

MERSİN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ KAN DONÖRLERİNDE SEN VİRUSU GENOTİP D VE H VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI*

INVESTIGATION OF SEN VIRUS GENOTYPES D AND H AMONG BLOOD
DONORS IN MERSIN UNIVERSITY MEDICAL SCHOOL HOSPITAL

Mehmet S.SERİN**, **Seda TEZCAN*****, **Nuran DELİALİOĞLU*****
Naci TİFTİK****, **Gönül ASLAN*****, **Gürol EMEKDAŞ*****

ÖZET: SEN virusu, son zamanlarda tanımlanmış bir DNA virusu olup, viral genomun filogenetik analizleri sonucunda 8 genotip (A-H) tarif edilmiştir. Bunlardan genotip D (SENV-D) ve H (SENV-H), insanlarda transfüzyon sonrası hepatitlerin muhtemel etiyolojisinden sorumlu tutulmaktadır. SEN virus ile karaciğer patolojisi arasındaki ilişki net olarak ortaya çıkarılamamış olmakla beraber virusun karaciğerde replike olduğu ve bulaşın kan ile olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada, SENV-D ve SENV-H genotiplerinin kan donörlerindeki prevalansının araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Kan Merkezine müracaat eden, yaş ortalaması 36.4 yıl olan 98'i erkek ve 2'si bayan olmak üzere toplam 100 kan donöründen alınan serum örnekleri dahil edilmiştir. SENV-D ve SENV-H genotiplerinin DNA'sı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile araştırılmıştır. PCR reaksiyonunda, SENV-D genotipinin tespiti için D10S ve L2AS primeri, SENV-H genotipinin tespiti için ise C5S ve L2AS primeri kullanılmıştır. Sonuç olarak, çalışılan serumların 25'inde (%25) SEN virusu varlığı tesbit edilmiş, bunlar arasında SENV-D viremisinin prevalansı %10 (10/100), SEN-V H viremisinin prevalansı ise %15 (15/100) olarak belirlenmiştir. Her ne kadar çalışılan örnek sayısı, toplumdaki genel prevalansı yansıtmak için yeterli sayıda olmasa da, çalışmamıza dahil ettiğimiz kan donörü örneklerinin Mersin ilindeki prevalansı nisbeten yansıtılabileceği düşünüldüğünde, çalışmamızın sonucu; ilimizde bu genotiplerin asemptomatik taşıyıcılığının %25 olduğunu göstermektedir.

Anahtar sözcükler: *SEN virus, SENV-D, SENV-H, kan donörü.*

ABSTRACT: SEN virus is a recently discovered DNA virus, and eight genotypes (A to H) were detected by phylogenetic analysis. Genotype D (SENV-D) and H (SENV-H) are thought to be associated in the etiology of post-transfusion hepatitis. Although no strong association was revealed between liver pathology

* Bu çalışma 2. Ulusal Viroloji kongresinde (13-17 Eylül 2005, Antalya) poster olarak sunulmuştur.

** Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Bölümü, Mersin.

*** Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin.

**** Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Hematoloji Bilim Dalı, Mersin.

and SEN virus, the viral replication in hepatocytes and transmission by blood transfusions were well characterized. The aim of this study was to investigate the prevalence of SENV-D and SENV-H in blood donors. One hundred serum samples were included in the study which were obtained from blood donors comprised of 98 male and 2 female with a mean age 36.4 years who were enrolled at Mersin University Faculty of Medicine blood center. The DNAs of SENV-D and SENV-H were detected with polymerase chain reaction (PCR), by using D10S/L2AS and C5S/L2AS primers, respectively. SEN virus DNA positivity was detected in 25 of 100 (25%) sera, of which 10 (10%) were positive for SENV-D and 15 (15%) were positive for SENV-H DNA. Although, the number of samples were not sufficient to reflect the general prevalence, our study relatively reveals that asymptomatic carriage rate of these viruses were 25% in our province.

Key words: SEN virus, SENV-D, SENV-H, blood donor.

G İ R İ Ş

Viral hepatit olgularının %80'inden fazlasından sorumlu tutulan beş temel virus vardır (hepatit A-E virusları). Bununla beraber, akut hepatitli bireylerin yaklaşık olarak %20'si bilinen hepatit viruslarına karşı negatif olarak test edilirken, transfüzyonla ilişkili hepatiti olan hastaların %10'undan fazlasında, başka viral hepatit ajanlarının varlığı ve karaciğer patogeneğinde rol oynadıkları düşünülmektedir¹.

Amerikan Standart Şirketleri'nin tıbbi sistemler grubunun bir parçası olan DiaSorin, 1999 yılının haziran ayında yeni bir hepatit virusunun keşfedildiğini duyurmuştur. Primi ve arkadaşları¹, AIDS hastalarının kanında şimdiye kadar tespit edilmemiş patojenlerin varlığını araştırırken bu virüsü keşfetmiştir. Primi, virusun bütün filogenetik dallarını kapsayan bir genomik kütüphane oluşturarak geniş spektrumlu PCR (Broad Range-PCR)'ı kullanmış ve yaptığı çalışmalarda bir hastanın kanında yeni nükleotid dizileri bulmuştur. Bu dizileri klonladıktan sonra sekans analizine tabi tutmuş ve dizileri mevcut gen bankası dizileri ile kıyasladığında bu dizilerin henüz tespit edilmemiş yeni bir virusa ait olduğunu tespit etmiştir. Daha sonraları bu virüsü, virusun tanımlandığı hasta adının baş harfleri olan "SEN" olarak adlandırmıştır².

SEN virüsü (SEN-V), zarfsız ve yaklaşık olarak 3900 nükleotitden oluşan tek zincirli bir DNA virusudur. Genom, sirküler ve en az 3 açık okuma çerçevesine (ORF) sahiptir³. SEN-V'nun filogenetik analizi, bu virusun A'dan H'ye kadar isimlendirilen 8 genotipinin mevcut olduğunu ortaya çıkarmıştır⁴. Şimdiye kadar netleştirilen karakteristik özelliklerine göre SEN-V ve TT virus arasında önemli bir paralellik mevcuttur. Bu bulgular, bu virusların ortak bir ataya sahip olduğunu düşündürmektedir³. TTV gibi SEN-V'de *Circoviridae* ailesine dahil edilmiştir⁵.

Sağlıklı kan donörlerinde ve genel popülasyonda aktif enfeksiyon sıklığı. SENV-A, SENV-B ve SENV-E enfeksiyonlarına kan donörleri arasında daha az sıklıkla rastlanmakta olup, non-A-E hepatitleriyle ilişkili gibi görünmemektedir. Genotip D ve H için uyumlu donör/akut hepatit oranlarının varlığına ait ve virusun karaciğerde replike olduğunu destekleyen bulgular olmasına rağmen, şu ana kadar SEN-V ile

karaciğer patolojisi arasında net bir ilişki olduğu gösterilememiştir⁶. Enfeksiyonun doğal seyri ile ilgili çok az bilgi mevcuttur. Retrospektif araştırmalarda, bir çok hastanın virusa maruz kaldıktan itibaren 1 ay içerisinde virusu kandan temizlediği belirtilmektedir. SEN-V antikorlarını tesbit edebilecek serolojik bir testin henüz mevcut olmaması da, virusla ilk temasın doğru olarak belirlenmesini zorlaştırmaktadır⁵.

SENV-D ve SENV-H genotiplerinin transfüzyon ile ilişkili non-A-E hepatitlerinde daha prevalan olduğu bildirilmiştir^{4,5}. Aynı zamanda kronik karaciğer hastalıklarında ve hepatosellüler karsinomada, sağlıklı yetişkinlere göre daha sık rastlandığı bildirilmiştir^{7,8}. Donör ve alıcılar arasındaki dizi homolojilerinin kıyaslanması SEN virusunun kan ile bulaştığını ortaya çıkarmıştır⁹. Kan transfüzyonu yapılan hastalar, transfüzyon yapılmayanlara göre daha yüksek bir bulaşma riski altındadır. Bu hastalarda transfüzyon yapılan kan ünitesi sayısı ile artış gösteren oranda bir enfeksiyon riski vardır¹⁰. Bununla beraber birçok çalışma, SEN-V ile karaciğer patolojisi arasında net bir ilişkinin mevcut olmadığını vurgulamaktadır^{6,8,11-13}.

Bu çalışmada, hastanemize kan vermek üzere başvuran kan donörlerinde SEN virusu D ve H genotiplerine ait DNA varlığının araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Kan Merkezine müracaat eden ve parenteral taşınan hastalıklar için hiçbir risk faktörüne sahip olmadığı bilinen 100 kan donörüne ait serum örnekleri, kendi olurları alınarak çalışmaya dahil edildi.

DNA Ekstraksiyonu: Serum örneklerinden DNA ekstraksiyonu, klasik fenol-kloroform yöntemiyle gerçekleştirildi. 1.5 ml'lik ependorf tüpüne, 100 µl serum örneği koyularak, üzerine 300 µl "lysis" tamponu (10mM Tris/HCl pH 8; 5mM EDTA, %0.5 SDS) + 1 µl proteinaz-K (100mg/ml) ilave edip vortekslendi. Bu karışım, 56°C'lik su banyosunda 4 saat inkübasyondan sonra bir kez fenol+kloroform, bir kez de sadece kloroform ekstraksiyonuna tabi tutuldu. Son santrifügasyondan sonra üst faz yeni bir tüpe aktarılarak üzerine 1ml etanol (%95'lik) ilave edilerek 12 saat bekletildi. Tüpler 12.000xg'de 15 dakika santrifüj edildi ve üst kısım dikkatlice uzaklaştırıldı. Tüpler temiz kağıt havlular üzerine ters olarak koyuldu ve 10 dakika havada kurutuldu. Pellet 20 µl steril distile su ile yavaş hareketlerle pipetaj yaparak çözüldü. DNA ekstraktları çalışılana kadar -20°C'de saklandı.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR): SEN virus D ve H genotiplerinin DNA'sı PCR ile araştırıldı. Reaksiyonda kullanılan primerler, Umemura ve arkadaşları⁶ ile Kojima ve arkadaşlarının¹⁴ yaptığı çalışmalardan seçildi. SENV-D için D10S ve L2AS primeri, SENV-H için ise C5S ve aynı L2AS antisense primeri kullanıldı (Tablo I).

Tablo I: SEN-V Genotiplerinin Tespitinde Kullanılan Primerler

Sense Primer Dizisi	Antisense Primer Dizisi	PCR Ürünü
D10S (5'-GTAACCTTTCGGTCAACTGCC-3')	L2AS (5'- CCTCGGTTKSAAAKGTYTGATAGT-3')	222 nt 1322-1544
C5S (5'-GGTGCCCTWGTYAGTTGGCGGTT-3')	L2AS (5'- CCTCGGTTKSAAAKGTYTGATAGT-3')	229 nt 1271-1500

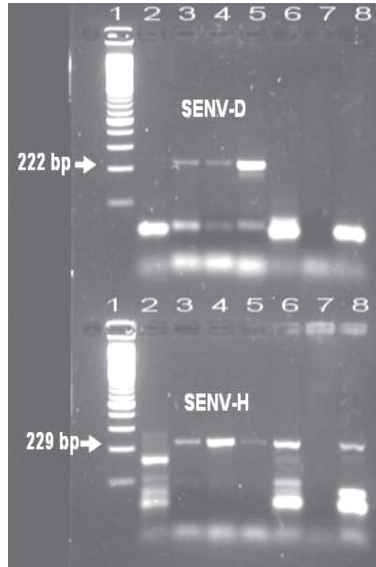
W: A veya T, Y: C veya T, M: A veya C, K: G veya T, S: C veya G.

SENV-D genotipinin belirlenmesi için 0.5 µl primer D10S (100pmol/µl) ve 0.5 µl primer L2AS (100pmol/µl), 0.25 mmol/L dNTP, 2.5 mmol/L magnezyum klorid, 1XPCR tamponu (Promega, Madison, ABD), 1.25 U Taq polimeraz (Promega, Madison, ABD) ve 5 µl ekstrakte edilmiş DNA ilave edilerek reaksiyon karışımları termal döngü cihazına (Eppendorf Mastercycler, München, Almanya) yerleştirilerek, 35 siklus; 94°C'de 1 dakika denatürasyon, 58°C'de 1 dakika bağlanma ve 72°C'de 1.5 dakika uzama aşamaları uygulandı. Reaksiyondan sonra karışım 72°C'de 10 dakika daha ilaveten inkübe edilerek eksik kalan zincirlerin uzaması sağlandı. SENV-H genotipi için C5S ve L2AS primerleri aynı şartlarda kullanıldı. Reaksiyondan sonra elde edilen PCR ürünleri %2'lik agarozda yapılan elektroforez işlemi ile analiz edildi. Elde edilen ürünlerin molekül ağırlıkları ilk kolona yüklenen 100 bp'lik "step ladder" (Promega, Madison, ABD) ile hesaplandı.

B U L G U L A R

Çalışmaya dahil edilen 100 kan donörünün serumundan 10'unda (%10) SENV-D ve 15'inde (%15) SENV-H genotipi olmak üzere, toplam 25 (%25) serumda SENV DNA'sı tesbit edilmiştir.

D10S ve L2AS primerleri ile uygulanan PCR amplifikasyonunda, elde edilen ürünlerin elektroforezi sonucunda 222 baz çift (bp)'lik bantlarının tesbit edildiği örnekler SENV-D genotipi bakımından pozitif; C5S ve L2AS primerlerini ile elde edilen amplifikasyon ürünlerinin elektroforezi sonunda 229 bp'lik bantların tespit edildiği örnekler ise SENV-H genotipi bakımından pozitif olarak değerlendirilmiştir (Resim 1).



Resim 1: PCR ürünlerinin elektroforez sonucu.

T A R T I Ş M A

Bir çok hastanın, viremiyi, virusa maruz kaldıktan itibaren 1 ay içerisinde temizlemesi, SEN-V antikorlarını tespit edebilen bir serolojik testin henüz mevcut olmaması ve buna bağlı olarak virusla ilk temasın kesin bir şekilde tespit edilememesi, enfeksiyonun doğal seyrinin net olarak anlaşılamamasına yol açmaktadır⁵. Bu nedenle, SEN virusunun karaciğer patolojisindeki muhtemel rolünün halen araştırılmaya ihtiyacı vardır.

Kan merkezlerinde kan kaynaklı enfeksiyon ajanlarının varlığını araştıran birçok rutin test yapılmaktadır. Ancak SEN virusu gibi yeni keşfedilmiş ajanların varlığı, sadece araştırma amaçlı çalışmalarda konu edilmektedir. Bununla beraber elde edilen prevalans verileri oldukça dikkat çekicidir.

Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde, kan transfüzyon alıcıları arasında SENV-D ve SENV-H prevalansının %30, kontrol grubu ve kan donörlerinde ise %2-3 olduğu bildirilmiş, transfüzyon üniteleri arttıkça prevalansın da arttığı ve SEN-V sekans homolojisinin donör-alıcı zincirinde gösterildiği rapor edilmiştir¹⁵. Bu çalışmada, San Francisco'da intravenöz (IV) ilaç kullananlarda SENV-A prevalansının %47.5, SENV-C/H prevalansının %35.6 ve SENV-D prevalansının %10.3 oranında olduğu saptanmış; enfeksiyon, uzun süreli IV ilaç kullanımıyla ilişkilendirilmiş ve SEN-V izolatlarının San Francisco'nun Bay eyaletinde yaygın olarak bulunduğu belirtilmiştir¹⁵. Wilson ve arkadaşları¹⁶ ABD Baltimore'da yaptıkları bir çalışmada, IV ilaç kullananlarda SENV-D prevalansını %32.7, SENV-H prevalansını ise %37.5 olarak bildirmişlerdir. Schröter ve arkadaşları¹⁷ Almanya'da, parenteral taşınan hastalıklar için risk altında olan bireylerde yaptıkları çalışmada, HIV ile enfekte bireylerin %44.4'ünde SENV-H viremişi tespit etmişlerdir. IV ilaç kullananlarda ise SENV-H viremisinin oranı %23 olarak bildirilmiştir. Bu çalışmada, kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edilen kan donörleri grubunda ise SEN-V prevalansı %16.8 olarak tespit edilmiştir¹⁷. Dai ve arkadaşları¹⁸, Taiwan'daki sağlıklı donörlerde PCR metodu kullanarak SENV-D/H DNA'sını %24.2 olarak belirlemişlerdir. Japonya'da yapılan çalışmalarda SEN-V prevalansı, kan donörleri ve sağlıklı kişilerde %10-20 oranlarında saptanmıştır^{6,7}. İtalya ve Amerika'daki sağlıklı kan donörlerinde ise bu oran %2'dir¹⁹. Bu oranlar Kanada'lı bireylerde %39, Japonya'da gebe kadınlarda %27 olarak verilmektedir^{20,21}. Yoshida ve arkadaşlarının¹¹ Japonya'da SEN-V DNA'sının tespitinde başka primerleri kullandıkları çalışmalarında, sağlıklı erişkinlerdeki oranın yaklaşık %75' yükseldiği vurgulanmıştır.

Bizim çalışmamızda sağlıklı kan donörleri arasındaki SEN-V prevalansı %25 olarak tespit edilmiştir. Bulduğumuz bu oran; Taiwan'daki sağlıklı kişilerdeki SEN-V prevalansa yakın olup, Japonya, İtalya ve Amerika'dan oldukça yüksek, Kanadalı bireylerdeki prevalans oranlarından ise oldukça düşüktür. Bizim çalışmamızın bulgularına göre, sağlıklı kan donörlerinin %5'i SEN-V D, %20'si SEN-V H ile enfektedir. Bu bulgular Türkiye'de Mersin ilindeki bireylerin dörtte birinde SEN-V varlığını göstermektedir.

Ülkemizde, Elazığ ilinde sağlıklı 180 çocukta yapılan bir çalışmada, SEN-V prevalansı %22.3 olarak belirlenmiş, bireylerin 25'inde (%14) SENV-D'ye, 15'inde (%8.3) ise SENV-H'ye rastlandığı bildirilmiştir²². Elazığ ilinin SEN-V prevalans oranı

ile bizim sonuçlarımız benzerlik göstermektedir. Ancak, Taiwan ve Japonya gibi ülkelerde SENV-D'nin, SENV-H'den daha yaygın olduğunu gösteren çalışmalar vardır^{6,12,18,23,24}. Bu sonuçlar ile SEN-V varyantlarının ülke ve dünya çapında farklı coğrafik dağılıma sahip olduğu gözlenmektedir.

Günümüzde halen bu virus herhangi bir patoloji ile ilişkilendirilememiştir. Ancak, yapılan bütün prevalans çalışmalarında ve çalışmaların yapıldığı bütün ülkelerde, bu virusa önemli ölçüde rastlanmış olması özellikle asemptomatik kan donörlerinde yüksek oranda bulunması bizce dikkate alınması gereken bir durumdur. Zira günümüzde, nedeni henüz belirlenememiş birçok hastalık mevcuttur. Bu hastalıkların birisi ile ilişkilendirildiği takdirde, kan donörlerindeki prevalans çok daha önemli bir hale gelebilir.

KAYNAKLAR

1. Sagir A, Kirschberg O, Heintges T, Erhardt A, Haussinger D. SEN virus infection. *Rev Med Virol* 2004; 14: 141-48.
2. Habeck M. New hepatitis virus discovered. *Mol Med Today* 1999; 5: 462.
3. Bowden S. New hepatitis viruses: contenders and pretenders. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16: 124-31.
4. Tanaka Y, Primi D, Wang RYH, et al. Genomic and 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.
5. Allain JP, Thomas I, Saulea S. Nucleic acid testing for emerging viral infections. *Transfus Med* 2002; 12: 275-83.
6. Umemura T, Yeo AET, Sottini A, et al. SEN virus infection and its relationship to transfusion-associated hepatitis. *Hepatology* 2001; 33: 1303-11.
7. 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.
8. 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.
9. Ball JK, Curran R, Berridge S, et al. TT virus sequence heterogeneity in vivo: evidence for co-infection with multiple genetic types. *J Gen Virol* 1999; 80: 1759-68.
10. Davidson F, MacDonald D, Mokili JLK, Prescott LE, Graham S, Simmonds P. Early acquisition of TT virus (TTV) in an area endemic for TTV infection. *J Infect Dis* 1999; 179: 1070-6.
11. Yoshida H, Kato N, Shiratori Y, et al. Weak association between SEN virus viremia and liver disease. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 3140-45.
12. Umemura T, Alter HJ, Tanaka E, et al. SEN virus: response to interferon alfa and influence on the severity and treatment response of coexistent hepatitis C. *Hepatology* 2002; 35: 953-9.
13. Umemura T, Alter HJ, Tanaka E, et al. Association between SEN virus infection and hepatitis C in Japan. *J Infect Dis* 2001; 184:1246-51.
14. Kojima H, Kaita KDE, 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.
15. Pfeiffer RM, Tanaka Y, Yeo AE, et al. Prevalence of SEN viruses among injection drug users in the San Francisco Bay area. *J Infect Dis* 2003; 188: 13-8.

16. Wilson LE, Umemura T, Astemborski J, et al. Dynamics of SEN virus infection among injection drug users. *J Infect Dis* 2001; 184: 1315-19.
17. Schröter M, Laufs R, Zollner B, et al. Prevalence of SENV-H viraemia among healthy subjects and individuals at risk for parenterally transmitted diseases in Germany. *J Viral Hepatit* 2002; 9: 455-9.
18. Dai CY, Yu ML, Lin ZY, et al. Prevalence and clinical significance of SEN virus infection among volunteer blood donors in southern Taiwan. *Dig Dis Sci* 2004; 49: 1181-5.
19. Mushahwar IK. Recently discovered blood-borne viruses: are they hepatitis viruses or merely endosymbionts? *J Med Virol* 2000; 62: 399-404.
20. Wong SG, Primi D, Kojima H, 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.
21. Sugiura T, Goto K, Imamine H, et al. Prevalence of SEN virus among children in Japan. *Virus Res* 2004; 100: 223-8.
22. Toraman ZA, Bulut Y, Aksoy A, Özdarendeli A, Seyrek A. Hemodiyaliz hastalarında SEN-D ve SEN-H virus prevalansı. 3. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi. 28 Haziran-1 Temmuz, 2004, Ankara. Program ve Bildiri Özet Kitabı, s: 216, p63.
23. Kobayashi N, Tanaka E, Umemura T, et al. Clinical significance of SEN virus infection in patients on maintenance haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18: 348-52.
24. Tanaka Y, Pfeiffer R, Yeo AE, et al. PCR-probe capture hybridization assay and statistical model for SEN virus prevalence estimation. *J Med Virol* 2004; 73: 123-30.