında olanlar, nötropenik hasta olarak değerlendirildi.

Hastalar, son kan ürünü naklinden sonra geçen süreye göre de gruplandırıldı. Son 30 gün içinde kan ürünü almış olan olgular erken kan nakli yapılan grup olarak adlandırıldı. Son kan ürünü 30 günden önceki bir tarihte alanlar ise geç kan nakli yapılan gruba dahil edildi.

Hasta grubundaki olgular almış oldukları kan ürünü sayısına göre de gruplara ayrıldı. Kan ürünlerinin kaç farklı kişiden hazırlandığı dikkate alındı. Eritrosit süspansiyonu bir kişiden hazırlanırken, havuzlanmış trombositin beş ile altı kişiden hazırlanmış olduğu görüldü. Hastaların almış oldukları kan ürünleri sayılırken bu sayılar da dikkate alındı. Altı kişiden hazırlanmış havuzlanmış trombosit alan kişi, altı ayrı kişiden bulaş riski taşıdığı için altı kez kan nakli uygulanmış gibi değerlendirilip hesaplama yapıldı. Hasta grubuna hasta alımı tamamlandıktan sonra, en az kan ürünü alandan en çok kan ürünü alana doğru hastalar sıralandırıldı. Üç eşit gruba bölmek amacıyla ilk yirmi sekiz kişi ilk gruba alındı. Bir ile beş kişiden kan ürünü alanlar bu gruba dahil oldu. Sonraki yirmi sekiz kişi ikinci gruba alındı. Bu gruptaki kişiler altı ile otuz kişiden kan ürünü alan kişilerden oluştu. Son yirmi dört kişi ise otuz bir ve üzerinde kan ürünü alan kişiler dahil edildi ve üçüncü grubu oluşturdu.

Kontrol grubundaki hastalar, kan alımı sırasında hastanedeki yatış günlerine göre de iki gruba ayrıldı. Hastaneye yatışının ilk kırk sekiz saati içersinde çalışma için kan alınanlar erken kan alınan grubu oluşturdu. Kırk sekiz saat sonrasında çalışma için kan alınan grup ise geç kan alınan grup olarak değerlendirildi.

Kontrol ve hasta grubundaki olgulardan örnek alımı sırasında, KCFT değerleri de kaydedildi. KCFT değerleri yüksek ve normal olan olgular gruplara ayrıldı.

3.1.9. Etik kurul

Çalışmaya başlanmadan önce, DEÜTF girişimsel olmayan klinik araştırmalar değerlendirme komisyonuna etik kurul izni için başvuruldu. 26.5.2010 tarihinde 2010/02-09 karar numarası ile etik kurul izni alındı.

3.1.10. Aydınlatılmış onam

Kontrol ve hasta grubundaki her hasta çalışmaya alınmadan önce aydınlatılmış onam formu okutularak imzalatıldı.

3.1.11. Veri toplanması

Veriler “SPSS 16.0 for Windows” istatistik programına girildi. Hasta grubunun yaşı, cinsiyeti, tanısı, kan örneği alımı sırasındaki KCFT, almış olduğu kan ürün sayısı ve cinsi programa kayıt edildi. Kontrol grubundaki hastaların da yaşı, cinsiyeti ve kan örneği alımı sırasındaki KCFT değerleri programa kayıt edildi.

3.1.12. İstatistik

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

3.2. ARAÇ VE GEREÇLER

SENV'nin tüm genotiplerini tek bir seferde saptayabilecek, ortak olan bir primer bulunmadığından dolayı, SENV-D ve SENV-H genotiplerini saptamaya yönelik primerler kullanıldı. Bu primerlerin en az biri ile pozitiflik saptanan olgular, SENV ile enfekte kabul edildi. Her iki primer ile negatif bulunan olgular ise SENV ile enfekte kabul edilmedi. Çalışma kapsamında aşağıda türü, cinsi, markası yazılı olan araç ve gereçler kullanılmıştır.

- Nüve marka NF 815 santrifüj cihazı (1.000 rpm ve 4.000 rpm arası devir hızı)
- Gold Master marka olan derin dondurucu. Derece aralığı -20°C ile 40°C
- 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
- Roche marka viral nükleik asit izolasyon kiti:
 1. Bağlayıcı tampon: Guanidine-HCl, Tris-HCl, TritonX-100
 2. Poly A: RNA taşıyıcı Poly(A)
 3. Proteinaz K
 4. İnhibitör uzaklaştırıcı tampon: Guanidine-HCl, Tris-HCl
 5. Yıkama tamponu: NaCl, Tris-HCl
 6. Elüsyon tamponu: Nükleazdan arındırılmış, steril ve 2 kez damıtılmış su
 7. Filtreli tüpler
 8. Toplayıcı tüpler
- Roche marka Lightcycler PZR kiti:
 1. Enzim (Taq polimeraz)
 2. Kofaktör (Tris, KCl, MgCl₂, %0.01 jelatin, %0.01 NP04)
 3. Primerler:
 - a) SENV-H' nin sense (F1) primer dizilimi GGTTAACCKSAGCTGACTTCA
(K= G/T; S = G/C)
 - b) SENV-H' nin antisense (R1) primer dizilimi GGAAGGTGTAGCAAGGGTTGTC
 - c) SENV-D' nin sense (F1) primer dizilimi CCAGACTTRTGCAAAGTTCCTCTTG

(R = A/G)

d) SENV- D' nin antisense (R1) primer dizilimi GTGGTGAGCAGAACGGATGTT

4. İşaretleyici molekül (Prob):

a) SENV-H için floresan TaqMan® işaretleyici molekülü:

(5'-FAM TTTCCGTTCTGCTCACCACAAA3'TAMRA)

b) SENV-D için floresan TaqMan® işaretleyici molekülü:

(5'-FAM AACTTTGCGGTCAACTGCCGCTG3'TAMRA)

5. Nükleazdan arındırılmış, steril ve 2 kez damıtılmış su

- Mikro pipet Seti (Gilson- PİPETMAN- P 10-P100-F1000)
- Soğutmalı Mikro santrifüj (Hettich- Universal 32 R)
- Roche® marka Light cycler 480-2 PZR cihazı

3.3. YÖNTEM

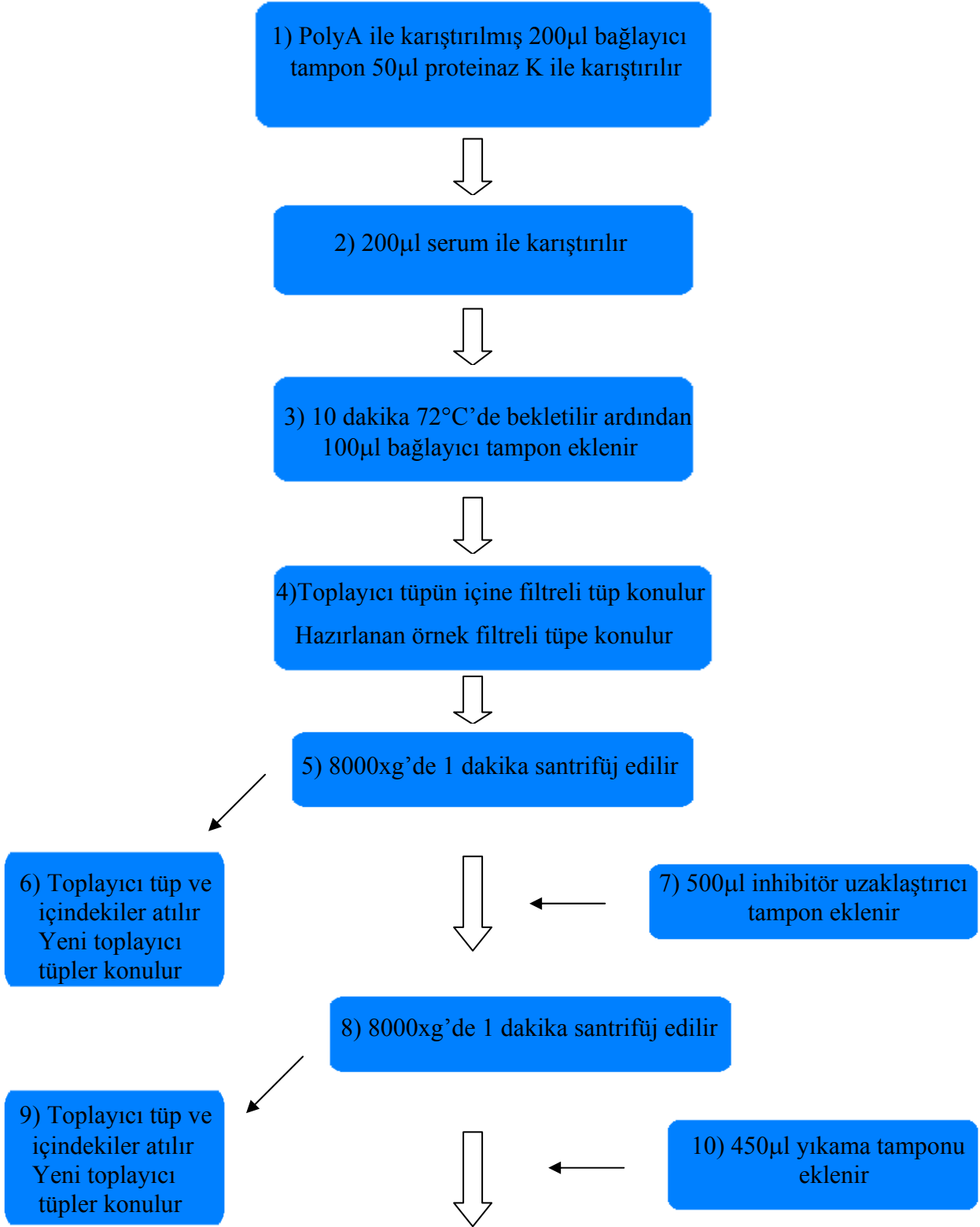
3.3.1.DNA ekstraksiyonu

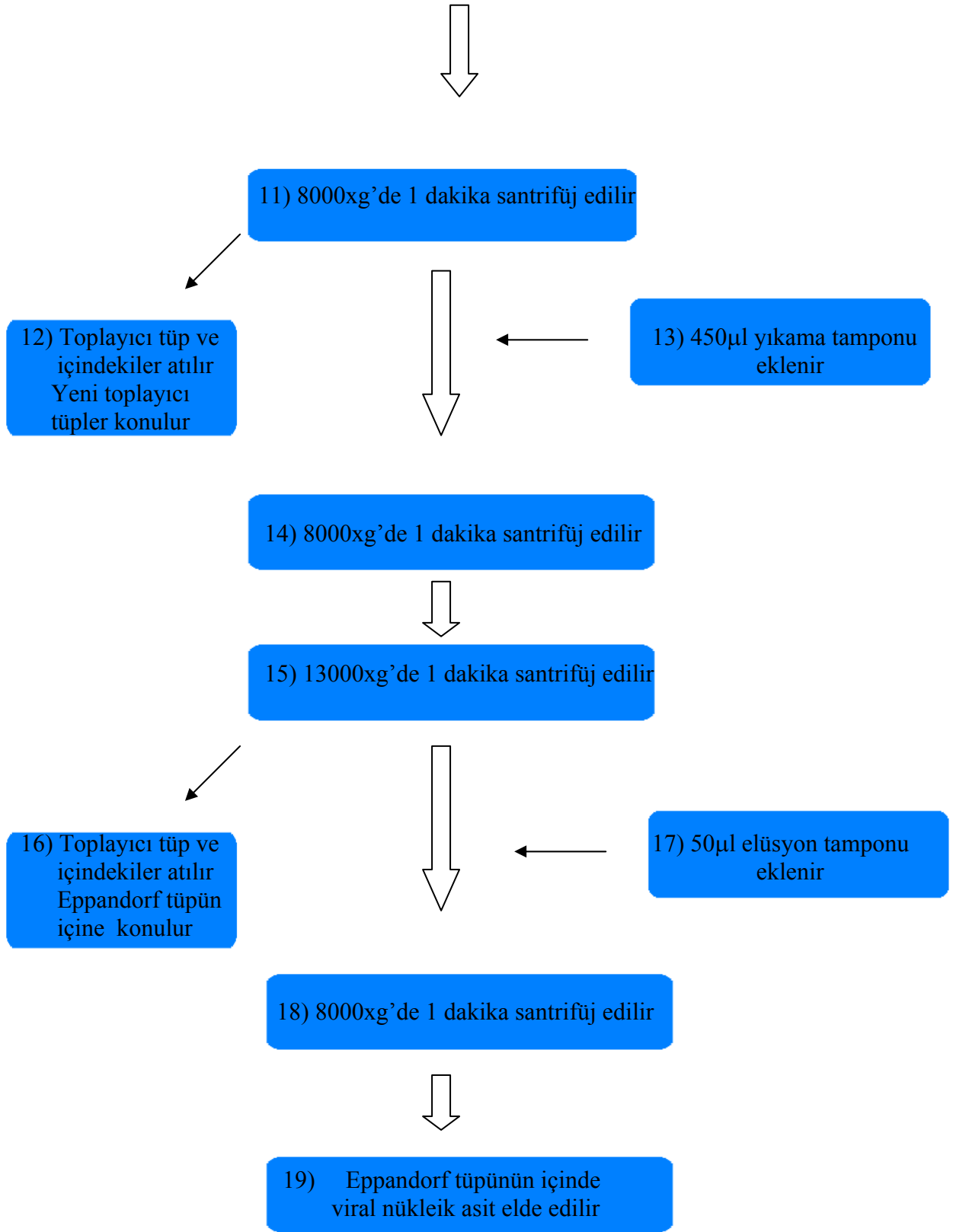
DNA ekstraksiyonu için spin kolon yöntemi uygulandı. Kılavuzda yazan kullanım kurallarına uyularak ekstraksiyon yapıldı. Ölçüm hatasını en aza indirmek için serum örnekleri on ikişerli gruplar halinde aşağıda belirtildiği şekilde çalışıldı;

- Çalışılacak olan hasta serumları -20°C'den çıkartılarak oda sıcaklığında eriyene dek bekletildi.
- 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 içersine 2500µl bağlayıcı tampon konuldu. Aynı eppendorf tüpün içine 50µl polyA konularak karıştırıldı.
- Hazırlanan karışım, her bir hasta için 200µl'ler şeklinde ayrı eppendorf tüplerine dağıtıldı. Bu tüplere 50µl proteinaz K konularak karıştırıldı.

- Hazırlanmış olan her bir karışımın içersine ayrı ayrı hastaların 200µl serumu pipet uçları değiştirilerek konuldu ve tekrar karıştırıldı. Kapakları kapatılarak etiketlendi.
- Karışımlar 72°C’de 10 dakika bekletildi.
- Ardından kapaklar açılarak her bir karışımın üzerine 100µl bağlayıcı tampon eklenerek karıştırıldı.
- Her bir örnek için toplayıcı tüpün içine geçecek şekilde filtreli tüpler yerleştirildi.
- Karışımlar her bir hasta için hazırlanmış olan filtreli tüplerin içersine pipetlenerek konuldu. Kapakları kapatılarak etiketlendi.
- 8000 xg’de bir dakika santrifüj edildi.
- Toplayıcı tüplerin içersinde biriken karışımlar toplayıcı tüpler ile birlikte atıldı.
- Filtreli tüpler hiçbir yere değdirilmeden yeni toplayıcı tüplerin içine konuldu.
- Filtreli tüplerin kapakları açılarak üzerlerine 500µl inhibitör uzaklaştırıcı tampon eklendi ve 8000 xg’de bir dakika santrifüj edildi.
- Toplayıcı tüplerin içersinde biriken karışımlar, toplayıcı tüpler ile birlikte atıldı.
- Filtreli tüpler herhangi bir yere konulmadan yeni toplayıcı tüplerin içinde konuldu.
- Filtreli tüplerin kapakları açılarak 450µl yıkama tamponu konuldu ve 8000 xg’de bir dakika santrifüj edildi.
- Toplayıcı tüplerin içersinde biriken karışımlar toplayıcı tüpler ile birlikte atıldı
- Yıkama işlemi bir kez daha tekrar edildi.
- Toplayıcı tüplerin içersinde biriken karışımlar toplayıcı tüpler ile birlikte atıldı.
- Filtreli tüpler herhangi bir yere değdirilmeden yeni toplayıcı tüplerin içersine konuldu.
- 13000 xg’de bir dakika santrifüj edildi.
- Toplayıcı tüpler atıldı ve filtreli tüpler eppendorf tüplerinin içine yerleştirildi.
- Eppendorf tüplerinin üstü ve kapakları etiketlendirildi.
- Filtreli tüplerin kapakları açılarak içlerine 50µl elüsyon tamponu konuldu.
- 8000 xg’de bir dakika santrifüj edildi.

- Filtreli tüpler atıldı. Eppendorf tüplerinin içersinde biriken örnekler polimeraz zincir reaksiyonu aşaması çalışılıncaya kadar -20°C 'ye konularak bekletildi.





Şema 1: Spin kolon yöntemi ile ekstraksiyon

3.3.2. İzolasyon sonrası DNA miktarının saptanması

İzolasyon işleminden sonra PZR için yeterli miktar ve saflıkta DNA varlığı, spektrofotometre ile 260 nanometrede araştırıldı.

3.3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Uygulaması

İşlem öncesi örnekler aşağıda belirtildiği şekilde hazırlandı.

- Enzim ve kofaktör -20°C'den çıkartılarak eritildi. Daha sonra hazır olarak bulunan 128µl' lik kofaktörün üzerine 10µl enzim konularak enzim karışımı hazırlandı.
- Primerler ve işaretleyici molekül 20 µM konsantrasyonunda olduğu için ve çalışmada primerler 5 µM, işaretleyici molekül ise 2 µM konsantrasyonunda olması istendiği için DNAaz ve RNAaz'dan arındırılmış, steril su ile seyreltilerek istenilen konsantrasyona getirildi.
- Her bir reaksiyon 20µl'lik bir hacimde gerçekleşeceği için aşağıdaki **Tablo 4**'de gösterildiği gibi hacim hesabı yapılarak her bir hasta için reaksiyon bileşenleri tablodaki sıra göz önüne alınarak ve pipetlerin ucu değiştirilerek hazırlandı.

Tablo 4: SENV-D ve SENV-H'nin PZR reaksiyon karışımları

	SENV-D	SENV-H
Reaksiyon Bileşenleri	Kullanılacak Miktar (µl)	Kullanılacak Miktar (µl)
Distile Su	5	5
Primer 1 (Forward) (5 µM)	2	2
Primer 2 (Reverse) (5µM)	5	5
İşaretleyici molekül (2 µM)	2	2
Enzim karışımı	4	4
DNA örneği	5	5
Toplam	20	20

PZR için hazırlanan örnekler Light cyclers 480-2 PZR cihazına yerleştirilerek **Tablo 5**'deki amplifikasyon basamakları sırasıyla izlenerek sonuçlar okundu.

Tablo 5: Uygulanan amplifikasyon sıcaklık ve süreler

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre (saniye)	Döngü Sayısı
Ön ısıtma (Başlangıç denatürasyonu)	94	600	1
Denatürasyon	94	10	45
Primer bağlanması (Annealing)	60	30	
Zincir uzaması (Elongasyon)	72	1	
Soğuma (Cooling)	40	30	1

4. BULGULAR

4.1. Hasta ve kontrol grubunun genel özellikleri

Çalışmaya hasta grubunda 80, kontrol grubunda 80 olmak üzere toplam 160 hasta dahil edildi. Hasta grubundaki 80 olgudan 35'inin (%44) kadın, kontrol grubunda ise 80 olgunun 39'unun (%49) kadın olduğu saptandı. Hasta grubundaki olguların yaşlarının 18 ile 84 arasında değiştiği ve yaş ortalamasının ise 49 olduğu saptandı. Kontrol grubundaki olguların yaşlarının 18 ile 85 arasında yer aldığı ve yaş ortalamasının 51 olduğu hesaplandı. Buna göre her iki gruptaki hastaların gerek yaşları (ki kare=53,1, p=0,584) ve gerek cinsiyet dağılımı (ki kare= 0,402, p=0,526) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı.

Hasta grubunda yer alan olguların tanıları **Tablo 6**'da gösterilmiştir.

Tablo 6: Hasta grubundaki olgu tanılarının dağılımı

	Sayı	Yüzde (%)
Akut myeloid lösemi	30	37,5
Hodgkin dışı lenfoma	16	20
Akut lenfositik lösemi	10	12,5
Multiple myelom	9	11,2
Hodgkin lenfoma	6	7,5
Burkitt lenfoma	4	5
Myelo Displastik Sendrom	2	2,5
Kronik lenfositik lösemi	2	2,5
Kronik myeloid lösemi	1	1,3
Toplam	80	100

Kontrol grubunda yer alan hastaların ise idrar yolu enfeksiyonu, yumuşak doku enfeksiyonu, santral sinir sistemi enfeksiyonu vb. çeşitli tanıları bulunmaktaydı.

4.1.1. Hasta ve kontrol grubundaki SENV sıklığı

Hasta grubunda yer alan toplam 30 (%37,5) hastanın en az bir genotip ile enfekte olduğu saptandı. On beş (%18,8) hastada SENV-D genotipi, 24 (%30) hastada ise SENV-H genotipi pozitif olarak saptanırken, bu hastaların dokuzunda (%11,2) SENV-D ve SENV-H genotipi birlikte pozitif olarak saptandı.

Kontrol grubunda ise SENV 40 (%50) hastada olumlu olarak saptandı. SENV-D genotipi 13 (%16,3) hastada olumlu olarak bulunurken, SENV-H genotipi ise 34 (%42,5) hastada pozitif olarak saptandı. Yedi (%8,8) hastada ise her iki genotip birlikte pozitif olarak bulundu.

Tablo 7'de hasta ve kontrol grubundaki SENV ve alt genotiplerinin sıklığı gösterilmiştir.

Tablo 7: Hasta ve kontrol grubunda SENV ve alt genotiplerinin sıklığı

	SENV (+)		SENV-D (+)		SENV-H (+)	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Hasta grubu (n=80)	30	37.5	15	18.8	24	30.0
Kontrol grubu (n=80)	40	50.0	13	16.3	34	42.5
p değeri	P= 0.111		p= 0.677		p= 0.100	

Her iki grup arasında anlamlı bir fark saptanmadı (ki kare=2,540, p=0,111). SENV-D (ki kare=0,173, p=0,677) ve SENV-H (ki kare=2,535, p=0,1) için de her iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmadı.

4.1.2. Hasta ve kontrol grubunun hepatit açısından değerlendirilmesi

Hasta grubunda SENV enfeksiyonu bulunan 30 olgunun ikisinde KCFT yüksekliği saptandı. Olguların ikisinde iki kat KCFT yüksekliği vardı. Kontrol grubundaki SENV ile enfekte 40 olgudan ikisinde KCFT yüksekliği saptandı. Olguların birinde üç kat, diğerinde ise 10 kat KCFT yüksekliği vardı. SENV ile enfekte bulunmayan hasta grubunda üç olguda KCFT yüksekliği vardı. Olguların ikisinde iki kat, birinde ise 10 kat yükseklik vardı. SENV enfeksiyonu olmayan kontrol grubunda ise üç olguda iki kat KCFT yüksekliği vardı. KCFT yüksekliği olan olgu sayısının az olması nedeniyle, bu konu ile ilgili olarak karşılaştırma yapılamadı.

4.2. Hasta grubunun kendi içerisinde değerlendirilmesi

4.2.1. Hastaların tanılara göre değerlendirilmesi

Lösemi grubunda 45, lenfoma grubunda 26 ve myelom grubunda dokuz olgu gruplandırıldı. Myelom grubundaki olgu sayısının, diğer gruplar ile karşılaştırma yapmak için yeterli hasta içermediği görüldü. Lenfoma grubunda 15 (%57,7) olguda SENV enfeksiyonu

saptanırken, lösemi grubunda ise 10 (%22,2) olguda SENV saptandı. Her iki grup arasındaki fark ise anlamlıydı (ki kare =9,088, p=0,003). SENV-D, lösemi grubunda altı (%23,1) hastada, lenfoma grubunda altı (%13,3) olguda pozitif olarak saptandı. Gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı (ki kare=1,114, p=0,291). Lenfoma grubunda SENV-H 12 (%46,2) olguda saptanırken, lösemi grubunda ise yedi (%15,6) olguda saptandı. İki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu. (ki kare=7,872, p=0,005). Bulgular **Tablo 8**'de gösterilmiştir.

Tablo 8. Lenfoma ve lösemi olgularında SENV sıklığının karşılaştırılması

	SENV (+)		SENV-D (+)		SENV-H (+)	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Lenfoma (n=26)	15	57.7	6	23.1	12	46.2
Lösemi (n=45)	10	22.2	6	13.3	7	15.6
p değeri	p=0.003		p=0.291		p=0.005	

4.2.2. Hastaların beyaz küre sayısına göre değerlendirilmesi

Örnek alımı sırasında 38 olgu nötropenik idi. Bu olguların 11'inde (%28,9) SENV saptandı. Nötropenisi olmayan 42 olgusunun 19 (%45,2) olgusu SENV ile enfekte olduğu görüldü. İki grup arasında anlamlı bir fark bulunmadı (ki kare= 2,259 p=0,133). Nötropenik hastalarda SENV-D genotipi yedi (%18,4) olguda saptanırken, nötropenik olmayan hasta grubunda ise sekiz (%19) olguda pozitif olarak saptandı. SENV-D sıklığı açısından iki grup arasında anlamlı fark bulunamadı (ki kare=0.005, p=0.943). Nötropenik hasta grubunda SENV-H genotipi ise yedi (%18,4) olguda saptanırken, nötropenik olmayan olgu grubunda ise 17 (%40,5) olguda pozitif olarak bulundu. Her iki grup arasındaki fark ise anlamlı olarak bulundu (ki kare= 4,621, p=0,032). **Tablo 9**'da olguların beyaz küre sayısına göre değerlendirilmesi özet olarak verilmiştir.

Tablo: 9 Olguların beyaz küre sayılarına göre değerlendirilmesi

	SENV (+)		SENV-D (+)		SENV-H (+)	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Nötropenik olan (n=38)	11	28.9	7	18.4	7	18.4
Nötropenik olmayan (n=42)	19	45.2	8	19.0	17	40.5
p değeri	p=0.133		p=0.943		p=0.032	

4.2.3. Olguların kan nakli süresine göre değerlendirilmesi

Erken kan nakli alan grup 54 olgudan, geç kan nakli alan grup ise 26 olgudan oluşmaktaydı. Erken kan nakli alan grupta 14 (%25,9) olguda SENV pozitifliği saptanırken, geç kan nakli alan grupta ise 16 (%61,5) olguda saptandı. Her iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı idi (ki kare=9,497, p=0,002). SENV-D erken kan nakli alan grupta sekiz (%14,8) olguda, geç kan nakli alan grupta ise yedi (%26,9) olguda saptanırken iki grup arasında anlamlı fark saptanmadı (ki kare=1,689, p=0,194). SENV-H genotipi ise erken kan nakli almış olan grupta 11 (%20,4) hastada, geç kan nakli almış olan grupta ise 13 (%50) olguda saptandı. Her iki grup arasındaki fark anlamlı bulundu (ki kare=7,337, p=0,007). Sonuçlar **Tablo 10**'da gösterildi.

Tablo 10. Kan nakli süresine göre SENV sıklığının değerlendirilmesi

	SENV (+)		SENV-D (+)		SENV-H (+)	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Erken kan nakli (n=54)	14	25.9	8	14.8	11	20.4
Geç kan nakli (n=26)	16	61.5	7	26.9	13	50.0
p değeri	p=0.002		p=0.194		p=0.007	

4.2.4. Olguların kan ürünü sayısına göre değerlendirilmesi

Bir ile beş kan nakli yapılmış 28 olgudan oluşan ilk grup, altı ile 30 arası kan nakli yapılmış 28 olgudan oluşan ikinci grup, 31 ve üzeri kan nakli yapılmış 24 olgudan oluşan üçüncü grup, SENV sıklığı açısından birbirleri ile karşılaştırıldı. İlk grupta SENV 13 (%46,4) olguda, ikinci grupta 11 (%39,3) olguda ve üçüncü grupta altı (%25) olguda saptandı. Gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı (ki kare=2,590, p=0,274). SENV-D ise ilk grupta dört (%14,3) olguda, ikinci grupta yedi (%25) olguda ve üçüncü grupta ise dört (%16,7) olguda pozitif olarak bulundu. Gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı (ki kare=1,153, p=0,562). SENV-H ilk grupta on iki (%42,9) olguda, ikinci grupta sekiz (%28,8) olguda ve üçüncü grupta ise dört (%16,7) olguda saptandı. Gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı (ki kare=4,263, p=0,119). **Tablo 11**'de bulgular gösterilmiştir.

Tablo 11: Olgularda kan nakil sayısına göre SENV sıklığının değerlendirilmesi

	SENV (+)		SENV-D (+)		SENV-H (+)	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
1 - 5 kişiden nakil (n=28)	13	46.4	4	14.3	12	42.9
6 -30 kişiden nakil (n=28)	11	39.3	7	25.0	8	28.6
31 ve üzeri kişiden nakil (n=24)	6	25.0	4	16.7	4	16.7
p değeri	p=0.274		p=0.562		p=0.007	

4.3. Kontrol grubunun değerlendirilmesi

Erken kan alınan grup 44 olgudan, geç kan alınan grup ise 36 olgudan oluştu. Erken kan alınan grupta 21 (%47,7) olguda SENV saptanırken geç kan alınan grupta ise 19 (%52,8) olguda pozitif olarak saptandı. İki grup arasında anlamlı bir fark bulunmadı (ki kare=0,202,

p=0,653). SENV-D genotipi erken kan alınan grupta sekiz (%18,2), geç kan alınan grupta ise beş (%13,9) olguda saptandı. İki grup arasında anlamlı bir fark saptanmadı (ki kare=0,268, p=0,605). Erken kan alınan grupta ise SENV-H 19 (%43,2), geç kan alınan grupta 15 (%41,7) olguda saptanırken iki grup arasında anlamlı bir fark saptanmadı (ki kare=0,19, p=0,892). **Tablo 12**'de bulgular özetlenmiştir.

Tablo 12. Kontrol grubunda kan alım zamanına göre SENV sıklığı

	SENV (+)		SENV-D (+)		SENV-H (+)	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Erken kan alınan (n=44)	21	47.7	8	18.2	19	43.2
Geç kan alınan (n=36)	19	52.8	5	13.9	15	41.7
p değeri	p=0.653		p=0.605		p=0.892	

5. TARTISMA

5.1. Hasta grubunun diğer çalışmalarla karşılaştırılması

SENV'nin kan nakli ile geçtiği, Umemura ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışma ile kanıtlanmıştır.⁵ Kan nakli öncesi SENV viremisi olmayan hastalarda viremi saptanması üzerine, donörlerin vermiş oldukları kanlar taranmış ve aynı DNA dizilimine sahip SENV hem donör, hem de alıcıda saptanmıştır. Operasyon öncesi ve sonrasında incelenen bu hastalarda, artan kan nakli sayısı ile birlikte SENV riskinin de artmış olduğu gösterilmiştir.

Pubmed veri tabanı ile yapılan taramada, SENV enfeksiyonu ve hematolojik kanserli hastalar ile ilgili yapılmış olan çalışmaya rastlanmadığı için diğer çalışmalarla karşılaştırma şansı bulunamadı. Fakat, hematolojik kanserli hastalar gibi sık kan nakli alan bir hasta grubu

olan talasemi hastaları ile karşılaştırmanın yararlı olabileceği düşünüldü. Pubmed veri tabanında yapmış olduğumuz araştırmada konu ile ilgili yapılmış iki çalışmaya ulaşıldı. Chiou ve arkadaşları 2006 yılında pediatrik talasemi hastaları ile yaptıkları çalışmada SENV-D genotipini %52,7, SENV-H genotipini ise %40 sıklıkta bulmuş olduklarını bildirmişlerdir.¹⁴ Karimi ve arkadaşlarının İran'da talasemi hastaları ile yaptıkları çalışmada SENV-D sıklığını %86, SENV-H sıklığını %93 olarak bulduklarını bildirmişlerdir.¹⁷ Bu çalışmada dikkat çekici bir bulgu da, hasta grubunda SENV sıklığı %98 iken kontrol grubunda aynı oranın %90 olmasıdır.

Yapmış olduğumuz çalışmada SENV sıklığı, her iki çalışmaya göre daha düşük oranda saptanmıştır. Chiou ve arkadaşlarının yaptığı çalışma pediatrik hastalardan oluşmaktadır.¹⁴ Yaşamlarında etkenle karşılaşma süreleri daha kısa olmasına karşın, çalışmamıza göre daha yüksek oranda SENV viremisi saptanmış olduğu görüldü.

Çalışmamızdaki hasta grubumuzun talasemi hastalarından farkları bulunmaktaydı. Farklı coğrafi bölgelerde olmaları, kanser hastası olmaları, kemoterapi almaları ve hastanede daha uzun süre yatıyor olmaları başlıca farklılıklardı.

Chiou ve arkadaşlarının Japonya'da yaptıkları çalışmada kontrol grubunda SENV sıklığı %22,4, Karimi ve arkadaşlarının İran'da yapmış olduğu çalışmada ise kontrol grubunda %90 sıklık saptanmıştır.^{14, 17} Çalışmamızda, kontrol grubunda SENV sıklığı %50 olarak bulunmuştur. Bu oranın, sıklığın iki grup değerleri arasında yer aldığı görülmüştür. Her iki çalışmaya göre, hasta grubumuzda düşük oranda saptanmış olduğumuz SENV sıklığının coğrafi bölge farkına bağlı olduğunu düşünmemekteyiz.

Kemoterapi almaları ve kanser hastaları olmaları nedeniyle bu hasta grubu immünsüpresif olarak değerlendirilmektedir. İmmünsüpresif olmaları nedeniyle hastalarımızda SENV viremisinin daha uzun süre seyretmesi, dolayısıyla daha sık saptanması beklenebilir. Bu hasta grubu ile yapılmış olan üç çalışmaya ulaştık.

Bu çalışmalardan biri olan Sağır ve arkadaşlarının HIV pozitif hastalar ile yaptıkları çalışmada, SENV sıklığı %15,4 olarak bulunmuş ve kontrol grubu ile arasında fark saptanmamıştır.⁴³ HIV pozitif hastalar kendi içinde değerlendirildikleri zaman CD4 sayısı düşük olanlarda, HIV RNA pozitifliği olanlarda ve HAART (yüksek etkinlikli antiretroviral tedavi) tedavisi almayan hastalarda SENV sıklığının daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Mevcut bulguların immünite ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir. Sağır ve arkadaşlarının

yapmış oldukları bir başka çalışmada ise HIV pozitif hastalarda SENV-H genotipini sağlıklı erişkinlere göre daha sık saptamışlardır.⁶¹

SENV'nin karaciğer kanseri etiolojisindeki yerini incelemek amacıyla yapılmış olan bir çalışmada, hastaların eş zamanlı olarak hepatit B veya hepatit C hastaları olmaları nedeni ile değerlendirme yapılamamıştır. Ancak karaciğer kanseri olan hastaların kontrol grubuna göre SENV viremisinin daha sık olduğu gösterilmiştir.¹⁶

Yapılan çalışmalar immünsüpresyon durumunda SENV viremisinin arttığını göstermektedir. Yapmış olduğumuz çalışmada sık kan ürünü alan ve immünsüpresyonu bulunan hasta grubunu incelememize rağmen, kontrol grubuna göre SENV viremi sıklığını daha az oranda saptadık. Çalışma başlangıcında ön görülen duruma göre hasta grubunda daha az sayıda SENV viremisi saptanması dolayısıyla, hasta grubunun alt grup analizlerinde anlamlı bir fark olup olmadığı üzerinde yoğunlaşıldı. Nötropenik olmayan hastalarda SENV sıklığı rakamsal olarak daha yüksek çıkmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark çıkmadı. Nötropenik olmayan hasta grubunda ise SENV-H genotipinde hem rakamsal, hem de istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı. Nötropenik olan hastalarda immünsüpresyon daha fazla iken, vireminin, nötropenik olmayan hastalarda daha sık görülmesi virus replikasyonunun karaciğer dışında kemik iliğinde de yapılabiliyor olabileceğini düşündürmüştür. Ayrıca, virüsün kan dolaşımında beyaz küreler aracılığı ile taşınabiliyor olmasının da bir başka olasılık olduğu düşünülmüştür.

Hepatit ilişkili aplastik anemi tanımı 1955 yılında Lorenz ve Quaiser tarafından yapılmıştır.⁶² Hepatit sonrasında pansitopeni gelişmektedir. Avrupa'da her yıl milyonda iki kişide hastalık gözlenmektedir.⁶³ Bu durum kemik iliği nakli ve immünsüpresyonu olan hastalarda daha sık görülmektedir ve olguların %80'inde etiyoloji saptanamamaktadır. Virüsler, toksinler ve otoimmün mekanizmalar etiyojiden sorumlu tutulmuştur. Hepatit A,B,C,D,E,G virüsleri ile oluşan olgular bildirilmiştir.⁶⁴ Ayrıca TTV ve SENV ile ilişkili olan vakalar da mevcuttur.⁴² Vakaların çoğunun daha çok genç erkeklerde gözlendiği belirtilmiştir. Aplastik aneminin gelişmesinden interlökinlerin ve T lenfositlerin sorumlu olabileceği düşünülmektedir. Umemura ve arkadaşlarının etiyojisi bilinmeyen hepatitleri SENV sıklığı açısından inceledikleri çalışmada, 26 hepatit ilişkili aplastik anemili hastada SENV sıklığını %35 oranında saptamışlardır.⁴² Ancak, incelemeye aldıkları hastaların nötropenik olup olmadıkları çalışmada belirtilmemiştir. Hastaların kemik iliklerinin SENV açısından incelenmesinin veya geliştirilebilecek bir serolojik yöntemle test edilmesinin saptanma

oranını arttırabileceğini düşünmekteyiz. Çalışmamızda SENV'nin beyaz küre sayısı ile ilişkisinin saptanması, SENV'nin immünsüpresyonlu hastalarda daha sık görülmesi, SENV'nin hepatit yapabilmesi ve hepatit ilişkili aplastik anemili hastalarda %80 etiyojinin aydınlatılamaması nedeni ile hepatit ilişkili aplastik anemili hasta grubunun, bu açıdan incelenmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda, lenfoma hastalarında %57,7, lösemi hastalarında ise %22,5 oranında viremi saptanmıştır. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Lösemi hastaları klinik seyrin ve aldıkları kemoterapinin ağırlığı nedeni ile daha sık nötropeniye girmektedirler. İki grup arasındaki farkın bundan kaynaklandığı öne sürülebilir. Lenfoma grubunda bulunan hastalardan sadece beş tanesinin nötropenik olması, iki grup arasında farklı sonuçların çıkmasına neden olmuş olabilir.

Nötropenik olmayan hastalarda viremi, kontrol grubuna yakın olarak %45,2 oranında bulunmuştur. Hematolojik kanserli hastalara kan verilmeden önce kanların ışınlanması ve lökosit filtrelerinden geçirilmesi, kan ürünü içerisindeki beyaz kürelerin tamamına yakın bir kısmını yok etmektedir. Kan ürünlerindeki beyaz kürelerin azalması SENV bulaşmasını engelleyici bir durum oluşturmuş olabilir.

Umemura ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada inkübasyon ve viremi süresi ile ilgili bilgiler saptanmıştır.⁵ Vireminin, PZR ile, kan naklinden dört hafta sonra saptanabildiği belirtilmiştir. Vireminin hastaların yarısında altı ay devam ettiği bulunmuş, %65'inde iki yıl, %74'ünde ise beş yıl devam ettiği bulunmuştur. On iki yıldan daha uzun süren viremlerin olduğu da belirtilmiştir. Yapmış olduğumuz çalışmada 30 gün içinde kan nakli alanlarla, 30 günden daha önceki tarihlerde kan nakli almış olan hastalar iki gruba ayrıldı. Otuz gün içerisinde kan nakli almış olan grupta SENV viremi sıklığı diğer gruba göre daha az bulunmuştur. Vireminin saptanmasının 30 günden sonra mümkün olduğunu gösteren çalışmayla uyumlu veriler elde edilmiş oldu.⁵ Fakat, 30 gün içinde kan nakli almış olan grupta daha önceden de kan nakli alan hastaların bulunuyor olması nedeniyle değerlendirmenin sağlıklı sonuçlar vermeyeceği düşünüldü.

Umemura ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada alınan kan nakli sayısı ile SENV'nin bulaş olasılığının arttığı gösterilmiştir.⁵ Biz de, olgularımızı aldıkları kan ürünü sayısına göre üç gruba ayırdık. Bizim çalışmamızda önceki çalışmanın aksine az sayıda kan nakli alan kişilerde SENV viremisi daha az oranda saptandı. İstatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. SENV-H genotipi, az sayıda kan nakli almış olan grupta yüksek oranda saptandı

ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Umemura ve arkadaşlarının çalışmasında hastalar operasyon sonrasında kısa bir zaman dilimi içerisinde kan ürünü almışlar ve çalışmaya dahil edilmişlerdir. Halbuki, bizim yapmış olduğumuz çalışmada ise hastalar kan ürünü transfüzyonunu yıllar içinde ve farklı zamanlarda almışlardır. Çok sayıda kan nakli almış olan hastalar çoğunlukla uzun zamandan beri takip edilen olgularken, az sayıda kan nakli yapılmış olan olgular ise yeni tanı almış olan grubu oluşturmaktaydı. Çok sayıda kan nakli alan hasta grubunda, daha az oranda vireminin saptanmasının nedeninin zaman içinde gelişen immünitinin olabileceğini düşünmekteyiz. Bu ve benzeri soruların yanıtlanabilmesi için geliştirilecek serolojik yöntemlere gereksinim vardır.

5.2. Kontrol grubunun diğer çalışmalarla karşılaştırılması

Sağlıklı bireylerde yapılan çalışmalarda, SENV sıklığı değişik oranlarda gözlemlenmiştir. Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan çalışmalarda sıklık %1 ile %2 arasında, Avrupa ülkelerinde yapılan çalışmalarda %1 ile %16 arasında, Asya ve Afrika ülkelerinde ise oranların %5 ile %45 arasında değiştiği bildirilmiştir. Mevcut bulgular coğrafi bölgenin de SENV sıklığı için önemli bir faktör olduğunu göstermektedir.¹⁹

Kıtalarda yapılan çalışmalar genel olarak değerlendirildiğinde yukarıda bahsedilen dağılım oluşmaktadır. Fakat ülkeler bazında yapılan çalışmalara bakıldığında zaman farklı sonuçlar görülmektedir.

Tayvan'daki sağlıklı donörlerinde SENV sıklığı, Kao ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada %15¹², Dai ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada %24,2⁶⁵, Huang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise %51⁸ olarak tespit edilmiştir.

Japonya'da, sağlıklı kan donörleri üzerinde yapılan çalışmalarda ise SENV sıklığı, Shibata ve arkadaşları tarafından %10⁴⁷, Umemura ve arkadaşları tarafından %20⁵, Suigura ve arkadaşları tarafından %27⁶⁶ olarak saptandığı bildirilmiştir.

Pubmed ile yaptığımız taramada, ülkemizde sağlıklı kan donörleri üzerinde yapılan üç çalışma bulunmuştur. Tezcan ve arkadaşlarının Mersin'de, sağlıklı kan donörleri üzerinde yaptıkları çalışmada SENV-D sıklığını %5, SENV-H sıklığını ise %20 olarak bildirmişlerdir.¹¹ Serin ve arkadaşlarının Mersin'de yaptıkları diğer bir çalışmada, SENV-D %4, SENV-H ise %6 sıklıkta saptanmıştır.¹⁰ Çakaloğlu ve arkadaşlarının gene aynı grupta, İstanbul'da yapmış oldukları çalışmada SENV sıklığı %16,2 olarak bulunmuştur.⁶⁷ Bizim yapmış olduğumuz

çalışmada kontrol grubunda yer alan olgularda SENV-D sıklığı %16,3 ve SENV-H sıklığı ise %42,5 olarak bulunmuştur. Diğer çalışmalar ile karşılaştırıldığı zaman yüksek oranda SENV viremi saptanmasının nedenlerinden biri, daha güvenilir bir yöntem olan eş zamanlı PZR kullanmamız olduğunu düşünmekteyiz. Ülkemizde yapılan diğer çalışmalarda sonuçlar jel elektroforezi ile değerlendirilmiştir. Ayrıca, farklı primerlerin kullanılmış olması da bir diğer neden olabilir. Çalışmamızda, diğer çalışmalardan farklı primerler kullanılmıştır. Değerlendirilen topluluğa göre primerlerin duyarlılıkları değişmektedir. Almanya'da sağlıklı kan donörleri üzerinde yapılan, çalışmamızla aynı yöntem ve primerlerin kullanıldığı bir çalışmada SENV sıklığı %10 olarak bulunmuştur.⁶¹ Grupların birkaç farklı primer ile değerlendirilmesiyle, daha yüksek oranlarda SENV vireminin saptanabileceği düşünülebilir. Yoshida ve arkadaşları, Japonya'da SENV'nin tespitinde başka primerlerin kullanıldığı bir çalışmada sağlıklı erişkinlerde oranın yaklaşık %75'e çıktığını bildirmişlerdir.⁶⁸

Ülkemizde yapılan çalışmalardan farklı olarak kontrol grubunu hastanede yatan kişilerden seçmiş olmamız daha yüksek oranda viremi saptama nedenlerimizden bir tanesi olabilir. İtalya'da Pirovano ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, hastanenin farklı iki ünitesinde bulunan 171 hemodiyaliz hastasında SENV sıklığı araştırılmıştır.⁶⁹ Ünitelerden birinde %37 sıklıkta, diğerinde ise %55 sıklıkta SENV viremi saptanmış ve aynı ünitenin hastalarında SENV dizilerinin yüksek derecede benzer homolojide olduğu bildirilmiştir. Farklı iki üniteden, farklı iki DNA homolojisine sahip SENV saptanması ortak hemodiyaliz cihazı kullanımı ile açıklanmıştır. Çalışmamızdaki kontrol grubundaki kişiler kan ürünü almamış ve diyaliz tedavisine de girmeyen hastalardan oluşmaktaydı. Diyaliz tedavisi almamış olsalar da, Pirovano ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmaya benzer şekilde hastane kökenli bir enfeksiyon sonucu yüksek SENV saptamış olabileceğimiz düşünüldü. Bundan hareketle, kan alınan zamanki yatış sürelerine göre grubumuzu ikiye ayırdık. Yatışının ilk 48 saati içinde kan verenler ile 48 saat sonrasında kan alınanlar arasında bir fark bulunmadı. Ancak virüsün temastan bir ay sonra saptanabiliyor olması nedeniyle değerlendirmenin gerçekleri tam olarak yansıtmayabileceği düşünüldü. Hastaların, hastaneye yatmadan önce ve en az bir ay sonra SENV açısından değerlendirilmesinin hastane kökenli bir bulaşın varlığının ortaya konması açısından daha değerli olabileceği düşünülebilir.

SENV'nin kanıtlanmış bulaş yollarından birinin kan nakli olduğu bilinmektedir ancak, kontrol gruplarında yer alan ve yaşamlarının hiçbir kesitinde kan ürünü almamış kişilerde de SENV saptanması virüsün kan nakli dışında başka bir yol ile de bulaşabildiğini

düşündürmektedir. Aynı virüs ailesinde yer alan TTV'nin dışkıda saptandığını gösteren çalışmalar mevcuttur.⁷⁰

Umemura ve arkadaşlarının Japonya'da yapmış oldukları başka bir çalışmada hepatit C'nin endemik ve endemik olmayan iki bölgesi değerlendirilmiştir.⁷¹ Çeşitli karaciğer hastalığı tanıları ile tetkik edilen olgular çalışmaya alınmıştır. Her iki bölgede de eşit sıklıkta SENV saptanması ve her yaş aralığında benzer oranlar bulunması, bulaşta başka yolların etkin olduğunu düşündürmüştür. Diğer geçiş yollarının da SENV bulaşı açısından incelendiği çalışmalara gereksinim olduğunu düşünmekteyiz.

Bugünkü yaygın görüş SENV kökenli bir enfeksiyon hastalığının varlığını ileri sürmeye devam etmektedir ancak patojenitesi henüz kanıtlanamamıştır. Sağlıklı kan donörlerinde vireminin yüksek oranda saptanmasına rağmen herhangi bir klinik belirti ve laboratuvar bulgusuna yol açmaması, patojenitesi konusunda kuşku duyulmasına neden olmaktadır. Bazı yazarlar tarafından, normal bir flora üyesi olarak bulunan bakteriler gibi organizmada zararsız olarak bulunduğu ileri sürülmektedir ve bu organizmaların sadece birer fırsatçı patojen gibi davranarak, edinsel immün yetmezlik gibi vb. özel durumlar çevrelerinde patojenik olabilecekleri belirtilmiştir.^{7, 71}

5.3. Hasta ve kontrol grubunun karşılaştırılması

Kontrol grubunda SENV sıklığı hasta grubundan daha yüksek olarak saptandı. Fakat aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Bu durumun hasta grubunda bulunan nötropenik hastalardaki SENV sıklığının az olmasından kaynaklandığı düşünüldü.

Lenfoma tanısı olan hastalarda SENV sıklığı %57,7, lösemi hastalarında ise %22,2 olarak saptanmıştır. Lenfoma grubundaki sıklığın kontrol grubuna göre daha yüksek olarak bulunması nötropenisi olan hastaların daha az olmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Daha önce kan nakil öyküsü olmayan kontrol grubundaki hastalarda daha yüksek oranda SENV saptanması, kan nakli dışında da bulaş yollarının olduğunu düşündürmüştür.

6. SONUCLAR VE ÖNERİLER

SENV'nin akut hepatit yaptığını gösteren çalışmalar olmakla birlikte sağlıklı kan donörlerinde de sıklıkla saptanması patojenitesi konusunda kuşkuların doğmasına neden olmuştur. Bu virusun normal bir flora üyesi gibi insanlarda bulunduğunu düşünen yazarlar bulunmaktadır. Biz de, virüsün patojenitesinin, konağın immün durumuna, virüsün genetik yapısına ve virülansına göre değişim gösterebileceğini düşünmekteyiz.

Kan teması olmayan bireylerde de yüksek oranlarda SENV saptanıyor olması virüsün başka bulaş yollarının da olduğunu göstermektedir. Bu konu ile ilgili çalışmalara ihtiyaç vardır.

Çalışmamızda az sayıda kan nakli alan hastalarımızda SENV viremisinin daha sık bulunmasının immunité ile ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz. Bu konunun aydınlatılabilmesi için serolojik testlerin geliştirilmesi gerekmektedir.

Yapmış olduğumuz çalışmada, nötropenik hastalarda daha düşük oranda SENV viremisi saptadık. Önceki çalışmalarda immünsüpresif hastalarda ve sık kan nakli alan hastalarda SENV'nin sık saptandığının gösterilmiş olması, SENV'nin karaciğer dışında kemik iliğinde de replike olabileceğini ve beyaz küreler ile taşıyor olabileceğini gösterdi. Ayrıca kan ürünlerinin büyük bir kısmının ışınlanıyor ve lökosit filtresinden geçiriliyor olması beyaz kürelerin parçalanmasına ve SENV'nin geçişinin azalmasına neden olmuş olabilir. Ender olarak görülen hepatit ilişkili aplastik anemi hastalığının etiolojisinin aydınlatılamamış olması ve çalışmamızda SENV ile beyaz küre sayısının bir ilişkinin gözlenmesi nedeni ile hastalığın SENV açısından da değerlendirilmesi gerekmektedir. Diğer hepatit virüslerinin de etiolojiden sorumlu tutulması hepatositlerde ve kemik iliğindeki hücrelerde ortak bir reseptörün varlığı virüslerin bu hastalıktaki rolünü açıklayabilir.

Ülkemizde yapılan diğer çalışmalara göre daha yüksek oranda SENV viremisi saptamamızın nedenlerinin kullandığımız primerlerden ve yöntemden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Bu çalışmanın yukarıda sözü geçen konulara bir ışık tutacağını ön görmekteyiz.

7. KAYNAKLAR

1. Escorsell A, Mas A , de la Mata M. Acute liver failure in Spain: analysis of 267 cases. *Liver Transpl* 2007;13:1389-95.
2. Kodali VP, Gordon SC, Silverman AL , McCray DG. 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.
3. Linnen J, Wages J, Jr., Zhang-Keck ZY, Fry KE, Krawczynski KZ, Alter H et al. Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: a transfusion-transmissible agent. *Science* 1996;271:505-8.
4. Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, Yoshizawa H, Miyakawa Y , Mayumi M. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;241:92-7.
5. Umemura T, Yeo AE, Sottini A, Moratto D, Tanaka Y, Wang RY et al. SEN virus infection and its relationship to transfusion-associated hepatitis. *Hepatology* 2001;33:1303-11.
6. Kojima H, Kaita KD, Zhang M, Giulivi A , Minuk GY. Genomic analysis of a recently identified virus (SEN virus) and genotypes D and H by polymerase chain reaction. *Antiviral Res* 2003;60:27-33.
7. Tanaka Y, Primi D, Wang RY, Umemura T, Yeo AE, Mizokami M 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.
8. Huang LR, Wang HH, Lin WS , Lin CL. The prevalence of SEN virus infection in blood donors in Taiwan. *J Infect* 2005;51:30-4.
9. Thom K, Cleland A, Salakova M, Candotti D , Petrik J. Prevalence and genetic heterogeneity of SEN virus genotypes D and H in blood donors from Central and Western Europe and West Africa. *Transfus Med*;21:42-50.
10. Serin MS, Koksal F, Oksuz M, Abayli B, Aslan G, Tezcan S 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.
11. Tezcan S. Prevalence of SEN virus genotype-D and genotype-H among haemodialysed patients. *Turk J Med Sci* 2009;39:397-403.
12. Kao JH, Chen W, Chen PJ, Lai MY , Chen DS. Prevalence and implication of a newly identified infectious agent (SEN virus) in Taiwan. *J Infect Dis* 2002;185:389-92.
13. Pfeiffer RM, Tanaka Y, Yeo AE, Umemura T, Seal KH, Shih JW et al. Prevalence of SEN viruses among injection drug users in the San Francisco Bay area. *J Infect Dis* 2003;188:13-8.
14. Chiou SS, Huang JF, Chang TT, Hsieh MY, Dai CY, Yu ML et al. SEN and hepatitis virus infections in nontransfused children and pediatric thalassemia patients with multiple transfusions in Taiwan. *Digestion* 2006;74:208-14.
15. Dai CY, Chuang WL, Chang WY, Chen SC, Sung MH, Hsieh MY et al. SEN virus infection among patients on maintenance hemodialysis in southern Taiwan. *J Infect* 2005;51:110-5.
16. Momosaki S, Umemura T, Scudamore CH, Kojiro M, Alter HJ , Tabor E. SEN virus infection in patients with hepatocellular carcinoma. *J Viral Hepat* 2005;12:435-8.

17. Karimi-Rastehkenari A , Bouzari M. High frequency of SEN virus infection in thalassemic patients and healthy blood donors in Iran. *Virology* 2005;35:1.
18. 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?scp=1&sq=sen++virus&st=nyt> 1999;july.
19. Akiba J, Umemura T, Alter HJ, Kojiro M , Tabor E. SEN virus: epidemiology and characteristics of a transfusion-transmitted virus. *Transfusion* 2005;45:1084-8.
20. Allain JP, Thomas I , Sauleda S. Nucleic acid testing for emerging viral infections. *Transfus Med* 2002;12:275-83.
21. Menon KVN. Non-A to E hepatitis. *Curr Opin Infect Dis*;15:529-34.
22. al MIKe. Microbiology 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.
23. Carstens EB , Ball LA. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2008). *Arch Virol* 2009;154:1181-8.
24. Kamahora T, Hino S , Miyata H. Three spliced mRNAs of TT virus transcribed from a plasmid containing the entire genome in COS1 cells. *J Virol* 2000;74:9980-6.
25. Umemura T, Tanaka Y, Kiyosawa K, Alter HJ , Shih JW. Observation of positive selection within hypervariable regions of a newly identified DNA virus (SEN virus)(1). *FEBS Lett* 2002;510:171-4.
26. Moriyama M, Mikuni M, Longren W, Zi-Yi Z, Xueqing W, Oshiro S et al. Epidemiology of SEN virus infection among patients with hepatitis B and C in China. *Hepatology* 2003;27:174-80.
27. Zubiaurre L, Zapata E, Bujanda L, Castillo M, Oyarzabal I, Gutierrez-Stampa MA et al. Cytomegalovirus hepatitis and myopericarditis. *World J Gastroenterol* 2007;13:647-8.
28. Farr RW, Short S , Weissman D. Fulminant hepatitis during herpes simplex virus infection in apparently immunocompetent adults: report of two cases and review of the literature. *Clin Infect Dis* 1997;24:1191-4.
29. Shibata Y, Kitajima N, Kawada J, Sugaya N, Nishikawa K, Morishima T et al. Association of cytomegalovirus with infantile hepatitis. *Microbiol Immunol* 2005;49:771-7.
30. Crum NF. Epstein Barr virus hepatitis: case series and review. *South Med J* 2006;99:544-7.
31. Tameda Y, Kosaka Y, Shiraki K, Ohashi Y, Hamada M, Miyazaki M et al. Hepatitis in an adult with rubella. *Intern Med* 1993;32:580-3.
32. Giladi M, Schulman A, Kedem R , Danon YL. Measles in adults: a prospective study of 291 consecutive cases. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1987;295:1314.
33. Delic D, Nestic Z, Prostran M, Simonovic J , Jankovic S. Anicteric hepatitis in an adult associated with coxsackie b4 virus infection. *Infection* 2006;34:236-7.
34. Ho JK, Tha SP, Coupland R, Dalal BI, Bowie WR, Sreenivasan GM et al. Parvovirus B19 in an immunocompetent adult patient with acute liver failure: an underdiagnosed cause of acute non-A-E viral hepatitis. *Can J Gastroenterol* 2005;19:161-2.
35. Hough R, Chetwood A, Sinfield R, Welch J , Vora A. Fatal adenovirus hepatitis during standard chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 2005;27:67-72.
36. Ling LM, Wilder-Smith A , Leo YS. Fulminant hepatitis in dengue haemorrhagic fever. *J Clin Virol* 2007;38:265-8.
37. Francis TI, Moore DL, Edington GM , Smith JA. A clinicopathological study of human yellow fever. *Bull World Health Organ* 1972;46:659-67.

38. Bhowmick BK, Simpsom B , Way SP. Secondary syphilis presenting jaundice. *Postgrad Med J* 1975;51:412-6.
39. Poovorawan Y, Chatchatee P , Chongsrisawat V. Epidemiology and prophylaxis of viral hepatitis: a global perspective. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17 Suppl:S155-66.
40. Wilson LE, Umemura T, Astemborski J, Ray SC, Alter HJ, Strathdee SA et al. Dynamics of SEN virus infection among injection drug users. *J Infect Dis* 2001;184:1315-9.
41. Lin JG, Goto T, Nakane K, Miura K, Mikami K, Ohshima S et al. Clinical significance of SEN-virus on interferon response in chronic hepatitis C patients. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18:1144-9.
42. Umemura T, Tanaka E, Ostapowicz G, Brown KE, Heringlake S, Tassopoulos NC et al. Investigation of SEN virus infection in patients with cryptogenic acute liver failure, hepatitis-associated aplastic anemia, or acute and chronic non-A-E hepatitis. *J Infect Dis* 2003;188:1545-52.
43. Sagir A, Adams O, Antakyali M, Oette M, Erhardt A, Heintges T et al. SEN virus has an adverse effect on the survival of HIV-positive patients. *AIDS* 2005;19:1091-6.
44. Mu SJ, Du J, Zhan LS, Wang HP, Chen R, Wang QL et al. Prevalence of a newly identified SEN virus in China. *World J Gastroenterol* 2004;10:2402-5.
45. Sharifi Z, Mahmoodian-Shooshtari M , Talebian A. The prevalence of SEN virus infection in blood donors in Iran. *Arch Iran Med* 2008;11:423-6.
46. Spataro P, Di Pietro A, Scoglio ME, Visalli G, Chirico C, Picerno I et al. Prevalence of SENV-H and SENV-D virus: epidemiological study in blood donors and dialysis patients. *Ren Fail* 2006;28:441-8.
47. Shibata M, Wang RY, Yoshida M, Shih JW, Alter HJ , Mitamura K. The presence of a newly identified infectious agent (SEN virus) in patients with liver diseases and in blood donors in Japan. *J Infect Dis* 2001;184:400-4.
48. Tangkijvanich P, Theamboonlers A, Sriponthong M, Thong-Ngam D, Kullavanijaya P , Poovorawan Y. SEN virus infection in patients with chronic liver disease and hepatocellular carcinoma in Thailand. *J Gastroenterol* 2003;38:142-8.
49. Serin MS, Tezcan S, Delialioglu N, Tiftik N, Aslan G , Emekdas G. [Investigation of SEN virus genotypes D and H among blood donors in Mersin University Medical School Hospital]. *Mikrobiyol Bul* 2006;40:39-45.
50. Wong SG, Primi D, Kojima H, Sottini A, Giulivi A, Zhang M et al. Insights into SEN virus prevalence, transmission, and treatment in community-based persons and patients with liver disease referred to a liver disease unit. *Clin Infect Dis* 2002;35:789-95.
51. Pirovano S, Bellinzoni M, Ballerini C, Cariani E, Duse M, Albertini A et al. Transmission of SEN virus from mothers to their babies. *J Med Virol* 2002;66:421-7.
52. Holland PM, Abramson RD, Watson R , Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'---3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:7276-80.
53. Durmaz R. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji. Nobel Tıp Kitap Evleri. İstanbul2001.
54. D.R. H. UK: BIOS Scientific Publishers Limited. *Molecular Virology: A Medical Perspectives Book* 1994;1st.Ed.
55. Kustimur S. Tanısal moleküler mikrobiyoloji teorik ve uygulamalı kursu teorik ders notları kitabı. Ankara: Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı; 2009.
56. Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM , van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 1990;28:495-503.

57. Purves D. An illustration of how PCR works. In: D. Sadava editor 2001.
58. Vierstraete A. <<http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>>.
59. Evrard A. Real time PZR. In: P. Boisseau editor. Berlin 2010.
60. Taylor GR. Polymerase chain reaction: basic principles and automation. New York: Oxford University Press 1991;1:1-14.
61. Sagir A, Adams O, Oette M, Erhardt A, Heintges T, Haussinger D. SEN virus seroprevalence in HIV positive patients: association with immunosuppression and HIV-replication. *J Clin Virol* 2005;33:183-7.
62. Lorenz E, Quaiser K. [Panmyelopathy following epidemic hepatitis]. *Wien Med Wochenschr* 1955;105:19-22.
63. Marsh JC, Ball SE, Darbyshire P, Gordon-Smith EC, Keidan AJ, Martin A et al. Guidelines for the diagnosis and management of acquired aplastic anaemia. *Br J Haematol* 2003;123:782-801.
64. Fuhrer M, Rampf U, Baumann I, Faldum A, Niemeyer C, Janka-Schaub G et al. Immunosuppressive therapy for aplastic anemia in children: a more severe disease predicts better survival. *Blood* 2005;106:2102-4.
65. Dai CY, Yu ML, Lin ZY, Chen SC, Hsieh MY, Wang LY et al. Prevalence and clinical significance of SEN virus infection among volunteer blood donors in southern Taiwan. *Dig Dis Sci* 2004;49:1181-5.
66. Sugiura T, Goto K, Imamine H, Ando T, Ban K, Sugiyama K et al. Prevalence of SEN virus among children in Japan. *Virus Res* 2004;100:223-8.
67. Cakaloglu Y, Akyuz F, Bozaci M, Ibrisim D, Pinarbasi B, Demir K et al. Prevalence and clinical significance of SEN-H virus in chronic hepatitis B, C and delta infections in Turkey. *Turk J Gastroenterol* 2008;19:104-8.
68. Yoshida H, Kato N, Shiratori Y, Shao R, Wang Y, Shiina S et al. Weak association between SEN virus viremia and liver disease. *J Clin Microbiol* 2002;40:3140-5.
69. Pirovano S, Gregorini G, Malacarne F, Marini M, Albertini A, Imberti L. High prevalence of SEN virus infection in patients on maintenance hemodialysis: frequent mixed infections with different variants and evidence for nosocomial transmission of the virus. *Intervirology* 2005;48:216-22.
70. Okamoto H, Akahane Y, Ukita M, Fukuda M, Tsuda F, Miyakawa Y et al. Fecal excretion of a nonenveloped DNA virus (TTV) associated with posttransfusion non-A-G hepatitis. *J Med Virol* 1998;56:128-32.
71. Umemura T, Alter HJ, Tanaka E, Yeo AE, Shih JW, Orii K et al. Association between SEN virus infection and hepatitis C in Japan. *J Infect Dis* 2001;184:1246-51.