

← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**TÜRKİYE'DE İNFLUENZA A (H1N1, H3N2) VİRÜS
İZOLATLARINDA ANTİVİRAL DİRENÇ
MUTASYONLARININ ARAŞTIRILMASI**

MERAL AKÇAY ÇIPLAK

**DANIŞMAN
PROF. DR. SELİM BADUR**

**MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

MİKROBİYOLOJİ PROGRAMI

İSTANBUL-2011

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Doktora Programında Meral Akçay Çıblak tarafından hazırlanan "Türkiye'de İnfluenza A (H1N1, H3N2) Virüs İzolatlarında Antiviral Direnç Mutasyonlarının Araştırılması" başlıklı Doktora tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

03 / 03 / 2011

Tez Sınav Jürisi

<u>Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)</u>	<u>İmzası</u>
1.Prof Dr Bülent Gürler	İstanbul Tıp Fak. Mikrobiyoloji AD.
2.Prof Dr Selim Badur (Danışmanı)	İstanbul Tıp Fak. Mikrobiyoloji AD.
3.Prof Dr Emel Bozkaya	İstanbul Tıp Fak. Mikrobiyoloji AD.
4.Prof Dr Mustafa Hasöksüz	Veteriner Fak. Viroloji AD.
5.Prof Dr Ali Ağaçfıdan	İstanbul Tıp Fak. Mikrobiyoloji AD.

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.



Meral Akçay Çıplak

İTHAF

Anne'me ve **Baba'**ma ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Bülent Gürler'e gösterdiği ilgi ve yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Viroloji ve Temel İmmünoloji Bilimdalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Emel Bozkaya'ya tez çalışmalarımın başlangıcından beri göstermiş olduğu özen, ilgi ve destek için teşekkür ederim.

Doktora çalışmalarımın başlangıcından itibaren, tez konumun belirlenip yürütülmesi dâhil her türlü bilgi ve deneyimlerini kısıtlamadan paylaşan, iyi bir akademisyen olmak için başladığım bu çalışmada bana her türlü imkânı sağlamak için çabalarını esirgemeyen, birlikte çalışmaktan ve öğrencisi olmaktan gurur duyduğum tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Selim Badur'a teşekkür ederim.

Tezimin deneysel çalışmalarının düzenlenmesinde ve gerçekleştirilmesinde kendi laboratuvar imkânlarını sunan, teknik ve akademik deneyimleriyle bana yol gösteren, araştırmanın ciddi ama zevkli bir süreç olduğunu öğreten hocam Sayın Prof. Dr. Mustafa Hasöksüz'e teşekkür ederim.

Doktora çalışmam süresince bilgi ve deneyimlerine ihtiyacım olduğu her zaman yardımını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Şadi Yenen'e teşekkür ederim.

Doktora eğitimim süresince bana destek veren Sayın Prof. Dr. Ali Ağaçfıdan'a teşekkür ederim.

Bana inanç ve güvenleri daimi olan, eğitimin yüceliğine olan inançları ile her zaman yanımda olan annem Sıdika Akçay ve babam Urhan Akçay'a teşekkür ederim. Tez çalışmalarım nedeniyle kendisini çok kez ihmal ettiğim, bana karşı bir yetişkin kadar anlayış ve sabır gösteren, yorgun anlarımda bana çay demleyip servis etmeyi ihmal etmeyen canım oğlum Çağdaş Aras'a teşekkür ederim.

Deneyimlerinden faydalandığım Mürvet Bozacı ve Derya Önel'e, her türlü sekreterlik işlerime yardımcı olan Yıldız Akkaş ve Necla Erhan'a, arkadaşlık ve moral destekleri için tüm Viroloji ve Temel İmmünoloji Bölümü çalışanlarına ve Defne Gümüş'e, İnfluenza Referans Laboratuvarındaki çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Doktora çalışmamın başlangıcından itibaren, her türlü desteğini esirgemeyen ablam Remziye Akçay’a, Hatun Narin’e, Aynur Gökmen Artar ve Hüsnü Artar’a teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 3358

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	Vİİ
TABLolar LİSTESİ.....	Xİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	Xİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	XİV
ÖZET	XVİ
ABSTRACT.....	XVİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Tarihçe	5
2.2. İnfluenza Virüslerinin Sınıflandırılması	8
2.3. İnfluenza Virüsünün Yapısı ve Organizasyonu.....	8
2.4. İnfluenza Virüslerinin Genomik Organizasyonu	10
2.5. İnfluenza Virüslerinin Replikasyon Döngüsü.....	12
2.5.1. Virüsün Konak Hücreye Tutunması	12
2.5.2. Virüsün Hücreye Girişi	14
2.5.3. Viral RNA Sentezi	15
2.5.4. Viral Proteinlerin Sentezi.....	16
2.5.5. Viral RNA'ların Paketlenmesi ve Virionun Oluşumu	16
2.5.6. Yeni Virionların Tomurcuklanarak Konak Hücreden Ayrılması	17
2.6. İnfluenza A Virüsünün Proteinleri ve Fonksiyonları	18
2.6.1. Hemagglütinin (HA) Proteini.....	19
2.6.2. Nöraminidaz (NA) Proteini.....	26
2.6.3. M2 Transmembran Proteini (İyon Kanalı Proteini).....	32
2.6.4. M1 Proteini (Matriks Proteini).....	34
2.6.5. RNA Polimeraz Kompleksi (RbRp)	34
2.6.6. Yapısal Olmayan Protein 1 (NS1 Proteini).....	36

2.6.7. Yapısal Olmayan Protein 2/Nükleer Eksport Proteini (NS2/NEP Proteini)	36
2.6.8. Nükleoprotein (NP).....	36
2.7. İnfluenza Virüslerinde Evrim	37
2.7.1. Nokta Mutasyonlar.....	38
2.7.2. Harmanlanma (Reassortment).....	39
2.7.3. Rekombinasyon.....	39
2.8. İnfluenza Virüslerinin Epidemiyolojisinde Rol Oynayan Genetik Değişimler	40
2.8.1. Antijenik Sürüklenme (Antigenic Drift)	40
2.8.1.1. HA Molekülünde Antijenik Sürüklenme	41
2.8.1.2. NA Molekülünde Antijenik Sürüklenme	41
2.8.2. Antijenik Kayma (Antigenic Shift).....	41
2.9. İnfluenza Virüslerinin Ekoloji ve Epidemiyolojisi	42
2.10. Hastalık: Patoloji ve Klinik Özellikler.....	48
2.11. Tanı	50
2.11.1. Tanı Amacıyla Örneklerin Alınması.....	50
2.11.2. Virüs İzolasyonu	51
2.11.3. Nükleik Asit Testleri.....	52
2.11.4. Hızlı Antijen Saptama Testleri.....	52
2.11.5. Seroloji	53
2.12. Korunma	53
2.12.1. Embriyonlu Yumurtada Üretilen Aşılar.....	54
2.12.1.1. İnaktif Bütün-Virüs Aşıları (Inactivated Whole-Virüs Vaccines)	54
2.12.1.2. İnaktif Parçalı-Virüs Aşıları (Inactivated Split-Virüs Vaccines).....	55
2.12.1.3. Soğuğa Adapte Canlı-Attenüe Aşılar (Cold Adapted Live-Attenuated Vaccines).....	55
2.12.2. Hücre Kültünde Üretilen İnaktif Bütün-Virüs Aşıları	56
2.13. Tedavi	57
2.13.1. M2 İyon Kanalı Blokörleri (Adamantanlar)	57
2.13.1.1. Amantadin ve Rimantadin.....	57
2.13.2. Nöraminidaz İnhibitörleri	60
2.13.2.1. Zanamivir	61
2.13.2.2. Oseltamivir	63
2.13.3. Nöraminidaz İnhibitörleri ve Direnç.....	64

2.13.4. Antiviral Direnç Saptama Yöntemleri	70
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	72
3.1. Antiviral Direnç Çalışmasında Kullanılan Örnekler.....	72
3.2. Hücre Kültürü ve Virüs Ekimi İçin Kullanılan Gereçler	72
3.3. İmmun-Yakalama (Immun--Capture) ELISA Deneyi için Kullanılan Gereçler ...	73
3.4. Moleküler Çalışmalarda Kullanılan Gereçler	74
3.4.1. Viral RNA Ekstraksiyonu için Kullanılan Gereçler	74
3.4.2. RT-PCR ile İnfluenza A virüslerinin Alt-tiplendirilmesi için Kullanılan Gereçler.....	74
3.4.3. Dizileme ve Dizi Analizi için Kullanılan Gereçler	75
3.5. Yöntemler	76
3.5.1. Örneklerin Alınması ve Transportu	76
3.5.2. Hücre Kültürü Çalışmaları	77
3.5.2.1. Hücre Çoğaltma ve Saklama Besi Yerlerinin Hazırlanması	77
3.5.2.2. Virüs Ekim Besiyerinin Hazırlanması	77
3.5.2.3. Fetal Sığır Serumunun (FSS) İnaktivasyonu.....	77
3.5.2.4. TPCK-Tripsin Çözeltilisinin Hazırlanması	78
3.5.2.5. Hücre Kültürü ve Virüs Ekimi	78
3.5.2.6. Virüs Ekimi İçin Gerekli 24'lük Hücre Plağının Hazırlanması	78
3.5.2.7. 24'lük Hücre Kültürü Plaklarına Hastalardan Alınan Örneklerin Ekimi.....	79
3.5.3. Hücre Kültürü Üst Sıvısından IC-ELISA Testi ile İnfluenza A ve B Virüslerinin Saptanması	80
3.5.3.1. IC-ELISA Testi için Gerekli Reaktiflerinin Hazırlanması.....	80
3.5.3.2. IC-ELISA Testi ile İnfluenza A ve B Tiplerinin Saptanması	81
3.5.4. Moleküler Çalışmalar.....	82
3.5.4.1. Viral RNA Ekstraksiyonu.....	82
3.5.4.2. RT-PCR ile İnfluenza A Virüsünün Alt-tiplendirilmesi	83
3.5.4.3. Dizileme Amacıyla Örneklerden Ekstrakte Edilen RNA'ların RT-PCR Yötemi ile Çoğaltılması	85
3.5.4.4. DNA Dizilerinin Analizi	90
4. BULGULAR.....	91
4.1. Hücre Kültürü Sonrası IC-ELISA ile Tiplendirme ve İn-house RT-PCR ile Alt-tiplendirme Sonuçları.....	91

4.2. DNA Dizileme Çalışmaları Sonuçları	92
4.2.1. Dizileme Amacıyla Gerçekleştirilen RT-PCR ve RT-PCR Ürünü Temizleme Çalışmaları Sonuçları	92
4.2.2. DNA Dizileme Analizi Sonuçları	93
4.2.2.1. H1N1 İzolatlarında NI Direnci	93
4.2.2.2. H1N1 İzolatlarında Adamantan Direnci	96
4.2.2.3. H3N2 İzolatlarında NI Direnci	98
4.2.2.4. H3N2 İzolatlarında Adamantan Direnci	98
5. TARTIŞMA	103
KAYNAKLAR	112
ETİK KURUL KARARI	129
ÖZGEÇMİŞ	130

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Tarihte İnfluenza Salgınları.	7
Tablo 2-2: İnfluenza A virüsünün genomik segmentleri ve kodladıkları proteinler.	10
Tablo 2-3: İn-vitro ortamda antiviral baskısıyla saptanan direnç mutasyonları.	66
Tablo 2-4: NAI tedavisi almış hastalardan alınan örneklerde saptanan direnç mutasyonları.....	67
Tablo 3-1: Alt-tiplendirilmede Kullanılan Primerler.....	75
Tablo 3-2: Dizilemede Kullanılan Primerler.	76
Tablo 4-1: 2007-2008 ve 2008-2009 Sezonları Sürveyans Sonuçları.	92
Tablo 4-2: 2007-2008 sezonunda izole edilen, H275Y Oseltamivir direnç mutasyonu taşıyan influenza A/H1N1 virüsleri ve saptandıkları iller.	96
Tablo 4-3: Tablo 4-3: 2008-2009 sezonunda izole edilen, S31N adamantan direnç mutasyonu taşıyan influenza A/H3N2 virüsleri ve saptandıkları iller.....	101
Tablo 4-4: 2007-2008 (A/H1N1), 2008-2009 (A/H3N2) grip sezonunda izole edilen influenza A virüslerinde direnç durumu.	102

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Membran glikoprotein molekülünde siyalik asidin konumu.	12
Şekil 2-2: Siyalik asit ve galaktoz arasındaki SA α 2,3Gal bağı ve nöraminidaz enziminin hedef bölgesi.	13
Şekil 2-3: Konak mRNA'sından Cap belirtecinin kesilip alınması (Cap Snatching).	15
Şekil 2-4: İnfluenza Virüslerinin replikasyon döngüsü.	18
Şekil 2-5: HA alt tiplerinin filogenetik dağılımı.	19
Şekil 2-6: H1, H2 ve H3 Hemagglütinin molekülünün kristal yapısı ve küresel membran distal bölümünün dikey görünümü.	20
Şekil 2-7: (a) H1N1 alt tipine ait HA molekülünün monomerik ünitesinin proteolitik klivajından önce (HA0) ve sonraki (HA1 ve HA2) şematik görünümü, (b) patojenitesi düşük H1N1 virüslerinin ayrılma bölgesindeki amino asit motifi (klivaj motifi).	23
Şekil 2-8: Hemagglütinin molekülünün monomerik ünitesinin nötral ve asidik pH'da geçirdiği morfolojik değişim ve H2 alt ünitesinin N terminalinde bulunan füzyon peptidinin oluşması.	25
Şekil 2-9: Nöraminidaz alt tiplerinin filogenetik dağılımı.	27
Şekil 2-10: NA molekülünün sialik asit bağlanma bölgesinin yakınlarında bulunan korunmuş rezidüler.	29
Şekil 2-11: İnfluenza virüs NA molekülüne ait polipeptidin şematik yapısı.	30
Şekil 2-12: İnfluenza A virüsünün NA molekülünün aktif bölgesinin yapısı.	30
Şekil 2-13: NA molekülünün enzimatik aktivitesi ve tomurcuklanmadaki rolü.	31
Şekil 2-14: RNP kompleksinin şematik ve elektron mikroskopik görüntüsü.	37
Şekil 2-15: Amantadin ve amantadin derivatı olan rimantadinin kimyasal yapısı.	58
Şekil 2-16: Siyalik asit (Neu5Ac) ve siyalik asit analogu zanamivirin kimyasal yapıları.	61
Şekil 2-17: Siyalik asit, oseltamivir ve zanamivirin NA molekülüne bağlanmaları.	62
Şekil 2-18: Siyalik asit ve analogu oseltamivir fosfat (GS 4071) ve oseltamivir karboksilatın (GS 4104) kimyasal yapısı. Ac= asetil.	63
Şekil 2-19: Oseltamivire karşı oluşan direncin mekanizması.	68
Şekil 4-1: 2008-2009 sezonunda izole edilen ve tamamı H3N2 olarak saptanan influenza A virüslerinden ikisine ait alt-tiplendirme sonuçları.	91
Şekil 4-2: Farklı alt-tiplerden dörder örneğe ait RT-PCR sonuçları.	93

Şekil 4-3: Oseltamivire duyarlı ve dirençli izolatların dizileme kromotogramı.	94
Şekil 4-4: H1N1 izolatlarında oseltamivir direncine neden olan 823'üncü nükleotitte C→T değişimi.....	95
Şekil 4-5: H1N1 izolatlarında oseltamivir direncine neden olan 275'inci amino asit'te H→Y değişimi.	95
Şekil 4-6: Adamantanlara duyarlı ve dirençli izolatların dizileme kromotogramı.	96
Şekil 4-7: H1N1 izolatlarında adamantan direncine neden olan 92'inci nükleotitte G→A değişimi.	97
Şekil 4-8: H1N1 izolatlarında adamantan direncine neden olan 31'inci amino asit pozisyonunda S→N değişimi.	98
Şekil 4-9: H3N2 izolatlarında adamantanlara duyarlı ve dirençli izolatların dizileme kromotogramı.....	99
Şekil 4-10: H3N2 izolatlarında adamantan direncine neden olan 92'inci nükleotitte G→A değişimi.	100
Şekil 4-11: H3N2 izolatlarında adamantan direncine neden olan 31'inci amino asit pozisyonunda S→N değişimi.	100

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

Bkz.: Bakınız

CDC: Hastalıkları Kontrol ve Önleme Merkezi (Centers for Disease Control and Prevention)

CM2: Zarf Proteini (İnfluenza C)

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

ECDC: Avrupa Hastalıkları Koruma Merkezi

EM: Elektron Mikroskobu

ER: Endoplazmik Retikulum

GISN: Küresel İnfluenza Sürveyans Ağı (Global İnfluenza Surveillance Network)

HA: Hemaglutinin

HEF: Hemaglutinin esteraz füzyon yüzey glikoproteini (İnfluenza C)

IFN: İnterferon

İBH: İnfluenza Benzeri Hastalık

KOAH: Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı

M1: Matriks Proteini

M2: İyon Kanalı Proteini

M2e: M2 Ektodomeni

MB2: İyon Kanalı Proteini (İnfluenza B)

MDCK Hücreleri: Madin Derby Köpek Böbrek Hücreleri

mRNA: Mesajcı RNA

NA: Nöraminidaz

NB: İyon Kanalı Proteini (İnfluenza B)

NEP: Nükleer Eksport Protein

NIMR: Ulusal Tıp Araştırmaları Kuruluşu (National Institute of Medical Research)

NIs: Nöraminidaz İnhibitörleri

NISN: Nöraminidaz İnhibitörleri Duyarlılık Ağı (Neuraminidase Inhibitors Susceptibility Network)

NLSS: Nükleer Lokalizasyon Sinyalleri (Nükleer Lokalizasyon Sinyalleri)

NP: Nükleoprotein

NS1 ve NS2: Yapısal olmayan protein 1 ve 2

PA: Asidik Polimeraz

PB1: Bazik Polimeraz 1

PB1-F2: Proapoptik Protein

PB2: Bazik Polimeraz 2

RNA: Ribonükleik Asit

RNP: Ribonükleoprotein

rRT-PCR: Gerçek Zamanlı Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
(Real time Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction)

RSHM: Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi

RT-PCR: Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Reverse
Transcriptase Polymerase Chain Reaction)

SA α 2,3Gal: Siyalik Asit Alfa 2,3 Galaktoz Bağı

SA α 2,6Gal: Siyalik Asit Alfa 2,6 Galaktoz Bağı

VERO hücreleri: Afrikan Yeşil Maymun Böbrek Hücreleri

VLP: Virüs Benzeri Partiküller (Viral Like Particles)

vRNA: Viral RNA

A	Ala	Alanin
R	Arg	Arjinin
N	Asn	Asparjin
D	Asp	Aspartik asit
C	Cys	Sistein
E	Glu	Glutamik asit
Q	Gln	Glutamin
G	Gly	Glisin
H	His	Histidin
I	Ile	İsolösün
L	Leu	Lösün
K	Lys	Lizin
M	Met	Metiyonin
F	Phe	Fenilalanin
P	Pro	Prolin
S	Ser	Serin
T	Thr	Treonin
W	Trp	Triptofan
Y	Tyr	Tirozin
V	Val	Valin

ÖZET

Çıplak MA. (2011). Türkiye’de İnfluenza A (H1N1, H3N2) Virüs İzolatlarında Antiviral Direnç Mutasyonlarının Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Doktora Tezi. İstanbul.

İnfluenza virüslerinin neden olduğu grip salgınları nedeniyle dünya genelinde her yıl 250 ile 500 bin kişinin yaşamlarını yitirdikleri hesaplanmaktadır. Epidemilerin yanı sıra zaman zaman yeni influenza virüslerinin dolaşıma girmesiyle yaşanan pandemilerin ise daha geniş çaplı kayıplara neden olduğu bilinmektedir. İnfluenza enfeksiyonlarından korunmak amacıyla aşılar; tedavi amacıyla da antiviraller kullanılmaktadır. Ülkemizde ilk olarak gerçekleştirilen bu çalışmada, ulusal influenza sürveyansı kapsamında 2007-2008 ve 2008-2009 grip sezonlarında İstanbul Tıp Fakültesi, Ulusal İnfluenza Referans Laboratuvarına gönderilen A/H1N1 ve A/H3N2 olarak saptanan örneklerde antiviral direnç mutasyonları araştırılmıştır. 2007-2008 sezonunda laboratuara gönderilen 524 örnekten MDCK hücre kültüründe toplam 163 (%31) influenza virüsü izole edilmiş, IC-ELISA yöntemi ile bunların 111’i (%68) influenza A, 52’si (%31) influenza B olarak tiplendirilmiştir. 2008-2009 sezonunda ise test edilen 580 örnekten toplam 62 (%10,6) influenza virüsü izole edilmiş olup, bunların 31’i (%50) influenza A, 31’i (%50) de influenza B olarak tiplendirilmiştir. 2007-2008 sezonunda izole edilen influenza A virüslerinin tümü RT-PCR ile H1N1, 2008-2009 sezonunda izole edilen A virüslerinin ise tümü H3N2 olarak alt tiplendirilmiştir. 30 adet H1N1 ve 28 adet H3N2 izolatının adamantan ve nöraminidaz inhibitörlerine karşı bilinen tüm direnç mutasyonlarını içeren bölgeleri PCR ile çoğaltıldıktan sonra dizilenmiş ve diziler CLC Main Workbench yazılımı kullanılarak National Center for Biotechnology Information (NCBI) GeneBank’taki dirençli ve duyarlı virüslerle karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak H1N1 virüslerinin %40’ında oseltamivir direncine neden olan H275Y mutasyonu, %7,1’inde adamantan direncine neden olan S31N mutasyonu saptanmışken, zanamivir direnç mutasyonu saptanmamıştır. H3N2 izolatlarında ise oseltamivir ve zanamivir direncine rastlanmazken, izolatların %85,7’sinde adamantan direncine neden olan S31N mutasyonu saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: İnfluenza, Direnç, Mutasyon, Antiviral, Sürveyans

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 3358

ABSTRACT

Çıplak MA. (2011). Investigation of Antiviral Resistance Mutations in Influenza A/H1N1 and A/H3N2 Viruses in Turkey. Istanbul University, Institute of Health Sciences. Department of Microbiology and Clinical Microbiology. PhD Thesis. Istanbul.

It is estimated that each year around 250.000 to 500.000 people die due to influenza infections in the world. In addition to epidemics, pandemics due to emerging novel influenza viruses can have more dramatic public health effects. Vaccines and antivirals are available for prevention and treatment of influenza infections. In this first study from Turkey, antiviral resistance mutations have been investigated in A/H1N1 and A/H3N2 viruses isolated during 2007-2008 and 2008-2009 influenza seasons. In 2007-2008 season, 540 samples were tested. 163 (%31) influenza viruses were isolated of which 111 (%68) were influenza A, 52 (%31) were influenza B viruses. In 2008-2009 season 580 samples were tested. 52 (%31) influenza viruses were isolated of which 31 (%50) were influenza A, 31 (%50) were influenza B viruses. All influenza A viruses from 2007-2008 season and 2008-2009 were H1N1 and H3N2 respectively by RT-PCR. N and M2 genes of 30 H1N1 isolates and 28 H3N2 isolates were partially sequenced to include all known resistance mutations against adamantanes and neuraminidase inhibitors. Then resulting sequences were analyzed with sensitive and resistant strains obtained from National Center for Biotechnology Information (NCBI) GeneBank by CLC Main Workbench Software. 40 % of H1N1 viruses carried H275Y mutation that confers resistance to oseltamivir, 7.1% of them carried adamantane resistance mutation S31N. No zanamivir resistance mutation was detected in H1N1 isolates. No mutations were detected in H3N2 isolates that conferred resistance to neuraminidase inhibitors. However, 85% of H3N2 isolates carried S31N mutation that confers resistance to adamantanes.

Key words: Influenza, Resistance, Antiviral, Mutation, Surveillance

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 3358

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Ani başlayan yüksek ateş, öksürük, halsizlik, miyalji ve baş ağrısı gibi belirtilerle karakterize olan ve toplumda hızlı yayılım göstererek salgınlara neden olabilen influenza virüs enfeksiyonları (grip), belirtisiz seyredebileceği gibi, akciğerler, kalp, beyin, karaciğer, böbrekler ve kasları da içeren farklı organların tutulumuna yol açarak kimi zaman ölümle sonuçlanan geniş kapsamlı bir hastalık tablosuna da neden olabilirler ¹. Hastalığın seyri enfekte bireyin yaşına, bağışıklık durumuna, sigara kullanıp kullanmamasına olduğu kadar, eşlik eden hastalık varlığına, gebelik durumuna ve virüsün özelliklerine bağlı olarak da değişkenlik gösterir ². Grip, çoğu zaman selim seyreden bir hastalık olmasına rağmen, doktora başvuru ve hastaneye yatışlarda artışın yanı sıra, iş gücü azalmasına ve sonuçta ekonomik kayba neden olma açısından toplumsal öneme sahip hastalıklardan biridir. Tüm dünyada her yıl erişkinlerin %20'si, çocukların %5'i semptomatik influenza enfeksiyonu geçirirken, üç ile beş milyon kişide enfeksiyon ağır seyir göstermekte ve 250 ile 500 bin kişinin yaşamını yitirdiği hesaplanmaktadır ^{2,3}.

Tüm dünyada olduğu gibi Türkiye'de de enfeksiyon sayısını, hastalığın yayılımını ve gribin neden olduğu olumsuzlukları olabildiğince azaltmak; kısaca gripten korunmak amacıyla bağışıklamadan yararlanılması öngörülmektedir. Enfeksiyonun gerçekleşmesini takiben hastalık semptomlarının şiddetini ve süresini azaltmada ise antiviral tedavi önemli rol oynamaktadır ⁴⁻⁶. İnfluenza enfeksiyonlarına karşı kullanılmakta olan onaylı anti-viraller M2 kanal inhibitörleri (amantadin, rimantadin; adamantanlar) ve nöraminidaz inhibitörleri (oseltamivir, zanamivir) olmak üzere iki grupta toplanır ⁷⁻⁹. M2 kanal inhibitörleri influenza A virüslerinin transmembran proteini olan M2 iyon kanalını bloke ederek virüsün hücre membranıyla füzyonunu, dolayısıyla hücre içine alınan virüs RNA'sının sitoplazmada serbest kalmasını engelleyerek viral replikasyonu inhibe ederler. 30 yılı aşkın bir süredir kullanımda olan bu grup antivirallere karşı artan oranda direnç geliştiği bildirilmiştir ^{10,11}. Konu ile ilgili çalışmalarda, H3N2 alt tipinin M2 geninde saptanan L26F, V27A, A30T, S31N mutasyonlarının, H1N1 alt tipinde ise V27A, G34E, A30T, S31N mutasyonlarının adamantanlara karşı direnç kazandırdığı bildirilmiştir. S31N mutasyonu 2003 yılında insanlardan izole edilen H5N1 alt tipinde de saptanmıştır ¹⁰. 2008-2009 sezonuna gelindiğinde influenza A (H3N2) virüslerinin neredeyse tamamının adamantanlara karşı

dirençli olduğu bildirilmiştir ¹². Adamantanların sadece influenza A virüslerine karşı etkili olmaları ve hızlı direnç gelişimi bilim dünyasını yeni antiviraller aramaya itmiş; bu bağlamda hem influenza A, hem de B virüslerine karşı etkili nöraminidaz inhibitörleri (NAIs) geliştirilmiş; sonuçta bu antivirallerden zanamivir ve oseltamivir 1999 yılından itibaren kullanıma girmiştir ^{5,6,13}. Nöraminidaz inhibitörleri, nöraminidaz enziminin aktivitesini bozarak, virionların hücre dışında serbest kalıp yeni hücreleri enfekte etmelerini engeller. Kullanıma girdikleri 1999 yılında nöraminidaz inhibitörlerine karşı direnç gelişimini dünya genelinde izlemek amacıyla Nöraminidaz İnhibitörleri Duyarlık Ağı (Neuraminidase Inhibitors Susceptibility Network; NISN) kurulmuştur. Günümüzde bu grup antivirallere karşı dirence neden olan birçok mutasyon bildirilmiştir. Örneğin, N1 geninde saptanan H275Y mutasyonunun, N2 molekülünde ise E119V mutasyonunun oseltamivire karşı dirençten sorumlu olduğu, E119A/D mutasyonunun ise zanamivire karşı direnç kazandırdığı bildirilmiştir. N2 molekülünde saptanan R292K, R371K, R224K, E276D mutasyonlarının ise hem oseltamivir hem de zanamivir direnci ile ilişkili olduğu bildirilmiştir ¹³⁻¹⁵. 1999 yılından bu yana sürdürülen direnç izlemi sonucunda 2007 yılının son çeyreğine kadar önemsenecek boyutta direnç gelişimi bildirilmemiştir ^{11,14,16}. Ancak, 2007 yılının başlarında Norveç'te H1N1 alt-tipinde oseltamivire karşı yüksek oranda direnç (H275Y) saptanmış olması, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından endişeyle karşılanmış ve tüm dünyada direnç takibinin önemine vurgu yapılmıştır ¹⁷. Bunun üzerine Türkiye dahil birçok ülkede oseltamivir direnç saptama çalışmaları ivme kazanmış ve direnç oranının tüm dünyada hızla arttığı gözlenmiştir.

İnfluenza virüsleri tüm dünyada her yıl tekrarlanan epidemilere, kimi zaman da yeni alt tipler söz konusu olduğunda pandemilere yol açmaktadır ^{18,19}. Özellikle 1997 yılından bu yana kuşlardan insanlara bulaşma özelliği kazanan ve yüksek oranda ölüme neden olan kuş gribi etkeni H5N1 alt tipinin insanlarda da saptanması, olası bir pandemi riskini gündeme getirmiş ve pandemi önlem ve tedavisi için tüm dünyada çalışmalar yoğunlaştırılmıştır ^{5,20}. Pandeminin toplumdaki yayılımını yavaşlatmak ve etkilerini azaltmak için aşılamanın önemi tartışılmazdır. Ancak, mevcut teknolojilerle aşı üretimi ortalama dört-altı ay kadar bir süre gerektirmektedir ve günümüzde kullanımda olan teknikler ile bir pandemi sırasında dünya nüfusuna yetecek miktarda aşı üretilmesi neredeyse imkansızdır. Bu nedenle, olası bir pandeminin ilk dönemlerinde yayılımı yavaşlatmak üzere profilaktik amaçlı kullanılacak; sonraki evrelerde ise tedavide

yararlanılacak antivirallerin kullanımı gündeme gelmiştir. Bu bağlamda, adamantanlara karşı yüksek oranda direncin saptanmış olması nöraminidaz inhibitörlerinin profilaktik ve tedavi amaçlı kullanımını gündeme getirmiş ve birçok ülke beklenen pandemiye karşı DSÖ'nün önerileri doğrultusunda başta oseltamivir olmak üzere antiviral stoklamaya başlamıştır¹³. Nitekim bu tez çalışmasının yürütülmekte olduğu Nisan 2009 döneminde Meksika'da başlayıp, iki ay gibi kısa bir süre içinde dünyanın birçok ülkesine yayılan bir influenza salgını gerçekleşmiş ve DSÖ 11 Haziran 2009 günü 21.yüzyılın ilk pandemisini ilan etmiştir²¹. Ancak, pandemiye beklenenin aksine H5N1 virüsleri değil; domuz, insan ve kanatlı influenza virüs genlerini taşıyan karma bir A/H1N1 virüsü neden olmuştur. Pandemik virüse karşı aşı eldesi çalışmaları sürerken, özellikle salgının erken dönemlerinde profilaksi ve tedavi amaçlı antiviral kullanımının gereği ortaya çıkmış; Türkiye dâhil birçok ülke stoklamış oldukları antiviralleri kullanarak pandeminin yayılımını yavaşlatabilmeyi ve aşılar devreye girene dek pandemi yönetimi için zaman kazanmayı hedeflemişlerdir. Tez konusunun kapsamında olmadığı için pandemi konusu burada ayrıntılı olarak ele alınmayacaktır.

Yukarıda vurgulanan nedenlerden dolayı, düzenli sürveyans ile bir toplumda dolaşımda bulunan influenza virüslerinin izlemi ve mevcut antivirallere karşı direnç durumlarının araştırılması önem taşımaktadır. Ülkemizde influenza sürveyansı, 2003-2004 sezonunda İstanbul Tıp Fakültesinde (İTF) başlatılmış, 2005-2006 sezonundan bu yana ise T.C. Sağlık Bakanlığı denetiminde Ankara'da Refik Saydam Hıfızısıhha Merkezinde (RSHM) yer alan Ulusal İnfluenza Merkez Laboratuvarı ile İTF'de yer alan Ulusal İnfluenza Referans Laboratuvarı tarafından yürütülmektedir. Ülkemizin coğrafik ve demografik özelliklerini temsil eden toplam 14 ilde yürütülen sürveyans kapsamında Ankara, Adana, Erzurum, Malatya, Diyarbakır, Konya, Samsun, Trabzon ve Van illeri RSHM laboratuvarına, Antalya, Bursa, Edirne, İstanbul ve İzmir illeri ise İTF Referans laboratuvarına örnek göndermektedir.

Bu tez çalışmasında, T.C. Sağlık Bakanlığı İnfluenza Sürveyansı kapsamında 2007-2008 ve 2008-2009 influenza sezonlarında İstanbul Üniversitesi, İTF, Ulusal İnfluenza Referans Laboratuvarına Antalya, Bursa, Edirne, İstanbul, İzmir illerinden influenza benzeri hastalık (İBH) ön tanısıyla gönderilen örneklerden influenza A olarak saptanan virüslerde adamantan ve nöraminidaz inhibitörlerine karşı direnç mutasyonlarının araştırılması amaçlanmıştır.

Yapılan bu çalışmanın sonucunda elde edilen verilerin ülkemizde influenza virüslerine karşı antiviral kullanımına ve pandemi hazırlık planları da dâhil olmak üzere, ulusal influenza kontrol ve korunma politikalarının geliştirilmesine katkı sağlaması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

1300'lü yıllarda İtalyanca bir sözcük olan “İnfluentia”dan türetilen influenza kelimesi, “astrolojik etkiler” anlamına gelmektedir ²². Tıp tarihine bakıldığında, asırlar öncesine ait influenza salgınlarının, etiyolojik etken ile ilgili bilgi eksikliği nedeniyle klinik ve epidemiyolojik verilerin ışığında değerlendirildiği görülmektedir. Buna göre tıp kayıtlarına geçen ilk influenza salgını M.Ö 412 yılında Hipokrat ve Livy tarafından kayıtlara geçirilmiştir ²³. 1883 yılında Hirsch, günümüzde bilindiği şekliyle influenza semptomlarının tanımlandığı ilk salgının M.S 1773-1774 yıllarında yaşandığını bildirmiş; takip eden yıllarda gözlenen epidemiler, dönemin bilim adamları tarafından ayrıntılı biçimde kaydedilmiş ve salgınlarla ilgili veriler 1889-1892 yılında yaşanan pandemiden sonra kurulan bilim komiteleri tarafından daha kapsamlı biçimde irdelenmiştir ²⁴.

Grip tablosunun, çiçek hastalığı örneğinde olduğu gibi bazı bulaşıcı hastalıklarda gözlenen özgün bir belirtisi bulunmaması nedeniyle tarihte influenza enfeksiyonlarını diğer solunum yolu enfeksiyonlarından ayırt etmek kolay olmamıştır. 1880'li yıllarda bakterilerin kültür ortamında izole edilmesi ve özellikle kolera salgınlarında *Vibrio cholera*'nın izole edilip, etken olarak saptanmasından sonra “influenza” olarak tanımlanan salgınlarının da etkeninin bir bakteri olabileceği düşünülerek araştırmalar başlatılmış, özellikle 1889 yılında yaşanan influenza salgınında etkenin izolasyonuna yönelik çalışmalar yoğunlaştırılmıştır ²⁵. İlk olarak Influenza benzeri hastalık (İBH) belirtileri gösteren hastaların bazılarında bugünkü adıyla *Haemophilus influenzae* izole edilmiş ve bu bakterinin gribin etkeni olduğu düşünülmüştür. 1900'ün başlarında filtrasyon yönteminin geliştirilmesiyle kanatlı vebası olgularından alınan örnekler filtre edilip bakterilerden arındırıldıktan sonra, deney hayvanlarına inokule edilen filtratın hastalık oluşturduğu gözlenmiştir. Bunun üzerine grip olduğu düşünülen hastalardan solunum yolu örnekleri alınıp filtre edildikten sonra benzer biçimde deney hayvanlarına inokule edilmiş ancak beklenen sonuç elde edilememiştir. Birinci dünya savaşının sonlarında üç dalga halinde tüm dünyada yaşanan pandemide, olgulardan alınan örneklerin incelenmeleri sonucunda alveol çevresinde hiyalin membran oluşumu ve alveol içi kanamayla karakterize influenzaya özgü şiddetli pnömoni saptanmıştır.

Olguların birçoğunda bakteriyel pnömونيye özgü inflamasyon gözlenmiş ve kültür çalışmaları sonucunda pnömokok, hemolitik streptokok ve *H. influenzae* gibi bakterilerin izole edildiği bildirilmiştir. 1922 yılında Medikal Araştırmalar Konseyi; İngiltere (Medical Research Council) 1918 salgınında elde edilen verilerin yeterli olmadığını, bakteriyolojik araştırmaların sonuçlarının tatmin edici bulmadıklarını duyurarak virüsler üzerine araştırmalar yapılması konusunda talimat vermiş; ABD’de Rockefeller Enstitüsü, İngiltere’de Ulusal Tıp Araştırmaları Kuruluşu (National Institute of Medical Research; NIMR) influenza enfeksiyonunun etkenini saptama konusunda yoğun çalışmalar başlatmışlardır. Farklı ülkelerdeki araştırmacılar filtrasyon ve solunum yollarından inokülasyon çalışmalarının yanısıra, deney hayvanları olarak domuz ya da gelincik modellerinden yararlanmışlardır. Bu çalışmaların sonucunda Amerika’lı bir veteriner hekim olan Richard Shope, domuzlarda influenza etkeninin bir virüs olduğunu saptamıştır ²⁶. Bu gelişmeleri takiben 1933 yılında Londra bölgesinde yaşanan önemli bir grip epidemisi sürecinde Wilson Smith adlı araştırmacı, salgının etkenini saptamak amacıyla hastalardan aldığı örnekleri filtre ederek intranazal yol dahil bir çok yolla gelinciklere inoküle etmiş; hastalığı bulaştırdığı deney hayvanları arasında enfeksiyonun salgın şeklinde yayıldığını gözlemlemiştir. Bu deneyin sonucunda etkenin ne olduğu tam olarak saptanmasa da gelincikler arasında yayılabilen ve deney hayvanlarını bağışık kılan bir virüsün varlığı kabul edilmiş; araştırmacının sonuçları 1933 yılında Lancet dergisinde Smith Wilson ve arkadaşları ²⁷ tarafından “A virüs obtained from influenza patients” başlığıyla yayınlanmıştır. Bu gelişmelerin ardından 1934 yılında Andrewes ve arkadaşları ²⁸, gelinciklerin anestezi altında daha iyi enfekte olduklarını göstermişler; başlangıçta influenza enfeksiyonuna karşı dirençli oldukları düşünülen farelerin anestezi altında enfekte edildiklerinde akciğerlerinde lezyon oluşturduklarını gözlemlemişlerdir. Daha sonraları kolay elde edilmeleri ve deneysel çalışmaların nisbeten daha kolay olması nedeniyle fare modelleri ile araştırmalar yoğunlaşmış; bu yaklaşım sonucu virüsü titre etmek, nötralizasyon testleriyle antikorları saptamak mümkün olmuştur. Bu çalışmaları takiben Stuard Harris adlı araştırmacı farelerde çoğaltıp influenza olduğu düşünülen virüsle enfekte ettiği gelinciklerin bakımını yaparken bir gelinciğin hapşırmasıyla enfekte olmuş; kendisinde grip belirtilerinin yanında etkene özgü antikor titresinde de artış gerçekleşmiştir ²⁹. Harris’in boğaz sürüntü örnekleri filtre edilip deney hayvanlarına inoküle edildiğinde

aynı enfeksiyonun bu hayvanlarda da olduğu gözlenmiştir. Böylelikle Koch İlkelerine uygun biçimde hastalık-etken ilişkisi ortaya konmuştur ²⁵.

İnfluenza virüslerinin tanımlanmasından sonra yapılan geriye dönük araştırmalar tüm pandemilerin “anası” olarak tarihe geçen ve 40 milyondan fazla can kaybına neden olduğu düşünülen 1918 pandemi etkeninin A/H1N1 influenza virüsü olduğunu göstermiştir ¹⁹. Bu gelişmelerle influenza virüsleri konusunda araştırmalar yoğunlaşmış ve virüsün epidemiyolojisi, virolojik özellikleri, oluşturduğu hastalık tablosu, neden olduğu can ve mal kayıpları oranları konusunda veriler çoğalmıştır ^{24,30,31}. Tarihte yaşanan belli başlı influenza salgınları Tablo 2.1’de özetlenmiştir.

Tablo 2-1: Tarihte İnfluenza Salgınları.

+ Pandemi, ++Pandemi, +++ Şiddetli pandemi. [Kaynak 24’ten uyarlanmıştır].

Yıl	Epidemik Şiddeti	Etkilenen Bölge	Mevsim	Kaynaklandığı Coğrafi bölge
1173-74	+	Avrupa’da gözlemlenmiş- İlk influenza epidemisi	-	-
1200-1500		Yedi salgın, detay yok	-	-
1510	++	Avrupa, Afrika	Bilinmiyor	Afrika
1557	+	Avrupa, Japonya	Bilinmiyor	Bilinmiyor
1580	+++	Avrupa, Afrika, K. Amerika	Yaz	Asya
1600-99		Beş-Sekiz salgın, detay yok	-	-
1729-33	+++	Avrupa, K ve G. Amerika, Rusya	Bahar	Rusya
1761-62	+	Avrupa, Kuzey Amerika	Kış	Bilinmiyor
1781-82	+++	Avrupa, Çin, Hindistan, Kuzey Amerika, Rusya	Sonbahar	Rusya, Çin
1788-90	+	Avrupa, Kuzey Amerika	Bilinmiyor	Bilinmiyor
1799-1802	++	Avrupa, Çin, Brezilya, Rusya	Sonbahar	Rusya, Çin
1830-33	+++	Avrupa, Çin, Hindistan, Kuzey Amerika, Rusya	Kış	Çin
1847-48	++	Avrupa, Rusya	Bahar	Asya/Rusya
1857-58	+	Avrupa, K ve G Amerika	Sonbahar	Panama
1889-91	+++	Tüm ülkeler	Bahar	Rusya
1900	+++	Avrupa, K ve G Amerika, Avustralya	Bilinmiyor	Bilinmiyor
1918-20	+++	Tüm ülkeler	Bahar	ABD/Çin
1946-48	+	Tüm ülkeler	-	Avustralya/Çin
1957-58	+++	Tüm ülkeler	Bahar/Kış	Çin
1968-69	+++	Tüm ülkeler	Yaz	Çin
1977-78	+++	Tüm ülkeler	Yaz	Rusya
2009-2010	+++	Tüm ülkeler	Bahar	Meksika

1918-1920, 1957 ve 1968 yıllarında yaşanan influenza pandemilerinin ve pandemilere göre daha hafif şiddette seyretmekle beraber her yıl tekrarlanan epidemilerin yaratmış olduğu endişe ve korku, gribi en çok araştırılan viral hastalık konumuna getirmiştir. Bu bağlamda, DSÖ influenza virüslerindeki değişim ve yayılımın takip edilerek gelecekteki salgınların tahmin edilebilmesi amacıyla, uluslararası laboratuarlardan oluşan bir influenza izlem ağı oluşturulmasını sağlamış ve tüm dünyada hekimlerin, tanı laboratuvarlarının, ilaç firmalarının ve sağlık otoritelerinin dikkatlerini influenza üzerinde yoğunlaştırmaları gereğini vurgulamıştır³².

2.2. İnfluenza Virüslerinin Sınıflandırılması

Orthomyxoviridae ailesinde yer alan influenza virüslerinin genomları tek iplikçikli, negatif polariteli ve parçalı (segmentli) RNA'dan oluşur. Influenzavirus A, Influenzavirus B, Influenzavirus C, Thogotovirus ve Isavirus bu ailede yer alan beş virüs cinsini oluşturmaktadır. Influenza A, B ve C cinslerine taksonomik olarak “tip” adı verilmiştir³³. Buna göre tip A, tip B ve tip C olmak üzere 3 tip influenza virüsü bulunur. Bunlardan tip A virüsü, nöraminidaz (NA) ve hemaglütinin (HA veya H) yüzey glikoproteinlerinin antijenik yapısına göre alt-tiplere ayrılır. Günümüzde HA molekülünün 16 (H1-H16), NA molekülünün ise dokuz (N1-N9) alt tipinin varlığı saptanmıştır³⁴. İnfluenza B ve C virüslerinin ise alt-tipleri bulunmamaktadır. İnfluenza virüslerinin adlandırılmasında sırasıyla izole edilen virüsün tipi, virüsün izole edildiği canlı türü (insandan izole edildiyse tür belirtilmez), izole edildiği coğrafik yer, suş numarası ve izole edildiği yıl belirtilir; influenza A virüsleri için en son olarak da NA ve HA antijenik tipleri de parantez içinde belirtilir. *Örnek:* 1930 yılında, Iowa eyaletinde, domuzdan izole edilen, suş numarası 15 ve alt-tipi H1N1 olan influenza A virüsü: A/swine/Iowa/15/30 (H1N1) olarak adlandırılırken, 2008 yılında İstanbul ilinde, insandan izole edilen, suş numarası 10 ve alt-tipi H3N2 olan influenza A virüsü ise: A/İstanbul/10//08 olarak adlandırılır³³.

2.3. İnfluenza Virüslerinin Yapısı ve Organizasyonu

Embriyonlu yumurta ya da doku kültürlerinde üretilen influenza A ve B virüslerinin elektron mikroskopik (EM) görüntüleri, 80-120 nm çapında düzenli sferik yapıdadır. Buna karşın, insan ve hayvanlardan izole edildikten sonra hücre kültüründe pasajlanan izolatların EM görüntüleri polimorfik olup, sferik partiküller yanında 300 nm

uzunluğunda filamenter yapılar da içerir. Filamenter yapının, virüsün M1 ve M2 proteinlerinin katkılarıyla oluştuğu ileri sürülmektedir ³⁵. Morfolojik olarak influenza A ve B virüslerini birbirlerinden ayırt etmek mümkün değildir. İnfluenza C virüsleri ise, morfolojik olarak diğer iki influenza virüsünden yüzey glikoproteininin şekil farklılığı ile ayırt edilebilir. İnfluenza C virüsleri enfekte hücre üzerinde kordon benzeri filamentöz görünümde 500 mikrometre uzunluğunda yapılar oluşturur ³⁶. İnfluenza virüsleri, %70 protein, %20 lipid ve %5-8 oranında karbonhidrat ve %0.8-1 oranında RNA içerir. Virüs enfekte hücreden tomurcuklanarak ayrılırken konak hücre zarının bir kısmını kendi üzerine alır. Konak hücre zarından alınan bu yapı “kılıf/zarf” olarak adlandırılır. Her bir influenza A virüs partikülünde kılıfın üzerinden dışarıya doğru 10-14 nm’lik çıkıntılar oluşturan, toplam sayıları 500’e varan yapılar bulunur. Bu yapılardan ikisi çubuk şeklindeki HA ve mantar şeklindeki NA molekülleridir. Her bir virionda yaklaşık olarak 4 HA molekülüne karşılık, 1 NA molekülü bulunur ^{36,37}. İnfluenza A virüs partikülü immun-EM ile incelendiğinde, zarf üzerinde bu iki yapı dışında üçüncü bir çıkıntının da bulunduğu gözlenir. Sayıları her bir virionda birkaç adet olan bu çıkıntılar, bir integral membran proteini olan M2 iyon kanalı proteinine ait çıkıntılardır. Virionda 10-20 HA molekülüne karşılık 1 M2 molekülü bulunur. Viral zarfın hemen altında ise virüsün kor bölgesini sarmalayan M1 matriks proteini bulunur. En iç kısımdaki kor adı verilen yapıyı ribonükleoprotein (ribonucleoprotein; RNP) ve nükleer eksport protein (nuclear export protein; NEP) oluşturur. NEP, “yapısal olmayan protein 2/non structural protein 2; NS2” olarak da adlandırılır ³⁷. RNP, dört farklı protein ve RNA segmentlerinin bir araya gelmesinden oluşan kompleks bir yapıdır. Her bir RNA segmenti bir nükleoprotein (NP) ve RNA’ya bağımlı RNA polimeraz (RbRp) ile kaplanmıştır. Heterotrimerik yapıdaki RNA polimeraz, bazik polimeraz 1 (PB1), bazik polimeraz (PB2) ve asidik polimeraz (PA) olmak üzere üç alt birimden oluşur ³⁷

İnfluenza B virüslerinin organizasyonu, influenza A virüsleriyle benzerlik gösterir. Ancak, influenza B virüslerinde HA, NA, NB ve BM2 olmak üzere dört adet yüzey proteini bulunur; M2 proteininin yerini NB ve BM2 proteinleri alır. İnfluenza C virüslerinde ise hemagglütinin-esteraz-füzyon (HEF) adı verilen sadece bir adet yüzey glikoproteini ve CM2 minör zarf proteini bulunur. HEF yüzey proteini influenza A ve B virüslerindeki HA ve NA fonksiyonlarına eşdeğer fonksiyon gösterir. Yani hem HA hem de NA görevi görür. İnfluenza C virüslerinde M2, NB ve BM2 moleküllerine eşdeğer bir molekül bulunmamıştır ³⁷.

2.4. İnfluenza Virüslerinin Genomik Organizasyonu

İnfluenza A ve B virüslerinin genomları sekiz segmentli, negatif polariteli, tek iplikçikli viral RNA (vRNA) yapısındadır. İnfluenza A ve B virüslerinden farklı olarak, İnfluenza C virüslerinin genomu yedi segmentlidir. İnfluenza virüslerinin RNA segmentleri içerdikleri nükleotid sayısına göre numaralandırılmıştır. Buna göre influenza A virüslerinde nükleotid sayısı en büyük (2341 nt) olan PB2 proteini 1. segmenti, nükleotid sayısı en küçük (230 nt) olan yapısal olmayan protein 1 (NS1) proteini 8. segmenti oluşturur. İnfluenza A virüsünün genomik segmentleri, kodladıkları proteinler ve işlevleri Tablo 2.2’de özetlenmiştir^{33,36}

Tablo 2-2: İnfluenza A virüsünün genomik segmentleri ve kodladıkları proteinler.

[Kaynak 33 ve 36’den uyarlanmıştır].

Segment	Segment Uzunluğu (nükleotit)	Kodlanan Protein/ Viriondaki Kopye sayısı	Protein Uzunluğu (amino asit)	Proteinin Fonksiyonu
1	2341	PB2/30-60	759	RNA polimeraz alt-ünitesi; mRNA cap tanıma işlevi
2	2341	PB1/30-60	757	RNA polimeraz alt-ünitesi; RNA uzaması, endonükleaz işlevi ile “cap snatching” görevi
		PB1-F2	87	Pro-apoptik işlev
3	2233	PA/30-60	716	RNA polimeraz al-ünitesi; proteaz işlevi
4	1778	HA/500	550	Yüzey glikoproteini, majör antijen, reseptöre bağlanma ve füzyon işlevi
5	1565	NP/1000	498	RNA bağlayıcı protein, nükleer importun regülasyonu
6	1413	NA/100	454	Yüzey glikoproteini, sialidaz işlevi ile virüsün hücreden salınması
7	1027	M1/3000	252	Matriks proteini, vRNP ile interaksiyon, RNA’nın nükleer transportunun regülasyonu, viral tomurcuklanma.
		M2/20-60	97	İyon kanalı; virüs soyunması ve yeni virionun montajı.
8	890	NS1	230	İnterferon antagonisti, konak hücre gen ekspresyonunun regülasyonu
		NS2/NEP/130-200	121	RNA’nın nükleer transportu

Tablo 2.2’de görüldüğü üzere, influenza A virüslerinde 2., 7. ve 8. segmentler ikişer protein, diğer beş segment ise birer protein kodlar. Tüm influenza virüslerinin 2. segmenti, RbRp enzim kompleksinin alt-ünitesi olan PB1 proteinini kodlar. Bununla beraber influenza A virüslerinin bazı suşlarında bu segment alternatif okuma yolunu (alternatif okuma çerçevesi/alternate reading-frame; a+1) kullanarak PB1 proteininin yanısıra 87 amino asit içeren, pro-apoptotik özelliğe sahip PB1-F2 proteinini de kodlar. İnfluenza B ve C virüslerinde PB1-F2 molekülüne eşdeğer bir molekül tanımlanmamıştır³³.

İnfluenza A virüslerinde 6. segment sadece NA proteinini kodlarken aynı segment influenza B virüslerinde NA proteinine ek olarak alternatif okuma yolu üzerinden NB matriks proteinini de kodlar. NB matriks proteini influenza A virüslerindeki M2 proteinine eşdeğerdir. 7. segment influenza A ve B virüslerinde M1 matriks proteinini kodlar. Buna ek olarak, influenza A virüslerinde M1 matriks proteinine ek olarak M2 iyon kanal proteini de RNA-bütünleşmesi (RNA-splicing) yoluyla aynı segment tarafından kodlanırken, influenza B virüslerinde BM2 membran proteini de yine alternatif yoldan, 7. gen segmenti tarafından kodlanır. Kısaca, hem influenza A hem de B virüslerinde 7. segment farklı aktivasyon yollarından yararlanarak iki ayrı protein kodlar. Ve nihayet influenza A ve B virüslerinin 8. segmenti RNA-bütünleşmesi yoluyla hem NS1 hemde NS2/NEP proteinlerini kodlar. İnfluenza C virüslerinin genom organizasyonu genel olarak A ve B virüslerine benzemekle beraber, influenza C virüslerindeki HEF proteini HA ve NA proteinlerinin yerini aldığı için bu virüslerde sekiz yerine yedi adet gen segmenti bulunur^{33,37}.

Her bir vRNA segmentinin uçları heterotrimerik RbRp polimeraz (PB1, PB2, PA) kompleksi tarafından tutulan ve saç tokasını (hair-pin) andırır biçimde helikal bir yapısal özelliğe sahiptir. vRNA segmentinin geri kalan bölümü ise yüksek oranda arjinin içeren NP ile kaplıdır. NP proteininin arjinin bakımından zengin olması bu proteine net pozitif yük kazandırır ki bu özellik, molekülün vRNA yapısında bulunan negatif yüklü fosfat grubuna bağlanmasını sağlar^{33,38}. Her bir vRNA segmentinin hem 3’ hem de 5’ ucunda kodlamayan bölgeler (non-coding regions) bulunur ve gen segmentlerinin 3’ ucunda 12, 5’ ucunda 13 nükleotid uzunluğundaki bölgeler tüm segmentlerde korunmuştur. Kısmen komplementer olan bu bölgenin bazıları eşlenerek

vRNA replikasyonunda ve transkripsiyonda promoter görevi görür. Kodlamayan bu bölgeler aynı zamanda mRNA poliadenilasyon ve montaj sinyallerini de içerir^{33,39}.

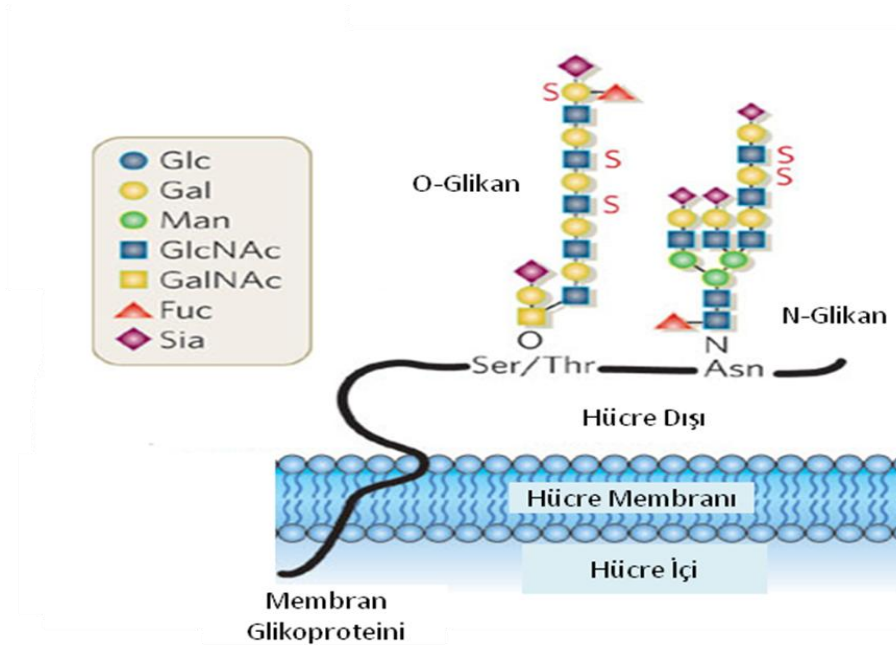
İnfluenza virüslerinin segmentli olmaları bu virüslerin kendi aralarında segment alışverişini kolaylaştırarak evrimi hızlandırır. Bu konu ilerdeki bölümlerde detaylı olarak ele alınmıştır.

2.5. İnfluenza Virüslerinin Replikasyon Döngüsü

İnfluenza virüsleri ile ilgili yapılan çalışmaların büyük çoğunluğunu influenza A virüsleri oluşturmaktadır. Bu nedenle, bu bölümden itibaren anlatılanlar aksi belirtilmediği sürece, influenza A virüslerini kapsayacaktır.

2.5.1. Virüsün Konak Hücreye Tutunması

İnfluenza virüsleri, HA molekülünün distal ucunda bulunan reseptör bağlanma bölgeleri ile konak hücre üzerinde bulunan siyalik aside (*N*-asetilnöraminik asit) bağlanırlar. Siyalik asit dokuz karbonlu bir monosakkarit olup bir çok membran glikoproteininin ve glikolipidlerin yapısında bulunan karbonhidrat yan zincirlerinin, terminal ucunda yer alır (Şekil 2.1 ve Şekil 2.2).

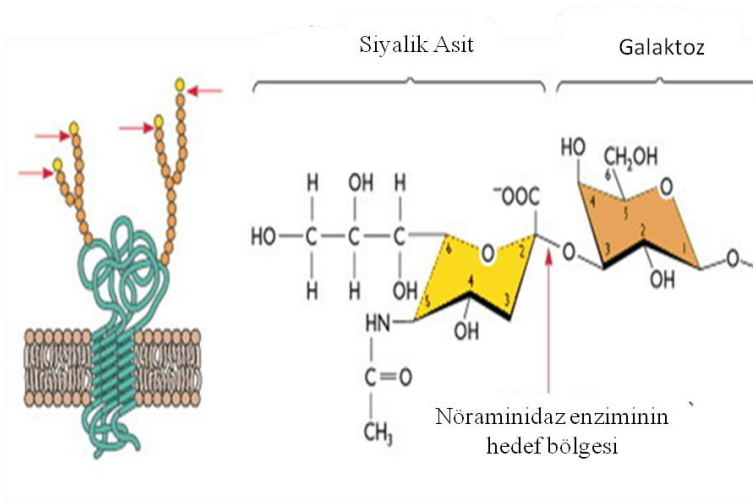


Şekil 2-1: Membran glikoprotein molekülünde siyalik asidin konumu.

Siyalik asit membran distal bölgede en uç kısımda galaktoza bağlı olarak bulunur. [Kaynak 40'dan uyarlanmıştır].

Glikoproteinler memeli hücre yapısında yaygın olarak bulunurlar. Glikoproteinlerin yapısında bulunan karbonhidrat molekülü bir motif oluşturan çeşitli monosakkaritlerden meydana gelir. Bu motifte siyalik asit kendisinden önce gelen altı karbonlu galaktoz polisakkaritine bağlı olarak terminal konumda yer alır (Şekil 2.1) Siyalik asit, galaktoza iki farklı şekilde bağlanabilir:

- 1- Siyalik asidin 2. karbonu, galaktozun 3. karbonu ile bağ kurar ($SA\alpha 2,3Gal$)
- 2- Siyalik asidin 2. karbonu, galaktozun 6. karbonu ile bağ kurar ($SA\alpha 2,6Gal$)



Şekil 2-2: Siyalik asit ve galaktoz arasındaki $SA\alpha 2,3Gal$ bağı ve nöraminidaz enziminin hedef bölgesi. [Kaynak 41'den uyarlanmıştır].

Bu bağlar siyalik asidin sterik olarak birbirinden farklı konfigürasyonu oluşturmalarını sağlar. Siyalik asidin bu iki farklı konfigürasyonu bu moleküle hangi tip HA molekülünün bağlanacağını belirler. Örneğin, insan ve klasik H1N1 domuz influenza virüsleri, $SA\alpha 2,6Gal$ siyalik asit bağınının oluşturduğu konfigürasyonu tercih ederken, kanatlı influenza virüsleri $SA\alpha 2,3Gal$ siyalik asit bağınının oluşturduğu konfigürasyonu tercih eder⁴². Bir başka deyişle, influenza HA molekülünün bu iki siyalik asit reseptöründen birini tercih etme özelliği influenza virüslerinin konak sınırını belirler.

Bu konuda yapılan ilk çalışmalarda insan trakeasında bulunan epitel hücrelerinin $SA\alpha 2,6Gal$ bağı içerdiği, $SA\alpha 2,3Gal$ bağı içermediği ileri sürülmüştür. Bu araştırmalarda insan trakeasında bulunan epitel hücrelerine, yalnızca $SA\alpha 2,6Gal$ bağına tercih eden influenza virüslerinin bağlanabileceği savunulmuştur⁴². Ancak, yakın zamanda yapılan çalışmalar insan solunum yolu epitel hücrelerinin çoğunluğunu oluşturan siliasız epitel

hücrelerinin SA α 2,6Gal bağı içerdiğini ve insan influenza A virüsleri tarafından tercih edildiğini, buna karşın daha az yoğunlukta bulunan silialı hücrelerin ise SA α 2,3Gal bağı içerdiğini ve kanatlı influenza A virüsleri tarafından tercih edildiğini göstermiştir ⁴³. Sonraki araştırmalar ise SA α 2,6Gal bağı oluşturan oligosakkaritlerin insan burun mukozası, paranazal sinüs, farinks, trakea ve bronşlarda bulunan epitel hücrelerinde yoğunlaştığını; buna karşın, SA α 2,3Gal bağı oluşturan oligosakkaritlerin ise bronş ve alveolusların kesiştiği bölgede yer alan siliyasız küboidal bronşial hücrelerinde ve alveol çeperindeki tip II hücrelerinde yoğunlaştığını bildirmiştir ⁴³. Bu nedenle 1997 yılından bu yana H5N1 avian influenza A virüsü insanda enfeksiyon oluşturabilmesine rağmen tercih ettiği siyalik asit bağı olan SA α 2,3Gal bağının üst solunum yollarında yoğunlaşmamış olması nedeniyle insandan insana kolayca bulaşabilme özelliği kazanamamıştır ⁴⁴. Sonuç olarak, H5N1 virüsü insan popülasyonu için yeni bir virüs olmasına rağmen günümüze kadar sadece sporadik enfeksiyonlar oluşturmuş ve bir epidemi ya da pandemiye yol açmamıştır. Buna karşın 1918, 1957 ve 1968 yıllarında meydana gelen pandemilerden sorumlu olan influenza A virüslerinin insanlarda üst solunum yollarında yoğunlaşan SA α 2,6Gal oligosakkaritlerini tercih ettikleri bu nedenle insandan insana hızla bulaşabildikleri kabul edilmektedir ⁴⁵. HA molekülünün reseptör bağlanma bölgeleri için bkz. bölüm 2.6.1.

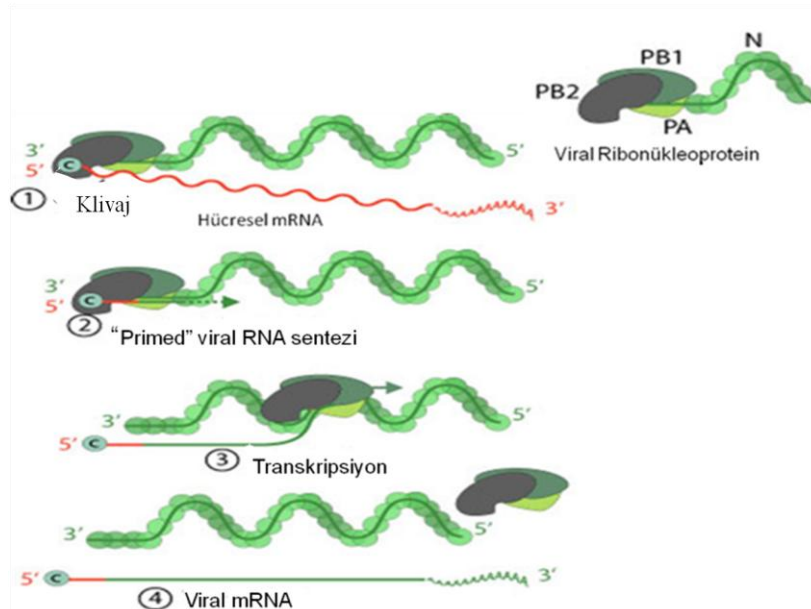
2.5.2. Virüsün Hücreye Girişi

Virüs HA molekülünün siyalik asit reseptörleri ile hücreye tutunduktan sonra reseptör aracılı endositoz yoluyla hücre içine alınır. Hücre içersine endozom içinde alınan virüsün endozomdan serbest kalıp enfeksiyonu başlatabilmesi için ortam pH'ının düşük olması gerekmektedir. Bunu sağlayan yapı virüsün M2 kanal proteindir. Endozom içindeki hidrojen iyonları (proton) M2 kanalı aracılığı ile virüs partikülüne pompalanır. Bunun sonucunda iki gelişme gözlenir: 1-Düşük pH, HA molekülünün konformasyonunda değişikliğe neden olarak HA2 bölgesindeki füzyon peptidinin açığa çıkıp aktif hale gelmesini sağlar (detaylı bilgi için bkz.2.6.1.) Aktifleşen füzyon peptidi, endozomal membran ile viral zarfın füzyonunu sağlar. 2- Virionun iç kısmında asiditenin yükselmesi protein-protein iletişimini bozarak vRNP'lerin matriks proteininden serbest kalmasına neden olur. Serbest kalan vRNPler füzyon ile açılan gözeneklerden önce sitoplazmaya, buradan da çekirdeğe geçerek enfeksiyonu başlatır ³³.

2.5.3. Viral RNA Sentezi

Yukarıda da değinildiği gibi, viriondan serbest kalan vRNP'ler nükleer lokalizasyon sinyalleri (Nuclear Localisation Signals, NLSs) ile çekirdeğe taşınırlar. Nükleer lokalizasyon sinyalleri konak hücre proteinlerini uyararak vRNP ve diğer viral proteinlerin konak hücre çekirdeğine taşınmasını sağlarlar. vRNA sentezi konak hücre çekirdeğinde gerçekleşir. vRNP yapısında bulunan trimerik viral RbRp, negatif polariteli vRNA'yı şablon olarak kullanarak iki tür RNA sentezler. Birincisi, viral proteinlerin translasyonunda kullanılacak olan mRNA, ikincisi, ara ürün cRNA ve cRNA kullanılarak sentezlenen genomik vRNA'dır.

Viral mRNA sentezi için primerlere ihtiyaç vardır ve bu primerler aşağıda açıklandığı gibi konak hücre mRNA'sından sağlanır. Transkripsiyon sonrasında konak hücre mRNA'larının 5' ucuna şapka anlamına gelen "CAP" adı verilen metilguanin molekülü, 3' ucuna ise A kuyruğu anlamına gelen "Poly A tail" adı verilen bir çok adenin trifosfat eklenir. İnfluenza virüslerinde transkripsiyon, RbRp enziminin PB2 alt ünitesinin, konak mRNA'sındaki "CAP" belirtecini tanmasıyla başlar. Bunu takiben PB1 alt ünitesi de endonükleaz aktivitesi ile konak mRNA'sından "CAP" bölgesini kesip alır (CAP snatching). Böylelikle viral mRNA transkripsiyonu başlatılmış olur (Şekil 2.3).



Şekil 2-3: Konak mRNA'sından Cap belirtecini kesilip alınması (Cap Snatching).

Viral mRNA transkripsiyonun başlangıcı sayılan bu adımda konak hücre mRNA'sının 5' ucundan 10-20 nükleotid uzunluğundaki bir bölge viral RbRp tarafından kesilip alınır. Nükleusta gerçekleşen bu süreçte, kaçırılan bölge primer olarak kullanılarak viral mRNA sentezi başlatılır. Sentezlenen viral mRNA, CAP ve Poly A kuyruğu içerir. [Kaynak 46'dan uyarlanmıştır].

Konak hücre mRNA'sından farklı olarak viral mRNA'ya poly A kuyruğu transkripsiyondan sonra eklenmez. PolyA kuyruğu, negatif polariteli vRNA'nın 5'ucundaki kodlanmayan bölgesinde 5-7 adet urasil molekülü şeklinde bulunur. vRNA polimeraz bunu pozitif polariteli mRNA'ya transkribe ederken influenza virüslerine özgü bir mekanizma ile urasil moleküllerini adenin molekülleri ile eşler; böylece polyA kuyruğu şekillenmiş olur. Poly A kuyruğu ve "CAP" ekleme işlemi tamamlanmış olan viral mRNA çekirdekten sitoplazmaya taşınarak ribozomlarda translasyonu gerçekleştirilir^{33,36}. Genomik vRNA replikasyonu viral mRNA transkripsiyonundan farklı olarak priming gerektirmez ve transkripsiyon polyA bölgesinde sonlanmaz, tüm genom transkribe edilir. Genomik vRNA'nın nükleustan taşınması NEP ve M1 proteinleri tarafından regüle edilir. M1 hem vRNA hem de NP ile iletişim kurar. Bu nedenle M1, bu iki yapıyı RNP kompleksi olarak bir araya getirir. M1 aynı zamanda NEP ile de iletişim halindedir. Bu iletişim M1-RNP kompleksinin nükleopodin aracılığı ile sitoplazmaya geçişini sağlar^{33,36,47}.

2.5.4. Viral Proteinlerin Sentezi

Viral mRNA çekirdekten sitoplazmaya taşındıktan sonra ilk olarak NP ve NS1 proteinleri sentezlenir. Çünkü daha önce de belirtildiği gibi NP replikasyon için, NS1 de immün sistemle mücadele etmek için öncelikli olarak gerekli proteinlerdir. HA, NA ve M2 zarf proteinleri ribozomlarda sentezlenip endoplazmik retikulumda katlanarak post-translasyonel modifikasyon için Golgi cisimciğine taşınırlar. Bu üç zarf proteini modifikasyon sonrası özel sinyaller aracılığı ile hücre membranına yönelirler. M1 proteini sitoplazmada sentezlendikten sonra çekirdeğe geri döner ve RNP-NEP kompleksini hücre membranına yönlendirerek membranda yerlerini almış olan HA, NA ve M2 proteinleriyle bir araya getirmek suretiyle virüsün paketlenme işlemini başlatır^{33,36,47}.

2.5.5. Viral RNA'ların Paketlenmesi ve Virionun Oluşumu

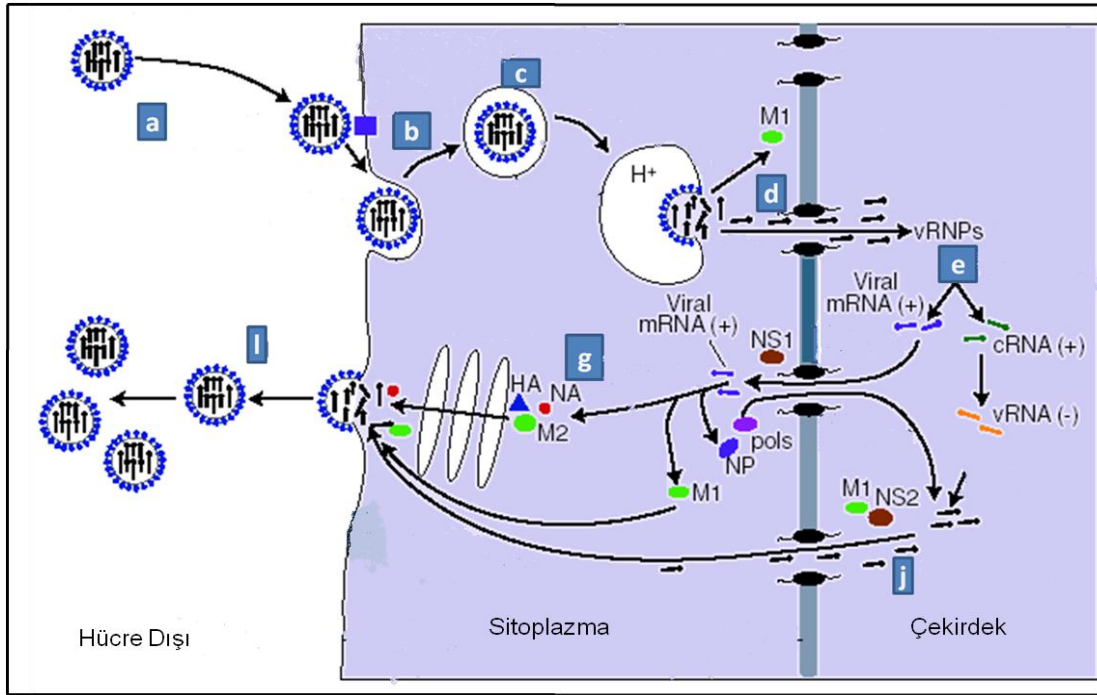
Bir influenza virionunun infeksiyöz olabilmesi için virionun tüm genomu, yani tüm RNA segmentlerini içermesi gerekir. Uzun bir süre viral RNA paketlenmesinin tamamen raslantısal bir aşama olduğu kabul edilmiştir. Bu hipoteze göre RNA segmentleri virion içine gelişigüzel bir şekilde paketlenmekte ve tüm viral genleri içeren infeksiyöz virionlar tesadüfen oluşmaktadır. Ancak, yeni kanıtlar RNA segmentlerinin virion içine yerleştirilmesinin seçici bir süreç olduğunu, vRNA üzerinde paketlenme

sinyallerinin bulunduğunu, bu nedenle oluşan yeni virionların büyük oranının tüm genomu içerdiği ve infeksiyöz olduğu yolundadır ³⁹. Yeni sentezlenmiş RNP ile bağlantı halinde bulunan M1 proteini bir yandan da HA, NA ve M2 ile ilişki kurabilmektedir. Bu ikili bağlantı M1 proteinini RNP kompleksini konak hücre membranının apikal bölgesine doğru yönlendirmesini sağlar ^{33,47}. İnfluenza virüslerinin tomurcuklanma bölgesi olarak konak hücrenin sadece apikal bölgesini tercih etmeleri bu virüslerin doku tropizmini dolayısıyla patogenezi de etkileyen bir olgudur. Örneğin, konak hücrenin lateral ya da bazal bölgelerinden tomurcuklanan virüsler sistemik yayılım göstermelerine karşın influenza virüsleri polarize hücrelerin (örneğin akciğer epitel hücreleri) apikal bölgesinden tomurcuklandıkları için sistemik enfeksiyona neden olmazlar. HA, NA ve M2 proteinlerinin konak hücrenin apikal bölgesine doğru yönlendirmelerini sağlayan mekanizmanın aydınlatılması için çalışmalar yapılmış ve erken dönem araştırmaları bu moleküllerin transmembran bölgelerinde apikal bölge sinyalleri içerdiğini göstermiştir ⁴⁸. Ancak bunu takip eden araştırmalar sadece bu sinyallerin değil, bazı ek faktörlerin de apikal tomurcuklanmayı yönlendirdiğini ileri sürmüşlerdir ⁴⁹.

2.5.6. Yeni Virionların Tomurcuklanarak Konak Hücreden Ayrılması

Yukarıda açıklandığı üzere, yeni virionlar enfekte hücrelerin polarize apikal bölgesinden tomurcuklanarak ayrılırlar; lateral ya da bazal bölgelerde tomurcuklanma gerçekleşmez. Konak hücre sitoplazmik membranının altında M1 matriks proteininin birikmesiyle tomurcuklanma başlar. Tomurcuklanma tamamlandığında HA çıkıntıları virionların hücre yüzeyindeki siyalik asitlere bağlanmasına neden olur. Hücre yüzeyine yapışan bu virionlar sialidaz aktivitesine sahip NA molekülünün, siyalik asidi bağlı bulunduğu galaktoz molekülünden kesmesiyle serbest kalır. NA molekülünün yokluğunda ya da inaktif olduğu durumlarda; ya da nöraminidaz inhibitörlerinin varlığında virionlar hücre yüzeyine yapışıp kalmakta, böylece virüsün enfektivite özelliği önemli oranda azalmaktadır. NA aynı zamanda siyalik asitleri virüs zarfından da ayırarak viral partiküllerin birbirine yapışmasını engelleyerek enfektivitelerini artırır. Bunlara ek olarak, NA solunum yollarında bulunan mucusu de parçalayarak virüsün solunum yollarında kolaylıkla ilerleyerek epitel hücrelerine girmesini sağlama yoluyla da enfektiviteyi artırır. NA'a karşı oluşan antikorlar ve NA inhibitörleri virüsün enfekte

hücreden ayrılmasını engelleyerek enfeksiyonun sonlanmasına neden olur⁴⁷. İnfluenza virüslerinin replikasyon döngüsü Şekil 2.4'te özetlenmiştir.



Şekil 2-4: İnfluenza virüslerinin replikasyon döngüsü.

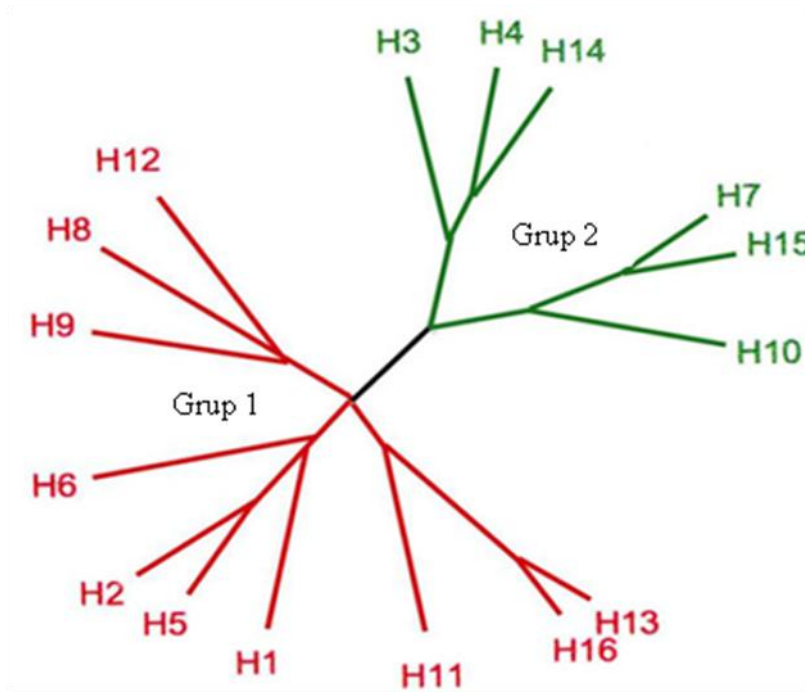
Virüs ilk önce HA molekülleri aracılığıyla konak hücredeki siyalik asit reseptörüne bağlanır (a), endositoz yoluyla hücre içine alınır (b). M2 iyon kanalı aracılığıyla sitoplazmadan endozomun içine H⁺ iyonları pompalanarak asidik ortamın oluşması sağlanır (c). Asidik ortamda HA molekülleri "cleavage bölgesinden" ikiye ayrılır ve füzyon peptitleri aktive olarak füzyonu gerçekleştirir, serbest kalan vRNP'ler nükleer porlardan geçerek çekirdeğe ulaşır (d). Çekirdekte RbRP ile gerçekleştirilen replikasyon sonucunda bir yandan mRNA bir yandan da cRNA sentezlenir; cRNA'dan da genomik vRNA sentezlenir (e). Çekirdekte sentezlenen mRNA'lar sitoplazmaya geçerek ribozomlarda proteinlere dönüştürülür. Sitoplazmada sentezlenen proteinlerden M1, NP, NS2 (NEP) ve RNA polimeraz proteinleri çekirdeğe geri dönerek genomik vRNA ile bir araya gelip bir "kor" kompleksi oluştururken HA, NA ve M2 proteinleri ise konak hücre membranına doğru yola çıkarlar (g). Çekirdekte bir araya gelen kor tekrar sitoplazmaya geçer ve HA ve NA'nın gittiği yöne doğru giderek virüs partikülünün oluşmasını sağlayarak tomurcuklanma yolu ile hücreden dışarı çıkarlar (j). Son olarak da NA oluşan bu tomurcuğu siyalik asit kalıntısından keserek yeni virüs partikülünün serbest hale gelip yeni hücreleri enfekte etmek üzere konak hücreden ayrılmasını sağlar (i). [Kaynak 47'den uyarlanmıştır].

2.6. İnfluenza A Virüslerinin Proteinleri ve Fonksiyonları

İnfluenza A virüslerine bakıldığında, HA ve NA molekülleri üzerinde en çok çalışılan yapılardır. Gerek HA gerekse NA moleküllerinin nötralizan antikolların hedefi olmaları nedeniyle bağışıklıkta önemli rol oynamaları ve günümüzde mevcut en etkili antivirallerin NA molekülünü hedeflemeleri dolayısıyla bu moleküllere bu tezde detaylı olarak yer verilmiştir.

2.6.1. Hemagglütinin (HA) Proteini

İnfluenza A virüsünün 1778 nükleotid uzunluğundaki 4 numaralı gen segmenti tarafından kodlanan hemagglütinin molekülüne bu adın verilmesinin nedeni, 1941 yılında yapılan bir çalışmada influenza virüslerinin eritrositleri aglütine etme özelliğinin gözlenmiş olmasıdır⁵⁰. HA aynı zamanda nükleotid dizilimi ilk belirlenen influenza geni özelliği de taşımaktadır⁵¹. Günümüzde serolojik olarak birbirinden farklı, yani birine karşı oluşan antikorların diğerine karşı hiç reaksiyon vermediği 16 farklı HA alt tipi saptanmıştır. Ancak bu alt tiplerin tümü yabani kanatlılarında mevcut iken ancak H1, H2 ve H3 alt tipleri insana adapte olmuştur yani insanda enfeksiyon oluşturabilmektedir. Filogenetik analiz sonucunda bu alt tiplerin iki grupta kümelandikleri gözlenmiştir (Şekil 2.5).



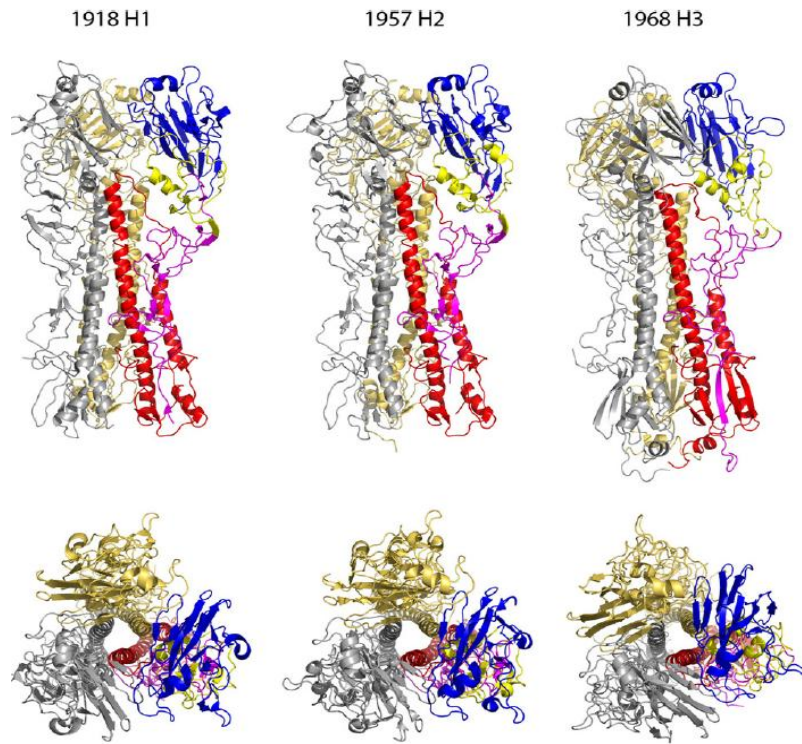
Şekil 2-5: HA alt tiplerinin filogenetik dağılımı. [Kaynak 52'den uyarlanmıştır].

Süregen bir antijenik değişim içinde olması, nötralizan antikorların ana hedefi olması ve bu nedenle de aşı çalışmalarında günümüze değin birincil molekül olma özelliğini koruması sebebiyle HA belki de influenza virüslerini ilginç kılan en önemli moleküldür.

İnfluenza A virüslerinin HA molekülünün x-ışını kristalografik yapısı 1981 yılında Wilson ve ark.⁵³ tarafından yapılan çalışma ile belirlenmiştir. Yapısı belirlenen

influenza HA molekülü, üzerinde en çok çalışılan ve model olarak kullanılan bir membran glikoproteini haline gelmiştir. Öyle ki protein katlanmaları, proteinlerin trafiği, membran füzyonu, protein-reseptör ilişkileri, antijen-antikor kompleksleri, immun sistemin yabancı proteinlere karşı tepkisi gibi birçok çalışma HA molekülü model alınarak yapılmıştır. Günümüzde influenza A virüsünün HA molekülünün birçok alt tipinin yapısı belirlenmiştir. Hatta retrospektif çalışmalarla 1918 pandemisine neden olan H1N1 virüsünün HA yapısı da tamamen ortaya konmuştur. HA molekülünde dizilim benzerliği alt-tipler içinde (örneğin H1'ler arasında) yaklaşık %97-98 (en az %70 benzerlik), alt-tipler arasında (örneğin H1 ile H2 arasında) ise en fazla %50 dolaylarındadır⁵⁴. Bu dizilim farklılıklarına rağmen HA molekülünün yapısal ve fonksiyonel özelliklerini alt tipler arasında korunmuştur³³.

İnsana adapte olmuş üç hemagglutinin molekülünün kristal yapısı Şekil 2.6'da gösterilmiştir.



Şekil 2-6: H1, H2 ve H3 Hemagglütinin molekülünün kristal yapısı ve küresel membran distal bölümünün dikey görünümü. Homo-trimer olan molekülün birinci monomeri gri, ikincisi altın-sarı renkte gösterilmiştir. Üçüncü monomer ise fonksiyonel ünitelerine göre renklendirilmiştir: mavi; reseptör bağlama bölgesi, majenta ve kırmızı; füzyon peptidi bölgesi, sarı; vestigial esteraz domeni. [Kaynak 52'den uyarlanmıştır].

HA molekülü yapısal olarak farklı iki bölgesi bulunan, çomak şeklinde bir trimerdir ⁵³. Bu iki bölgeden biri *gövde* diğeri de *gövde* üzerinde yer alan küresel yapıdaki *baş* kısmıdır. Molekülün hidrofobik olan karboksi terminal ucu viral membrana gömülü olup, hidrofilik olan amino terminal ucu (küresel bölge) ise membranın yüzeyinden dışarıya doğru çıkıntılar oluşturmaktadır. Her bir monomerin küresel bölgesi konak hücre yüzeyindeki siyalik aside bağlanan reseptör bağlama bölgelerini içerir. İnfluenza A virüslerinin SA α 2,6Gal ya da SA α 2,3Gal siyalik asit konfigürasyonunu tercih etmeleri HA molekülünün sözkonusu reseptör-bağlanma bölgesindeki amino asitlerin yapısına bağlıdır. Bu bağlamda, H2 ve H3 alt tiplerinde HA molekülünün 226 ve 228'inci noktalarındaki amino asitlerin reseptör özgüllüğünün belirlenmesinde önemli rol oynadıkları saptanmıştır. Örneğin, kanatlı virüslerinin H2 ve H3 molekülünde Q226 ve G228 amino asitleri SA α 2,3Gal oligosakkarit konfigürasyonuna bağlanma özgüllüğünü belirlerken; insan virüslerinde ise L226 ve S228 amino asitleri SA α 2,6Gal oligosakkarit konfigürasyonuna bağlanma özgüllüğünü belirlemektedir ⁵⁵. H1 alt tiplerine ait HA molekülü incelendiğinde, 190'ıncı noktadaki amino asidin reseptör özgüllüğünün belirlenmesinde rol oynadığı; insan ve domuz H1 virüslerinde D190 amino asidinin, kanatlı H1 virüslerinde ise E190 amino asidinin sırasıyla SA α 2,6Gal, SA α 2,3Gal oligosakkarit konfigürasyonuna bağlanma özgüllüğünü belirledikleri saptanmıştır ^{45,56}. H1 virüslerinde 138 ve 225'inci (H1 numaralandırma sisteminde 222'nci pozisyon) amino asitlerin de reseptöre bağlanmayı etkiledikleri düşünülmektedir. Reseptör bağlama bölgesinin tabanında yer alan Y98, W153, H183, Y195 amino asitleri ve çevresinde yer alan 130 ve 220 halkaları ile 190- α -heliks bölgeleri tüm alt tiplerde korunmuştur ⁵².

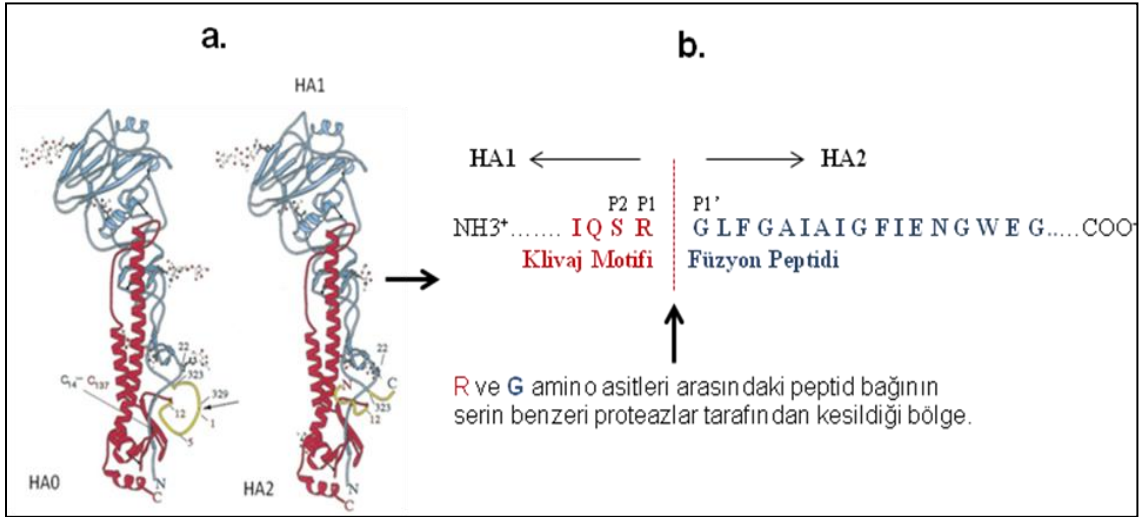
Reseptör özgüllüğünü belirleyen bir başka özellik ise HA molekülünün yapısında bulunan oligosakkarit yan zincirleridir. HA molekülleri genel olarak 5-11 glikolizasyon bölgesi içerirler. Bu glikolizasyon bölgeleri, reseptöre bağlanma afinitesini ve özgüllüğünü, antijeniteyi, virülensi, füzyon aktivitesini ve konak sınırını belirlemektedir ^{42,52,57,58}.

Molekülün küresel bölgesinde reseptör bağlama bölgesine ek olarak bir de antijenik determinant bölgesi yer almaktadır. H3 alt tipinde A, B, C, D ve E; H1 alt tipinde ise Sa, Sb, Ca1, Ca2 ve Cb olmak üzere beşer tane farklı antijenik determinant bölgeleri tanımlanmıştır ^{59,60}. HA molekülünün 10 amino asit uzunluğunda kısa bir de

sitoplazmik kuyruğu bulunmaktadır. Sitoplazmik kuyruk tüm alt tiplerde korunmuştur ve üç adet sistein molekülü içermektedir. Bu sistein moleküllerine palmitik asit eklenmesi (palmitolasyon) endosomal füzyon sırasında füzyon gözeneklerinin açılmasını sağlaması nedeniyle enfektivite açısından önem taşımaktadır ³³.

HA molekülünün üç temel görevi bulunmaktadır. *Birinci temel görevi* konak hücre yüzeyindeki siyalik asit reseptörlerine bağlanmaktır (bkz 2.5.1). Yukarıda açıklandığı gibi bu bağlantı HA molekülünün küresel baş kısmındaki reseptör bağlama bölgeleriyle gerçekleşir, bunu takiben virüs endozomal yol ile konak hücre içine alınır. HA molekülünün *ikinci önemli görevi* ise füzyon peptidi aracılığı ile viral membranla endozomal membranın füzyonunu sağlayarak vRNP'lerin sırasıyla sitoplazmaya ve çekirdeğe geçmesini sağlayıp enfeksiyonu başlatmaktır. *Üçüncü önemli görevi* de NA ve M2 membran proteinleri ile biraraya gelerek viral tomurcuklanmanın konak hücrenin apikal bölgesinde gerçekleşmesini sağlamaktır ⁵². HA molekülünün sayılan bu görevlerini yerine getirebilmesi için translasyondan sonra bazı modifikasyonlar geçirmesi gerekmektedir. Bu modifikasyonlardan en önemlileri, HA0 molekülünün konak hücre proteazları tarafından HA1 ve HA2 alt ünitelerine klivajı, glikolizasyon ve palmitolasyondur ³³.

Enfekte konak hücresinin endoplazmik retikulumunda sentezlenen HA molekülü HA0 olarak adlandırılır. HA0 molekülünün HA1 ve HA2 alt yapılarına ayrılması (klivajı/cleavage) virüsün enfeksiyöz olabilmesi için zorunludur (Şekil 2.7) ⁶¹⁻⁶³.



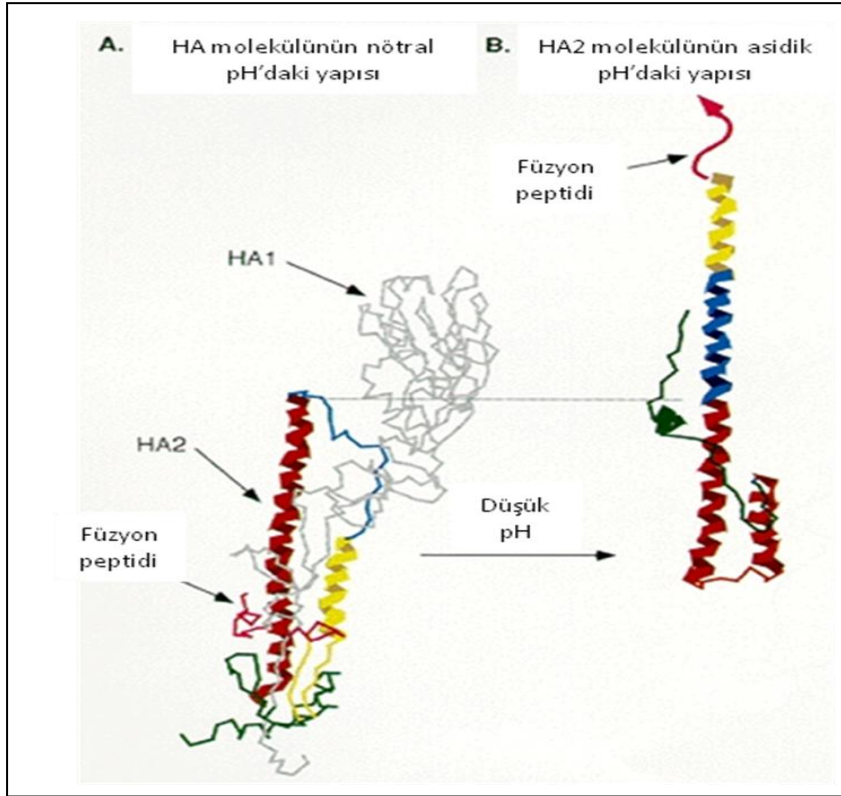
Şekil 2-7: (a) H1N1 alt tipine ait HA molekülünün monomerik ünitesinin proteolitik klivajından önce (HA0) ve sonraki (HA1 ve HA2) şematik görünümü, (b) patojenitesi düşük H1N1 virüslerinin ayrılma bölgesindeki amino asit motifi (klivaj motifi). a. Bu şekilde, viral membran şeklin alt kısmında, molekülün küresel kısmı ise membrandan dışarıda, üst kısımda yer alır. HA0 molekülündeki sarı halka görünümündeki ayrılma bölgesi (klivaj bölgesi) okla, HA1 bölümü mavi, HA2 bölümü ise kırmızı ile gösterilmiştir. b. Toplam 3.425 H1 molekülünün amino asit diziliminin Clustal W kullanılarak karşılaştırılması sonucunda klivaj motifinin (IQSR) P1 pozisyonundaki amino asidin (R-Arjinin) tüm H1 moleküllerinde korunduğu, yine aynı çalışmada bilinen 15 HA molekülünün amino asit dizilimlerinin karşılaştırılması sonucunda patojenitesi düşük tüm alt- tiplerin P1 pozisyonunda arjinin içerdikleri, ancak P2 pozisyonundaki amino asitin alt-tipler arasında farklılık gösterebileceği saptanmıştır. P1: Klivaj sonucunda N terminali tarafında (HA1) kalan ilk amino asit P1, sonra gelenler ise P2, P3...olarak adlandırılır. P1': Klivaj sonucunda C terminali tarafında (HA2) kalan ilk amino asit P1' olarak adlandırılır. [Kaynak 61, 62 ve 63'ten uyarlanmıştır].

HA0 proteininin HA1 ve HA2 alt ünitelerine ayrılma mekanizması henüz tam olarak aydınlatılmamış olmasına rağmen yapılan çalışmalar sonucunda önemli veriler elde edilmiştir. Ayrılma sonucunda birbirlerine disülfid bağıyla bağlı HA1 ve HA2 alt üniteleri oluşur; başka bir deyişle ayrılma sonucunda tamamen bağımsız iki alt ünite oluşmaz. Mevcut verilere göre HA0 molekülü ya *hücre içi proteazları* ya da *hücre dışı proteazları* tarafından HA1 ve HA2 alt ünitelerine ayrılmaktadır. Proteaz enzimleri polipeptit zincirlerindeki belirli motifleri tanırlar. Örneğin, *Hücre dışı proteazlar* serin-benzeri proteazlardır ve klivaj bölgesinde tek bir arjinin (R) residüsü içeren monobazik Q/E-X-R motifini (X- bazik olmayan herhangi bir amino asit) tanırlar ve tüm HA alt tiplerinin klivajını gerçekleştirebilirler (Şekil 2-7: b). Söz konusu hücre dışı proteazlar arasında tripsin, plazmin, pıhtılaşma faktörü-X benzeri proteazlar, trombin, urokinaz, triptaz-Clara (Clara hücrelerinden salgılanan triptaz), mini plazmin ve bakteriyel proteazlar bulunmaktadır. Ayrıca, yumurtada allantoik sıvıda bulunan pıhtılaşma faktörü-X benzeri bir proteazın da HA molekülünün klivajını gerçekleştirdiği gösterilmiştir; nitekim bu özellik influenza virüsünün embriyonlu yumurtada neden iyi ürediğinin göstergesidir. Sıçan ve farelerde triptaz-Clara'nın özelleşmiş solunum yolu

epitel hücreleri olan Clara hücrelerinden salgılandığı bilinmektedir. Ancak aynı tür bir proteazın insan ve kanatlılarda da HA klivajından sorumlu olup olmadıkları henüz bilinmemektedir ^{42,64}. *Hücre içi proteazlar* ise ayrılma bölgesinde birden fazla bazik amino asit içeren (multibazik) R/K-X-R/K-R motifini (X- bazik olmayan amino asit) tanırlar ve bu motifi taşıyan HA0 moleküllerini HA1 ve HA2 alt ünitelerine ayırıştırırlar. Örneğin, H5 ve H7 gibi patojenitesi yüksek olan avian influenza virüslerinin HA0 molekülleri ayrılma bölgesinde multibazik amino asit motifi içermektedir. Hücre içi proteazlar organizmada yaygın olarak bulunan subtilisin-ilişkili endoproteazlardır. Furin ve PC6 proteazları bu grup proteazlara örnektir. Bu hücre içi proteazlar Ca iyonlarına bağımlıdır ve Golgi cisimciğinde lokalize olmuşlardır ^{42,65,66}. Ayrılma bölgesinde multibazik motif içeren HA molekülleri endoplazmik retikulumda sentezlendikten sonra Golgi cisimciğine taşınır ve burada *hücre içi* proteazlar tarafından HA1 ve HA2 alt ünitelerine ayırıştırılırlar. Ayrılma sonucunda birbirine disülfid bağı ile bağlı HA1 ve HA2 alt birimlerinden oluşan HA molekülü oluşur. Klivaj bölgesinde monobazik motif içeren HA moleküllerinin ayrılması ise hücre membranına insersiyonu gerçekleştikten sonra ya da tomurcuklanma gerçekleştikten sonra hücre dışı konak proteazları tarafından gerçekleştirilir ⁶³⁻⁶⁵. Yukarıdaki görüşlere ek olarak, virüsün endozomal yolla hücre içine alınırken membran ilişkili mini-plazmin proteazının da endozom içine alındığı ve HA ayrılmasının endozom içinde gerçekleştiği görüşü de ileri sürülmüştür ⁶⁴. HA molekülünün ayrılma bölgesinin monobazik ya da multibazik motif içermesi virüsün doku tropizmini dolayısıyla da patojenitesini belirleyen önemli faktörlerden birisidir. Bunun nedeni iki ayrı motifi tanıyan proteazların organizmada lokalize oldukları bölgelerdir. Monobazik ayrılmayı gerçekleştiren hücre dışı proteazlar solunum yolu epitel hücrelerinde yaygın olarak bulunurlar. Bu nedenle bu tip virüsler çoğunlukla solunum yolu enfeksiyonuna yol açar, sistemik enfeksiyona neden olmazlar. Buna karşın, multibazik ayrılmayı gerçekleştiren hücre içi proteazlar konak hücrenin farklı organlarında yaygın olarak bulunur. Bunun sonucu olarak da virüs konağın çeşitli organlarına yayılarak sistemik bir enfeksiyon oluşturabilir. Yapılan araştırmalar patojenitesi yüksek olan H5N1 virüslerinin HA ayrılma bölgesinde çok sayıda bazik aminoasit bulunduğunu, buna karşın patojenitesi düşük kanatlı ve insan virüslerinde HA bölgesinde tek bir bazik amino asidin bulunduğunu göstermiştir ^{42,61,63}. Ayrılma bölgesinde bulunan amino asit motifinin yanı sıra bu bölgeye yakın yerleşim gösteren karbonhidrat yan zincirinin de patojenitede rol oynadığı bilinmektedir. Ayrılma bölgesi

karbonhidrat yan zinciri tarafından maskelendiği takdirde proteazların bu bölgeye erişimi engellenir ve HA0 alt ünitelerine ayrılamaz. Bu durumda virüsün enfektivitesi ortadan kalkar⁶⁴.

HA0 molekülünün ayrılmasıyla oluşan HA1 bölümü reseptöre bağlanma ve antijenik bölgeleri içerirken, HA2 bölümü ise füzyon peptidini içermektedir (Şekil 2.8).



Şekil 2-8: Hemaglütinin molekülünün monomerik ünitesinin nötral ve asidik pH'da geçirdiği morfolojik değişim ve H2 alt ünitesinin N terminalinde bulunan füzyon peptidinin oluşması.

[Kaynak 53'den uyarlanmıştır].

Füzyon peptidinin görevi, virüs endositoz yoluyla hücre içine alındıktan sonra viral kılıf ve endozomal membranının füzyonunu sağlamaktır. HA1 alt ünitesinin antijenik bölgeleri mutasyona açık olmasına karşın, HA2 bölgesi suşlar ve alt tipler arasında korunmuştur⁶³.

Yukarıda değinildiği gibi, HA molekülü küresel baş kısımlarında sayıları 5 ile 11 arasında değişen glikolizasyon bölgesi (kalıbı) içerirler. Bu glikolizasyon bölgelerinin, reseptöre bağlanma afinitesini ve özgüllüğünü, antijeniteyi, virülensi, füzyon aktivitesini ve konak sınırını belirledikleri ileri sürülmüştür^{57,58,67}. Glikolizasyonun insan influenza virüslerinin evrimi üzerine etkilerini araştıran Das ve

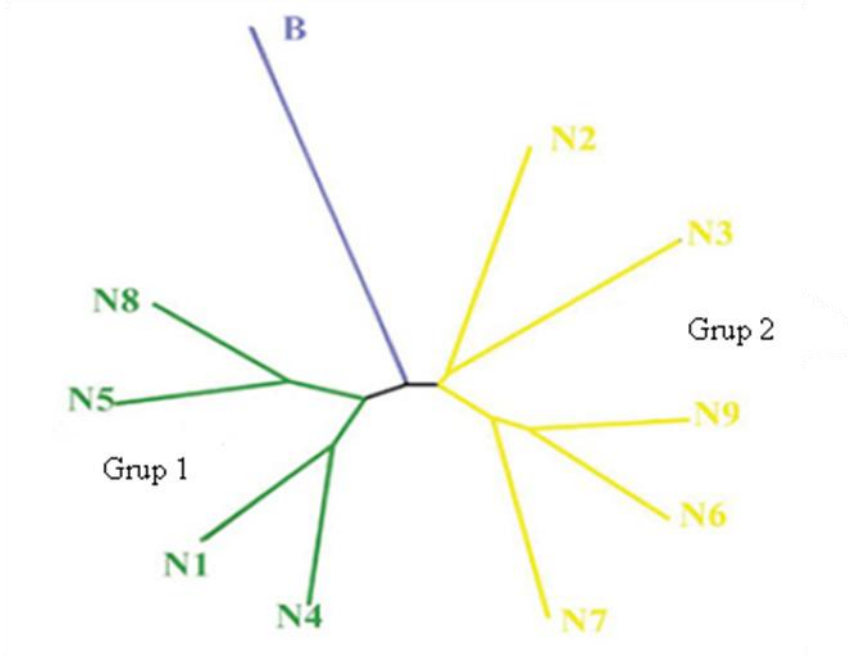
ark.⁶⁸ glikolizasyonun HA molekülünde antijenik varyasyona neden olmadığını buna karşın belirli antijenik bölgeleri örterek virüsün nötralizan antikorlardan kaçmasını sağlamak suretiyle yeni varyantların ortaya çıkmasına neden olduğunu ileri sürmüşlerdir. Günümüzde glikolizasyonun influenza virüsleri üzerine olan etkileri yoğun araştırma konusudur. Yine yukarıda da değinildiği gibi HA molekülünün alt tipler arasında korunmuş sitoplazmik kuyruğuna palmitik asit eklenmesi (palmitolasyon) füzyon gözeneklerinin oluşturulması, dolayısıyla da virüsün enfektif olması için elzemdir⁶⁹.

Nötralizan antikorların ana hedefi olması nedeniyle HA molekülü aşı çalışmalarının hedef molekülü olma konumunu korumaktadır. HA molekülünün antijenik bölgelerinde oluşan mutasyona bağlı olarak süregelen değişimler gözlenir. HA molekülünün antijenik yapısının değişmesiyle sonuçlanabilen ve virüsün evriminde rol oynayan bu mutasyonlar bölüm 2.8’de irdelenmiştir.

2.6.2. Nöraminidaz (NA) Proteini

Influenza A virüsünün 6. segmenti tarafından kodlanan NA proteini, 453 amino asidi sentezleyen 1413 nükleotit uzunluğunda bir moleküldür. NA molekülü de HA gibi bir majör viral transmembran glikoproteinidir. 1942 yılında Hirst, HA molekülünün eritrositleri agglütine ettiğini, ancak bu reaksiyonun bir süre sonra geri dönüşümünü gözlemlemiş ve influenza virüsünün yüzeyinde enzimatik aktivitesi olan bir yapının var olabileceğini ileri sürmüştür⁵⁰. 1983 yılında ise NA molekülünün 1957 ve 1967 yıllarından seçilmiş iki N2 alt tipinin kristal yapıları elde edilerek üç boyutlu yapıları ortaya konmuştur⁷⁰. Bu çalışmayla N2 polipeptit zincirlerinin katlanma şekli, alt ünitelerin ara yüzeylerinin yapıları ve glikozilasyon bölgeleri konusunda bilgiler elde edilmiştir.

Günümüzde doğal konakları yabani su kuşları olan influenza A virüslerinde serolojik olarak birbirinden farklı dokuz NA alt tipi (N1-N9) saptanmıştır. Ancak bunlardan yalnızca N1 ve N2 alt tipleri insana adapte olmuştur⁷⁰. NA molekülünün alt tiplerinin nükleotid dizilimi gerçekleştirildikten sonra yapılan filogenetik analiz sonucunda tüm NA alt tiplerinin iki grupta toplandığı gözlenmiştir (Şekil 2.9).



Şekil 2-9: Nöraminidaz alt tiplerinin filogenetik dağılımı. [Kaynak 52'den uyarlanmıştır].

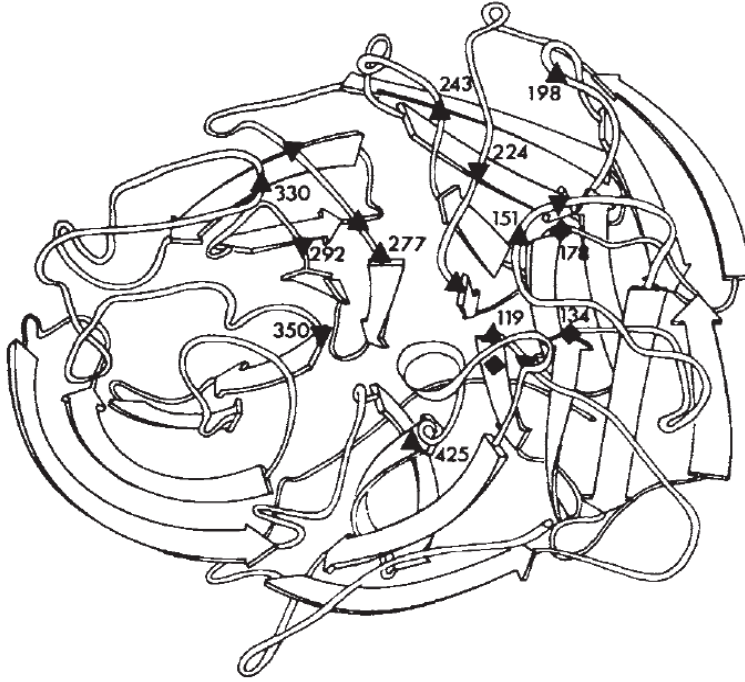
Grup 1 ve Grup 2 NA moleküllerinin aktif bölge çevresinde yapısal farklılıklar bulunmaktadır. Örneğin 1. gruptaki NA moleküllerinin aktif bölgesinin hemen yanında, aktif bölgeden kolaylıkla erişilebilir, büyükçe bir oluk yer almaktadır ki bu yapı yeni antivirallerin geliştirilmesi için fırsat yaratmaktadır. Söz konusu oluk 2. gruptaki NA moleküllerinde mevcut değildir. Bu nedenle etkin antivirallerin geliştirilebilmesi açısından NA molekülünün moleküler yapısının ortaya konmuş olması önem taşımaktadır.

NA molekülü N terminal bölgesinde bulunan 29 amino asitlik tek bir hidrofobik bölge (5-35 arasındaki rezidüler) ile viral membrana gömülüdür. Her bir NA molekülünde karbonhidratların bağlanabileceği potansiyel beş glikozilasyon bölgesi mevcuttur. Bunlar her alt üniteye 86, 146, 200, 234 ve 402'inci asparjin rezidüleridir^{33,70}. NA molekülündeki sitoplazmik kuyruğun, transmembran bölgesinin, gövdenin, baş bölgesinin ve baş bölgesinde bulunan katalitik aktif bölgenin dizilimine bakıldığında sitoplazmik kuyruğun tüm influenza A NA molekülleri arasında korunduğu gözlenmiştir. Bunun temel nedeni olarak da bu bölgenin viral montajda görevli olması ileri sürülmüştür. Ancak aynı bölgenin A ve B virüsleri arasında farklılık gösterdiği gözlenmiştir³⁶. Molekülün gövde bölgesinin diziliminin ise tüm NA alt tipleri arasında farklılık gösterdiği ve uzunluğunun da değişken olabileceği saptanmıştır. Molekülün baş kısmı alt tipler arasında %42-57; A ile B virüsleri arasında %29

oranında homoloji sergilemektedir. İnfluenza A virüsleri arasında NA molekülünün dizilim benzerliği yaklaşık olarak %50, A ile B virüsleri arasında ise yaklaşık olarak %30 dolaylarındadır ⁷¹.

Yukarıda belirtildiği üzere Varghese ve ark. ⁷⁰ birisi 1957 diğeri de 1967 yıllarına ait iki influenza A N2 molekülünü kristalize ederek üç boyutlu yapılarını ortaya koymuşlardır. Pronaz enzimi kullanılarak NA molekülünün gövdesinden ayrılan baş kısmının üç boyutlu yapısı X-ışını kristallografi yöntemi ile ortaya konmuştur ⁷⁰. Bu verilere göre NA molekülünün küresel yapıdaki baş kısmı birbirinin aynı dört alt üniteden (homotetramerik) oluşan, “mantar” görünümünde bir morfolojiye sahiptir. Dört alt ünitenin, bir başka deyişle dört polipeptid zincirinin oluşturduğu kutu şeklindeki baş kısmı dairesel 4'lü simetriye sahiptir. X-ışını kristalizasyon yöntemiyle bu simetrinin Ca iyonları tarafından stabilize edildiği gözlenmiştir. Topografik olarak incelendiğinde her bir polipeptid zincirinin altı adet antiparalel, dört zincirli β - yaprağı oluşturacak şekilde simetrik olarak katlandıkları gözlenmiştir. Bu yapılanma bir pervanenin kanatlarının organizasyonuna benzetilmektedir. β yaprakları birbirinin aynı olduğu gibi bu yaprakların birbirlerine bağlanma şekilleri de her dört monomerde de aynıdır. Bir β yaprağının diğer β yaprağına bağlandığı halka şeklindeki bölgeler antijenik ve enzimatik açıdan önemli amino asitleri içerirler ⁵⁴. N2 ve N9 moleküllerinde siyalik asidin bağlandığı katalitik bölge incelendiğinde bu bölgenin distal yüzeyde yerleşim gösteren, türler arasında değişim göstermeyen geniş bir kovuk içinde yer aldığı gözlenmiştir. Tüm influenza NA enzimlerinin katalitik bölgeleri sekiz amino asit içermektedir. Bu amino asitlerden beş tanesi siyalik asit ile direkt temas kurar. Bunlar: siyalik asidin karboksilat bölgesine bağlanan R118, R292 ve R371 amino asit rezidüleri, asetamido altünitesi ile ilişkide olan R152 amino asit rezidüsü ve siyalik asidin 8. ve 9. hidroksil gruplarıyla hidrojen bağı kuran E276 amino asit rezidüleridir ⁷². Katalitik bölgede bulunan D151, R224 ve Y406 amino asitleri ise enzim fonksiyonu için gereklidirler, ancak siyalik asit ile direkt temas kurmazlar ^{15,71}. Sekiz amino asitten oluşan katalitik bölgenin, toplam dokuz amino asit rezidüsü (E119, R156, W178, S179, D198, 1222, E227, N294, ve E425) tarafından çevrelendiği gözlenmiştir ⁷¹ (çatki rezidüleri/framework residues). Katalitik bölge çevresinde; katalitik bölge ve çatki rezidülerini de içeren toplam 18 tane amino asidin polar karakterde olduğu saptanmıştır. Bunlar: dokuz adet asidik (E119, E227, E276, E277, E425, D151, D198, D243, D330),

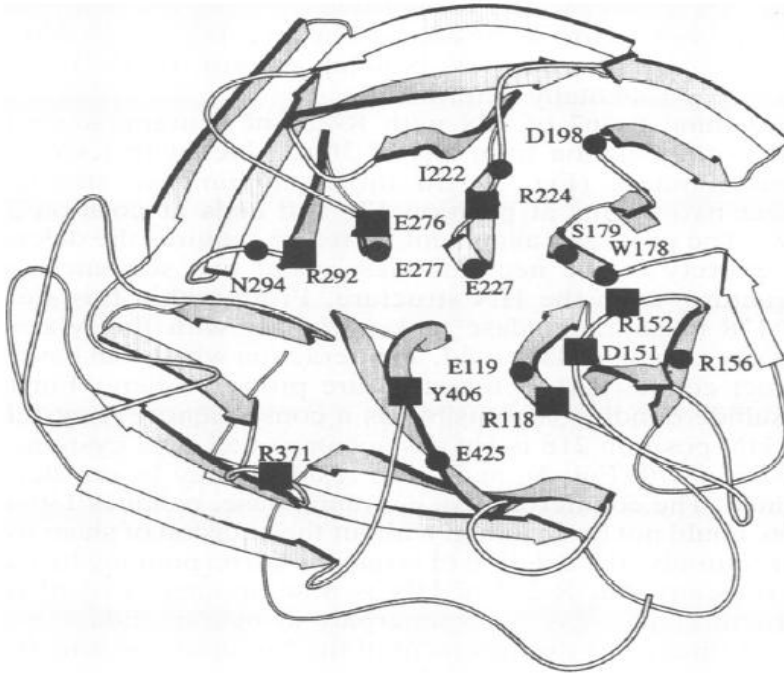
altı adet bazik (H274, R118, R152, R224, R292, K350) ve üç adet hidrofofik (Y121 ya da N1 ve B virüslerinde F121, W178, L134) rezidülerdir (Şekil 2.10).



Şekil 2-10: NA molekülünün sialik asit bağlanma bölgesinin yakınlarında bulunan korunmuş rezidüler.

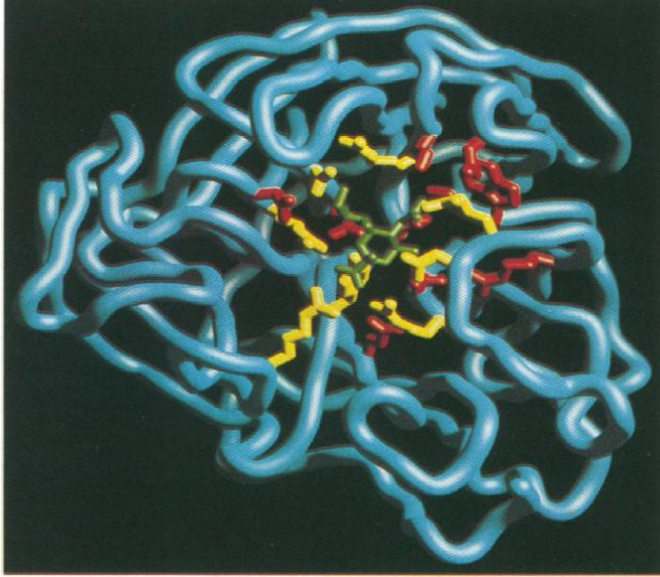
▲ E119, E227, E276, E425, D151, D198, D243, D330; ▼ H274, R118, R152, R224, R292, K350; Y121, ◆ W178, L134. N1 alt tipinde Y121 yerini F121 almıştır. [Kaynak 73'den uyarlanmıştır].

Katalitik bölgeyi çevreleyen bu amino asitlerin de bilinen tüm influenza A ve B NA alt tipleri arasında korunduğu saptanmıştır ^{36,73}. Korunmuş bölgelerin yanısıra değişkenlik gösteren amino asitlerin ise, molekülün çeşitli β zincirlerini birbirine bağlayan distal yüzey halkalarında kümелendikleri gözlenmiştir. Değişken amino asitlerin oluşturduğu bu antijenik bölgelerin, NA alt ünitesinin distal bölgesinde kesintisiz bir yerleşim gösterdikleri ve katalitik bölgeyi adeta daire içine almış oldukları gözlenmiştir. Bu antijenik amino asitlerin bazılarının enzim aktivitesinde rol oynayan, değişken olmayan amino asitlerle yanyana lokalize oldukları da gözlenmiştir. Antijenik bölgenin katalitik bölgeye bu kadar yakın olması antikorların baskısıyla katalitik bölgede herhangi bir değişimin meydana gelmediğini göstermektedir ⁷³. Nöraminidaz molekülünün katalitik ve çatki (framework) amino asit rezidülerinin şematik yapısı Şekil 2.11'de ⁷¹, katalitik bölge ve siyalik asit ilişkisi Şekil 2.12'de gösterilmiştir ⁷¹.



Şekil 2-11: İnfluenza virüs NA molekülüne ait polipeptidin şematik yapısı.

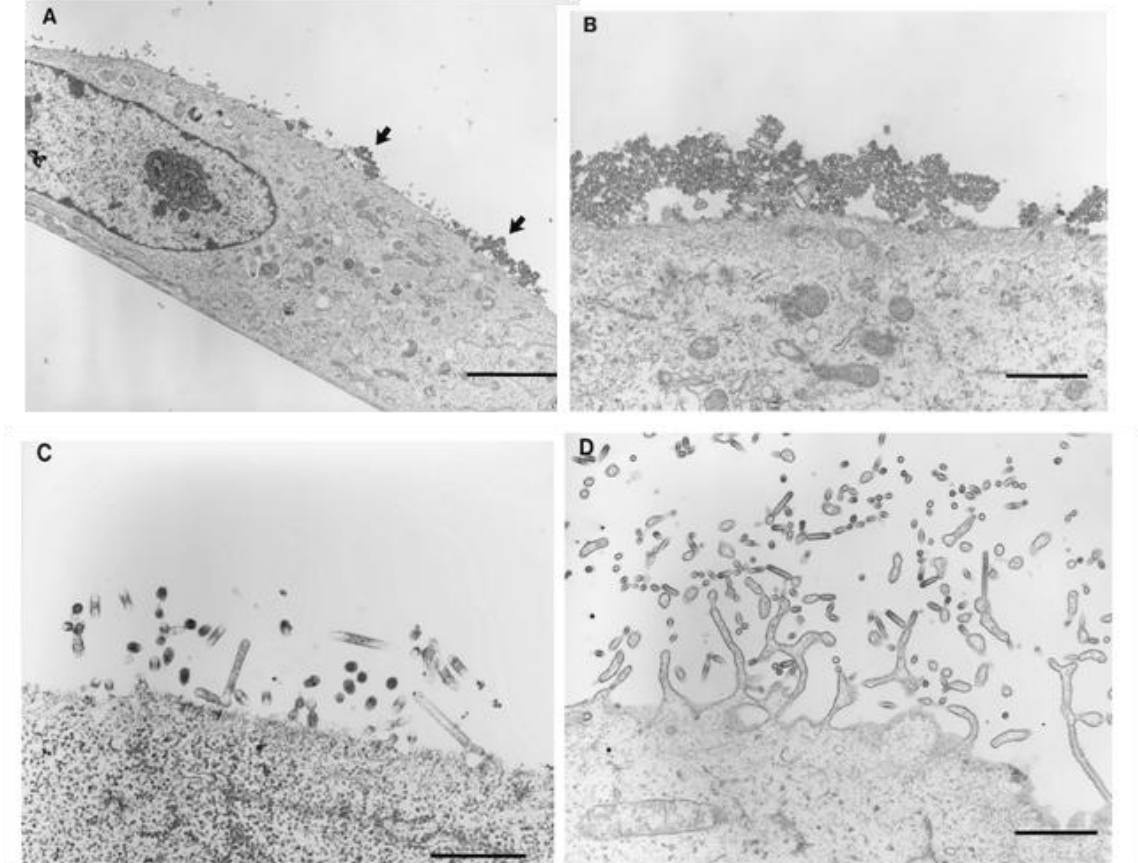
■ Tüm influenza NA tipleri arasında korunmuş katalitik bölge amino asit rezidüleri. ● Çatki (framework) amino asit rezidüleri. [Kaynak 71'den uyarlanmıştır].



Şekil 2-12: İnfluenza A virüsünün NA molekülünün aktif bölgesinin yapısı.

Şekilde gösterilen amino asitler bir istisna dışında bilinen tüm influenza A ve B virüsleri arasında korunmuştur, değişkenlik göstermez. Yalnızca D198'in yerini N7 ve N9'da N198 almıştır. Yeşil ile kodlanmış bölge siyalik asidi göstermektedir. Siyalik asit ile teması olan sarı ile kodlanmış katalitik bölgede R118, N151, R152, R224, E276, R292, R371 ve Y406 amino asitleri yer almaktadır. Bu interaksyonların hepsi polar karakterde olup sadece R224'üncü rezidü gliserol yan zincirinin lipofilik yüzeyi ile apolar temas kurar. Kırmızı ile kodlanmış E119, R156, Trp178, S179, D198, I122, E227, E277, N294 ve E425 çatki rezidüleri ise enzimin aktif bölgesini stabilize ederek siyalik aside bağlanmasını ve katalizi gerçekleştirmesini sağlar. [Kaynak 71'den uyarlanmıştır].

NA molekülünün *enzimatik* ve *antijenik* olmak üzere belli başlı iki fonksiyonu vardır. *Enzimatik* aktivitesiyle hücre yüzeylerindeki polisakkaritlerin terminal ucundaki siyalik asit ile bitişiğindeki şeker (çoğunlukla galaktoz) arasındaki α -ketosidik bağı ayırır. Böylelikle tomurcuklanma esnasında HA molekülünün siyalik aside bağlanarak hücre yüzeyine yapışıp kümelenmesini engeller, virüs partikülünün serbest kalarak komşu hücreleri enfekte etmesine yardımcı olur (Şekil 2.13).



Şekil 2-13: NA molekülünün enzimatik aktivitesi ve tomurcuklanmadaki rolü.

MDCK hücreleri fonksiyonel NA molekülüne sahip *orijinal* NWS/G70c virüsü ya da NA içermeyen *mutant* NWS-Mvi virüsü ile enfekte edildikten 10 saat sonra elde edilen elektron mikroskopik görüntüler: **A:** Düşük büyütme ile mutant NWS-Mvi virüsünün hücre yüzeyinde topaklanmasının gözlenmesi (oklar), **B:** A görüntüsünün büyük mercekle gözlenmesi, **C:** Mutant NWS-Mvi virüsünün NA ile birlikte çoğaltılması, **D:** Orijinal NWS/G70c virüsünün hücreden tomurcuklanma ile ayrılması. [Kaynak 74'den uyarlanmıştır].

Şekilde 2.13'de görüldüğü üzere ortamda fonksiyonel NA molekülünün varlığında virüs hücreden tomurcuklanarak serbest bir şekilde ayrılmakta ancak NA molekülünün yokluğunda hücre yüzeyine yapışarak topaklanmakta, kümeler oluşturmaktadır ki bu durumda virüsün komşu hücreleri enfekte edebilmesi imkansız hale gelmektedir. NA molekülünün *enzimatik fonksiyonlarından* ikincisi de solunum yollarında bulunan mucusu keserek virüsün ilerlemesini kolaylaştırmaktır³³. Özetle, NA molekülünün *enzimatik görevi* virüsün enfekte hücreden sorunsuz bir şekilde yeni hedef

hücrelere yönelmesini sağlamaktır. *Antijenik özelliği* nedeniyle NA molekülüne karşı oluşan antikorlar enfeksiyonu tam olarak nötralize edememekle beraber enfeksiyonun şiddetini azaltmada önemli rol oynar.

NA molekülünün virüsün patojenite ve konak aralığının belirlenmesinde de rol oynadığı ileri sürülmektedir. Örneğin, bazı kanatlı virüslerinin NA aktivitesi domuz ve insan virüsleri ile karşılaştırıldığında sindirim sistemindeki asidik pH'ya karşı daha dayanıklı oldukları görülmektedir. Buna ek olarak A/WSN/33 (H1N1) virüsüne ait N1 molekülündeki karbonhidrat zincirinin yokluğu virüsün nörovirülens özellik kazanmasını sağlar. Aynı zamanda NA molekülünün 146'ncı pozisyonundaki karbonhidrat zincirinin yokluğunda NA plazminojene bağlanarak molekülü etkisiz kılar. Plazmin enziminin ön molekülü olan plazminojenin inaktive edilmesi HA klivajını kolaylaştırır. Sözkonusu karbonhidrat yan zincirinden yoksun NA içeren virüslerle yapılan deneylerde virüsün fareler üzerindeki patojenitesinin arttığı gözlenmiştir ⁴².

Anlatıldığı üzere influenza virüslerinin HA ve NA moleküllerinin ikisi de hücre yüzeyindeki polisakkaritlerin terminal ucundaki siyalik asidi tanımaktadır. Ancak bu tanıma şekli iki molekülde farklıdır ⁵². HA molekülü polisakkaritlerin terminal ucundaki siyalik asidin konfigürasyonunu tanıırken, NA molekülü siyalik asit ile bitişindeki şeker molekülleri (çoğunlukla galaktoz) arasındaki α -ketosidik bağı tanır. HA gibi NA molekülü de belli tipteki siyalik asit reseptörlerini tercih eder. Örneğin kanatlı NA enzimi SA α 2,3Gal bağı keser ama SA α 2,6Gal bağı kesemez. NA molekülünün bu substrat özgülüğünü 275'inci pozisyonunda bulunan amino asidin yapısı belirler ⁷⁵. N2 molekülü insan popülasyonuna adapte olduktan sonra her iki tip siyalik asidi de kesebilme özelliği kazanmıştır.

NA molekülü yeni antivirallerin geliştirilmesi açısından öneme sahip bir molekül olma özelliğini korumaktadır. HA molekülü birinci sırada olmakla beraber NA molekülü de enfeksiyonu bloke etmeye çalışan nötralizan antikorların hedefidir. Bu nedenle antikorların baskısıyla bu moleküllerde antijenik değişimler meydana gelir ⁵². NA molekülünde meydana gelen bu antijenik değişimlere bölüm 2.8'de yer verilmiştir.

2.6.3. M2 Transmembran Proteini (İyon Kanalı Proteini)

İnfluenza A virüslerinin 1027 nükleotid uzunluğundaki 7. gen segmenti olan M geni M1 ve M2 olmak üzere iki ayrı proteini kodlar. M geninin ilk 25 nükleotidi konaktan CAP kapma (CAP snatching) yoluyla alınan hücresel mRNA kalıntılarını

içerir. Bu nedenle M geninin 26-784 nükleotidlerini içeren bölge 252 amino asit uzunluğundaki M1 proteinini kodlar. Bu kodlamada, 26, 27 ve 28. nükleotidler ATG başlangıç kodonunu; 782, 781 ve 784. nükleotidler ise TGA bitiş kodonunu oluştururlar. M2 proteini ise M geninin 26 ile 51 arasındaki (26 ve 51 dahil) nükleotitlerin kesilip 740-1007 bölgesiyle birleştirilmesi ile elde edilir. Özetle, M2 mRNA'sı 26-51+740-1007 nükleotidlerinin yamalanması şeklinde iki parça biraraya getirilerek sentezlenir ve bu yamalı mRNA'dan 97 amino asitlik M2 proteini sentezlenir ⁷⁶.

M2 proteini sinyal peptidi içermeyen, homotetramerik yapıda bir integral membran proteinidir. Viral membran yüzeyinde kısa bir ektodomen, transmembran ve fosfat ve palmitik asit eklenerek modifiye edilmiş endodomen bölgeleri bulunmaktadır. Virion başına sayıları HA ve NA molekülüne kıyasla daha düşüktür (bir virionda 20-40 kadar). Buna karşın enfekte hücre yüzeyinde sayıları oldukça yüksektir (10^6 - 10^7). Bu transmembran proteininin influenza virüslerindeki rolü amantadine dirençli ve duyarlı virüslerin incelenmesi ile ortaya konmuştur ⁷⁶. Amantadinlere dirençli ve duyarlı virüslerin incelenmesiyle bu antivirallere karşı direnç ya da duyarlılığı belirleyen bölgenin M geninde olduğu saptanmıştır. Bu bağlamda adamantanlarla tedavi edilen hayvanlardan izole edilen virüslerle hücre kültüründe adamantanlarla muamele edilen virüslerin incelenmesiyle 27, 30, 31 ve 34'üncü pozisyonlardaki amino asitlerde değişimin dirence yol açtığı saptanmıştır ^{76,77}. Takip eden çalışmalarla adamantanların M2 proteininin transmembran domenini de içeren (22-46 amino asitler) 25 amino asitle interaksiyona girdiği gösterilmiştir ⁷⁶.

İyon kanalı aktivitesine sahip olan M2 proteininin birçok görevi vardır. Temel görevlerinden biri endozomdan virüs içine H^+ pompalamaktır. Virüs içine pompalanan H^+ iyonları ortamı asidik hale getirir. Asidik ortamda RNP kompleksi matriksten ayrılarak serbest kalır ve füzyon peptidinin oluşturduğu porlardan konak hücre sitoplazmasına geçerek enfeksiyonu başlatır. M2 proteini aynı zamanda viral replikasyon sırasında klivajı endozomal proteazlar tarafından gerçekleştirilen multibazik HA moleküllerinin Golgi cisminde premature olarak konformasyon değiştirip füzyon peptidini oluşturmamasını önler. Şöyle ki, klivaj bölgesinde multibazik motif içeren H5 ve H7 gibi HA moleküllerinin klivajı trans Golgi cisminde hücre içi proteazlar tarafından gerçekleştirilir. Klivaj ile H1 ve H2 alt ünitelerine ayrılan bu HA molekülü düşük pH'a yani asidik ortama duyarlı hale gelir. Ortamın asidik olması füzyon peptidinin

oluşmasına ve böylece premature konformasyon değişikliğine neden olur. M2 proteini ortamdaki H^+ iyonlarını uzaklaştırarak bu premature değişimi engeller. Bu iki temel görevin yanında M2 proteininin tomurcuklanma esnasında vRNP'lerin tomurcuklanma bölgesine yönlendirilmesinde ve virüsün filaman şeklini almasında rol oynadığı da bilinmektedir ³³.

M2 proteini de NP protein gibi $CD8^+$ T hücrelerinin ana hedefidir. Aynı zamanda M2 ekto-domenine (M2e) karşı nötralizan olmayan ancak koruyucu antikorların oluştuğu bilinmektedir ⁷⁸. Bunun yanında, özellikle alt-tipler arasında korunmuş olması nedeniyle M molekülünün M2e bölgesi tüm influenza A virüslerine karşı etkin evrensel (universal) influenza aşı geliştirme çalışmalarının hedef molekülüne haline gelmiştir.

2.6.4. M1 Proteini (Matriks Proteini)

Yukarıda bölüm 1.6.8'de anlatıldığı üzere, influenza A virüslerinin 7. gen segmentinden sentezlenen iki proteinden biri olan matriks proteini virüsün yapısında miktar olarak en çok bulunan proteindir. Viral membranın alt kısmını kaplayacak şekilde yayılmıştır. Bu yerleşiminden dolayı virüsün iskeletinin oluşturulmasında görev alır. M1 proteini membran glikoproteinlerinin sitoplazmik kuyrukları ve RNP'ler ile bağlantı kurar. Bu nedenle bu moleküller arasında bir köprü görevi görür ³³. M1 proteininin virüs benzeri partiküllerin (viral-like proteins; VLP) oluşumu için gerekli ve yeterli olduğu gösterilmiştir. Bu özelliği nedeniyle tomurcuklanma işleminde önemli görevi olduğu kanıtlanmıştır. M2 proteininde olduğu gibi M1 proteinini de RNP ve NEP/NS2 ile interaksyona girerek bu komponentlerin nükleustan dışarı taşınıp plazma membranındaki tomurcuklanma bölgesine yönlendirdiği ileri sürülmektedir. Bu fonksiyonu yerine getirebilmek için M1 proteini nükleusta tüm RNP komponentleri sentezlendikten sonra ortaya çıkar. Böylelikle tam bir replikasyon döngüsü tamamlandıktan sonra RNP eksiksiz olarak nükleustan dışarı taşınarak tomurcuklanma bölgesine yönlendirilmiş olur.

2.6.5. RNA Polimeraz Kompleksi (RbRp)

İnfluenza virüslerinin RbRp enzim kompleksi üç farklı proteinden oluşur: PB1, PB2 ve PA. Elektron mikroskobu aracılığıyla üç boyutlu olarak incelendiğinde bu üç proteinin birbirleriyle sıkı bir şekilde bağlı oldukları gözlemlenmiştir. Protein interaksiyon çalışmaları PB1 proteininin N terminal ucu ile PA proteinine, C terminal

ucuyla da PB2 proteinine bağlandığını ortaya koymuştur. PA ve PB2 arasında herhangi bir interaksiyon saptanmamış olmasına rağmen bu iki protein arasında da henüz belirlenmemiş bir ilişkinin bulunduğu ileri sürülmektedir. Viral RNA polimeraz kompleksi hücresel RNA polimeraz II ile de etkileşim içinde olduğu bilinmektedir ⁴². Diğer tüm RbRp'lerde olduğu gibi influenza RbRp enziminin de nükleik asitlerin sentezi sırasında oluşabilecek hataları düzeltme özelliğinin bulunmamasıdır ki bu nedenle genom replikasyonunda RbRp kullanan virüsler hızla evrimleşme özelliği gösterirler ⁷⁹.

PB2 proteini 2341 nükleotid uzunluğundaki 1. gen segmenti tarafından kodlanır. Temel görevi konak hücre pre-mRNA'sındaki CAP bölgesini tanıyarak bu bölgeye bağlanmak olan PB2 proteini bu görevinden dolayı viral transkripsiyonun başlamasında kritik rol oynar ^{42,80}. PB2 proteininin CAP'a bağlanmadan sorumlu olan bölgesinin özelliğiyle ilgili farklı görüşler ileri sürülmektedir ³³. PB2, viral transkripsiyona ek olarak replikasyonda da görev almaktadır. P2 molekülünün virülens ve konak aralığının belirlenmesinde de önemli olduğu ortaya konmuştur ⁸¹. Subarro ve ark. ⁸¹ PB2 genini kanatlı virüsünden diğer tüm genlerini insan virüs suşundan alan reassortan bir virüs kullanarak yaptıkları çalışmada, bu virüsün kanatlılarda etkin bir çoğalma gösterirken memeli Madin Darby Köpek Böbrek hücrelerinde (Madin Darby Canine Kidney Cells, MDCK hücreleri) çoğalamadıklarını gözlemlemişlerdir. Bunun üzerine yapılan moleküler analizler sonucunda konak aralığını belirleyen faktörün PB2 genindeki 627. amino asit rezidüsü olduğu saptanmıştır. İncelenen tüm kanatlı virüslerinin 627. amino asit bölgesinde glutamik asit, insan virüslerinde ise lizin saptanmış olması PB2 genindeki E627K değişiminin konak aralığını belirleyen önemli bir faktör olduğunu ortaya koymaktadır ⁸¹. 2009 yılında Kuzuhara ve ark. ⁸² X-ışını kristallografik yöntemi kullanarak yaptıkları bir çalışmada PB2 molekülünün 627. amino asit pozisyonunda glutamik asit bulunması durumunda PB2'nin RNA'ya bağlanma afinitesinin azaldığı, lizin bulunması durumunda ise arttığı gözlenmiş böylece PB2 molekülünün 627. rezidüsünün fonksiyonu da açıklığa kavuşturulmuştur.

PB1 proteini 2341 nükleotid uzunluğundaki 2. gen segmenti tarafından kodlanır. Temel görevi replikasyon ve transkripsiyon sırasında RNA zincir uzaması için nükleotid eklemektir; yani polimerizasyondur ⁸⁰. PB1 proteini, RbRp'ların hepsinde bulunan korunmuş karakteristik motifleri içermektedir. Polimerizasyonu gerçekleştiren

aktif bölge 444, 445 ve 446'ıncı pozisyonlardaki S-D-D (serin-aspartik asit- aspartik asit) amino asit motifidir. Replikasyon ve transkripsiyonun gerçekleşebilmesi için PB1 hem vRNA hem de cRNA'nın terminal uçlarına bağlanmak zorundadır. PB1 proteininin vRNA'nın 3' ucu ile interaksyonu proteinin endonükleaz aktivitesini tetikler ve böylece viral mRNA sentezinin başlaması için gerekli olan "CAP primerler" konak hücre mRNA'sından elde edilir⁸⁰. Endonükleaz aktivitesi için gerekli katalitik bölge ise 508 ile 522'inci residü arasında bulunur ve zorunlu olan E508, E519 ve D522 motifini içerir³³.

PA proteini 2233 nükleotid uzunluğundaki 3. gen segmenti tarafından kodlanır. Görevi tam olarak tanımlanmamış olmasına rağmen bu proteinde meydana gelen mutasyonların hem transkripsiyon hem de replikasyonu etkilediği gözlemlenmiştir. Bu nedenle her iki aşamada da görev aldığı ileri sürülmektedir. PA proteininin proteolitik aktivitesinin olduğu da ileri sürülmektedir³³.

2.6.6. Yapısal Olmayan Protein 1 (NS1 Proteini)

890 nükleotid uzunluğundaki 8. gen segmenti tarafından kodlanır. Dimerik, nükleer bir proteindir ve çift zincirli RNA'ya (dsRNA) bağlanma özelliği vardır. Virüs hücreye girip çoğalmaya başladığı andan itibaren konağın doğal bağışıklık sistemi savunmaya geçer ki bu savunmanın en önemli yapıtaşı enfekte hücre tarafından salgılanan tip I interferondur (IFN- α/β). NS1 proteini virüs tarafından uyarılan konak IFN yanıtını baskılamaktadır. İşte bu fonksiyonundan dolayı NS1 proteinine *interferon antagonisti* de denmektedir⁴². Ancak, araştırmalar NS1 molekülünün bu özelliğinin virüsler arasında değişim gösterdiği; bazı virüslere ait NS1 molekülü potent interferon antagonisti iken diğerlerinin zayıf antagonistik etki gösterdikleri bildirilmiştir⁸³.

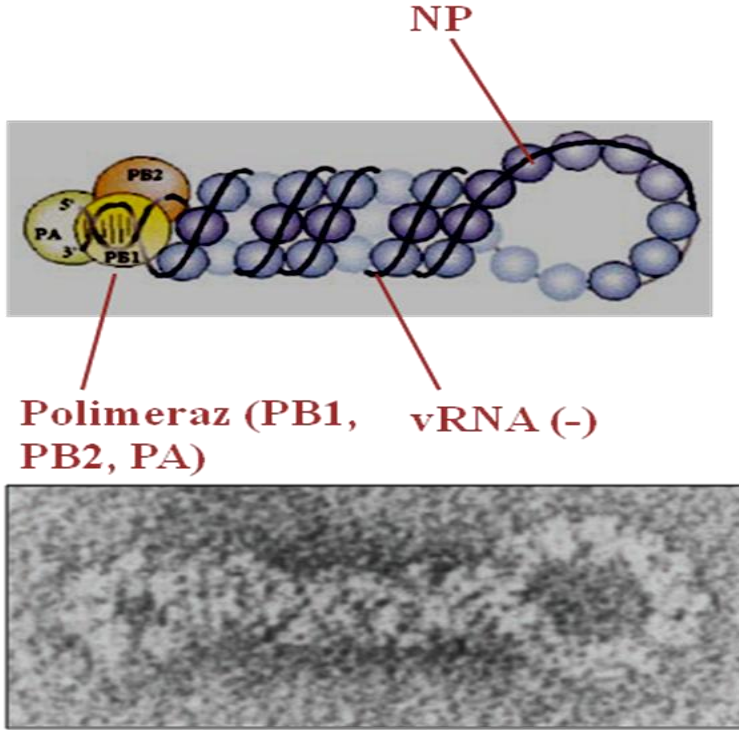
2.6.7. Yapısal Olmayan Protein 2/Nükleer Eksport Proteini (NS2/NEP Proteini)

890 nükleotid uzunluğundaki 8. segmentten kesme-ekleme yoluyla sentezlenen, 121 amino asitten oluşan bir proteindir. Eksport reseptörleri (Cm1) ve nükleoporinlerle interaksyon içinde olan NEP proteininin temel görevi, nükleusta RNP-M1-NEP/NS2 kompleksi oluşturarak bu kompleksin çekirdekten eksportunu sağlamaktır⁴².

2.6.8. Nükleoprotein (NP)

2565 nükleotid uzunluğundaki 5. gen segmenti tarafından sentezlenir. Viral RNA ve polimeraz kompleksi ile biraraya gelerek RNP kompleksini oluşturur (Şekil

2.14). NP yapısında bulunan nükleer lokalizasyon sinyalleri sayesinde RNP'nin nükleus içine transportu (import) gerçekleştirilir. Bu sinyallerin NP molekülünün N-terminal bölgesinde lokalize olduğu bilinmektedir³³.



Şekil 2-14: RNP kompleksinin şematik ve elektron mikroskopik görüntüsü. [Kaynak 84'ten uyarlanmıştır].

2.7. İnfluenza Virüslerinde Evrim

Bilinen tüm HA ve NA alt tiplerinin kanatlılarda saptanmış olması ve filogenetik analiz sonuçları tüm memeli influenza virüslerinin kanatlı virüs havuzundan türediği hipotezini doğrumuştur. Kanatlı influenza virüslerinde evrim oranı hem nükleotid düzeyinde hem de amino asit düzeyinde memeli virüslerine kıyasla oldukça düşüktür. Örneğin yabani su kuşlarında bu virüsler bir evrimsel durağanlık (stazis) gösteriler ki bu durum sözkonusu virüslerin konaklarına optimum düzeyde adapte olduklarını göstermektedir⁶³. Ancak, bu evrimsel staz kanatlı virüslerinde mutasyonların gerçekleşmediği anlamına gelmez. Aksine, mutasyonlar kanatlılarda da aynı sıklıkta gerçekleşebilir; ancak amino asit substitüsyonları virüse seçici bir avantaj sağlamadığı için meydana gelen mutasyonlar amino asit değişikliğiyle sonuçlanmaz. Buna karşın tüm kara kanatlıları ve memeli influenza virüslerinde amino asit değişimleri birikme eğilimi gösterir⁴². İnsan influenza virüslerinin segmentleri arasında da evrim oranı farklılık gösterir. Örneğin, H3 molekülünde evrim oranı PB2, PB1, PA, NP ve M1

segmentelerinin evrim oranından yüksektir ⁴². HA molekülünde evrim oranının yüksek olması, HA geninde meydana gelen mutasyonların oluşan varyantlara konak immün sisteminden kaçabilme üstünlüğü kazandırarak pozitif seleksiyonla seçilmeleri ile açıklanabilir. İnsan popülasyonunda eşit yaygınlıkta bulunan influenza B ve A virüsleri karşılaştırıldığında da aynı gen segmentlerinde evrim hızının influenza A virüslerinde B virüslerine oranla iki-üç kat daha fazla olduğu görülmektedir. Bu durum, konak immün sisteminin influenza A virüsleri üzerine olan pozitif seleksiyonuna atfedilmiştir. Ancak, Nobusawa ve arkadaşları ⁸⁵, NS proteinini baz alarak yaptıkları bir çalışmanın verilerine dayanarak iki virüs arasındaki evrim hızı farkının mutasyon oranlarından kaynaklanabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Influenza virüslerinde genetik çeşitliliği sağlayarak evrimini hızlandıran üç temel mekanizma bulunmaktadır: *nokta mutasyonlar, harmanlanma ve rekombinasyon*.

2.7.1. Nokta Mutasyonlar

Influenza virüslerinin yüksek mutasyon oranlarının en önemli nedenlerinden biri, virüsün sahip olduğu RbRp enziminin özelliğidir. Viral RNA genomunun replikasyonundan sorumlu olan RbRp enzimleri hata yapmaya yatkın özelliğe sahiptirler. Bu tür polimerazların, genom replikasyonu sırasında gerçekleşebilecek hataları düzeltme (proof-reading) özelliği bulunmamaktadır ⁷⁹. Bu nedenle, influenza virüslerinin her replikasyon siklusunda genoma hatalı eklenen nükleotidler (örneğin A yerine T eklenmesi gibi) nokta mutasyonların oluşmasına neden olmaktadır. Hata oranları influenza virüslerinde her baz çifti başına $7,3 \times 10^{-5}$, replikasyon başına (genom başına) ≈ 1 olarak saptanmıştır ⁸⁶.

Nokta mutasyonlar ölümcül olabildiği gibi nötral ya da virüse avantaj sağlayan mutasyonlar da olabilirler. Nötral mutasyonlar zamanla birikerek virüse avantaj sağlayan mutasyonlara dönüşebilirler. Tüm viral segmentlerde nokta mutasyonlar gerçekleşebilmektedir.

Nokta mutasyonlar insan popülasyonunda dolaşımda bulunan influenza virüslerinin HA ve/veya NA molekülünün antijenik bölgelerinde meydana geldiğinde virüsün epidemiyolojik özelliğini değiştiren antijenik sürüklenmeye (antigenic drift) neden olabilirler. Antijenik sürüklenme konusuna, 2.8. bölümünde yer verilmiştir.

2.7.2. Harmanlanma (Reassortment)

Harmanlanma” aynı hücreyi enfekte eden iki ya da daha fazla farklı influenza virüsünün genleri arasında gerçekleşen alış-veriş anlamına gelmektedir. Harmanlanma sonucunda meydana gelen yeni virüs, ebeveyn virüslerden tamamen farklı genetik yapıya sahip olabilmektedir. Örneğin, harmanlanma sonucunda virülensi belirleyen genleri taşıyan, patojenitesi yüksek virüsler ortaya çıkabilmektedir.

Harmanlanma ancak aynı tip virüsler arasında gerçekleşebilir. Örneğin, influenza A virüsleri ancak influenza A virüsleriyle harmanlanabilirler, B virüsleri ile harmanlanamazlar. İki virüsün harmanlanması sonucunda birbirinden farklı 256 varyant oluşma olasılığı bulunmaktadır. 1957 ve 1968 pandemilerine bazı genlerini (HA, PB1, NA, HA) kanatlılardan alan harmanlanmış insan influenza virüsleri yol açmıştır. 1997 yılından beri insanlarda da yüksek oranda ölümle seyreden enfeksiyona neden olan H5N1 virüsleri de kanatlı virüslerinin birçok kez harmanlanması sonucu ortaya çıkmıştır ⁴². Son yıllarda insan, domuz ve kanatlı virüs genlerini taşıyan üçlü harmanlanmış virüslerin Kuzey Amerikan domuz popülasyonunda yaygın hale gelmesi ve nitekim zaman içinde PB1 genini insan H3N2 virüslerinden, PB2 ve PA genlerini Kuzey Amerika kanatlı virüslerinden, M ve NA genlerini Avrasya domuz virüslerinden ve nihayet HA, NP ve NS genlerini de Kuzey Amerika domuz virüslerinden alan üçlü harmanlanma sonucunda oluşan H1N1 virüslerinin 2009 pandemisine neden olmuş olması harmanlanmanın önemini bir kez daha ortaya koymuştur ⁸⁷.

Harmanlama sonucunda tamamen yeni HA ve/veya NA genlerine sahip virüsler oluşabilmektedir. HA ve NA genlerindeki bu değişim sonucunda antijenik özelliği tamamen farklı, dolayısıyla da epidemiyolojik özelliği farklı yeni virüsler ortaya çıkabilmektedir ⁸⁸. Antijenik kayma (antigenic shift) olarak adlandırılan bu değişime 2.8 bölümünde yer verilmiştir.

2.7.3. Rekombinasyon

Rekombinasyon, influenza virüsünün gen segmentlerinden birinin, diğer gen segmentlerinden bölümler içermesi olarak tanımlanır. Oluşan rekombine genin biyolojik özellikleri de değişir. Örneğin, rekombinasyon sonucu HA gen segmentine NP geninden bir bölüm aktarıldığında HA molekülünün klivajının kolaylaştığı gözlenmiştir. Son yıllarda rekombine olarak tanımlanan virüslerin sayısında saptanan artış, rekombinasyonun sıklıkla gözlenen bir olgu olduğunu ancak rekombine virüslerin

biyolojik uyumun düşük olması nedeniyle saptanmalarının güç olduğunu ortaya koymaktadır ⁴².

2.8. İnfluenza Virüslerinin Epidemiyolojisinde Rol Oynayan Genetik Değişimler

“*Harmanlanma ve antijenik kayma*” ile “*nokta mutasyonlar ve antijenik sürüklenme*” kavramları birbirlerinin yerine kullanılagelmiştir. Ancak, *harmanlanma* genetik bir olgu, *antijenik kayma* ise epidemiyolojik bir olgudur. Şöyle ki, yukarıda da değinildiği üzere harmanlanma virüsler arasında gerçekleşen bir gen alışverişi durumudur. Ancak, eğer harmanlanma, insan popülasyonunda dolaşımda bulunan virüsler arasında gerçekleşir, ve bunun sonucunda HA ve/veya NA genleri dolaşımdaki virüsten tamamen farklı virüsler oluşursa; ya da HA ve/veya NA genleri insan popülasyonunda dolaşımda olan virüslerden tamamen farklı virüsler dolaşıma girer ise (örneğin kanatlı virüslerinin insan popülasyonunda dolaşıma girmesi), işte o zaman *antijenik kaymadan* bahsedilebilir. Bu durumda insan popülasyonunda var olan nötralizan antikorlar, antijenik yapısı tamamen farklı olan bu yeni virüsü nötralize etme yeteneğinden tamamen yoksun olacakları için şiddetli epidemiler ve pandemiler gerçekleşebilmektedir. *Nokta mutasyon* ve *antijenik sürüklenme* arasında da aynı ilişki sözkonusudur. Nokta mutasyonlar insan popülasyonunda dolaşımda bulunan virüslerde gerçekleşip antijenik değişimle sonuçlandığında *antijenik sürüklenmeden* söz edilebilir. Bu durumda da popülasyonda var olan nötralizan antikorlar değişime uğramış bu yeni antijeni kısmen nötralize edebilmekle beraber yeterli koruma sağlayamaz. Bunun sonucunda da epidemiler daha şiddetli seyredebilir, aşılarda etkinliğinde azalma gözlenebilir.

2.8.1. Antijenik Sürüklenme (Antigenic Drift)

İnfluenza A ve B virüslerinde nokta mutasyonları sonucunda meydana gelen “antijenik drift”, NA ve HA genlerinde oluşan, minör, kademeli antijenik değişimler olarak tanımlanır. Memelilerde influenza A virüs drift varyantları, kendiliğinden (spontan) oluşan mutantların nötralizan antikorlar tarafından pozitif seleksiyonla seçilmesi sonucunda 2-8 senelik aralıklarla oluşur ⁸⁹. Oluşan bu varyantlar, ebeveyn virüse karşı oluşan antikorlarla nötralize edilemezler. Antijenik drift, insan virüslerine kıyasla daha düşük oranda olmakla beraber, kara kanatlılarına ait virüslerde de gözlenmektedir. İnsan influenza virüslerinin HA ve NA genlerinin amino asit dizilimlerinde mutasyonların görülme sıklığı yılda %1’den azdır. Buna rağmen,

antijenik drift varyantları epidemilere neden olabilir ve bir başka varyant etkin olana kadar 2 ile 5 sene boyunca etkinliklerini sürdürebilirler ⁴². Antijenik drift nedeniyle influenza aşı içeriği her yıl dolaşımda bulunan influenza virüs varyantları saptandıktan sonra belirlenmekte ve yeni varyantlar saptandığı durumlarda aşı içeriği değiştirilmektedir.

2.8.1.1. HA Molekülünde Antijenik Sürüklenme

HA molekülü influenza virüslerinin majör antijenidir. X-ışınları kristallografisi, karşılaştırmalı dizi analizleri ve immün sistemden kaçan mutantların (escape mutants) analizleri sonucunda H3 molekülünde A, B, C, D ve E olmak üzere 5 tane antijenik domain, H1 molekülünde ise CA1, Ca2, Cb, Sa ve Sb olmak üzere yine 5 antijenik domain saptanmıştır ^{59 60}. Bu antijenik bölgelerdeki tek bir mutasyon bile antijenik varyasyona neden olabilmektedir ⁹⁰. HA molekülünde meydana gelen minör heterojenik değişimler sekanslama ile her zaman gözlenebilmesine karşın, antijenik tiplendirmede yaygın olarak kullanılan hemagglütinasyon inhibisyon testi ile ancak 2-5 yıl boyunca biriken majör değişimler saptanabilmektedir ⁴².

2.8.1.2. NA Molekülünde Antijenik Sürüklenme

HA molekülünde olduğu gibi NA molekülünde de antijenik driftin gerçekleşebileceği bildirilmiştir ⁹¹. Monoklonal antikor ve dizileme çalışmaları ile yapısında iki ya da üç antijenik bölge barındırdığı ileri sürülen NA molekülündeki antijenik driftin mekanizmasının HA molekülündekine benzer olduğu düşünülmektedir ⁹².

2.8.2. Antijenik Kayma (Antigenic Shift)

Antijenik kayma insan popülasyonunda dolaşımda olan virüslerin yerini, antijenik yapısı tamamen farklı virüslerin alması olgusudur. Sadece influenza A virüslerinde gözlenen majör bir antijenik değişim olan antijenik shift, iki mekanizma ile gelişir. Bunlardan birincisi, insan-insan, kanatlı-kanatlı ve insan-kanatlı virüsleri arasında gerçekleşen harmanlanma sonucunda gerçekleşen antijenik shifttir ⁹³. İkincisi ise kanatlı ya da domuz virüslerinin direkt olarak insan popülasyonuna transmisyonu ve bu popülasyona yerleşerek mevcut virüslerin yerini almasıyla oluşan antijenik shifttir.

Antijenik shift ile insan popülasyonunda dolaşıma giren yeni virüsler antijenik yapısıyla dolaşımda bulunan virüslerden tamamen farklı özellik taşımaları nedeniyle

yeni virüse karşı bağışık olmayan toplumlarda yüksek enfeksiyon oranlarıyla seyreden epidemilerin yanı sıra, pandemilere de neden olabilirler⁸⁹. Geçtiğimiz yüzyılda antijenik sapma sonucunda toplam dört pandemi meydana gelmiştir. Bunlar: 1918’de yeni H1N1 alt tipi ile “İspanyol Gribi”, 1957’de H2N2 alt tipinin mevcut H1N1’in yerini almasıyla ortaya çıkan “Asya Gribi”, 1968’de H3N2 alt tipinin mevcut H2N2’nin yerini almasıyla “Hong Kong Gribi” ve son olarak da 1977’de H1N1 alt tipinin yeniden dolaşıma girmesiyle meydana gelen “Rus Gribi”dir. Tüm bu yeni alt tipler beklenmedik zamanlarda ve düzensiz aralıklarla dolaşıma girmiştir. 1957 ve 1968 pandemilerine insan ve kanatlı virüslerinin yeniden harmanlanmasıyla oluşan virüsler neden olmuştur. 1918 pandemisinin ise kanatlı ya da domuz H1N1 virüslerinin insan popülasyonuna direkt transmisyonu sonucu gerçekleştiği ileri sürülmüştür. Ancak, filogenetik analizler bu virüslerin kanatlılardan insan popülasyonuna geçtiğini göstermektedir⁹⁴. 21. yüzyılın ilk pandemisine neden olan pdm A(H1N1) 2009 virüsü de antijenik sapma sonucunda kanatlı, insan ve domuz influenza virüslerinin gen segmentlerinin harmanlanmasıyla ortaya çıkmıştır⁸⁷.

2.9. İnfluenza Virüslerinin Ekoloji ve Epidemiyolojisi

İnfluenza A virüslerinin doğal rezervuarları dünyada yaygın olarak bulunan su kuşlarıdır⁹³. Yabani su kuşlarında genetik olarak durağan olan ve hastalık tablosu oluşturmayan influenza A virüsleri, kara kuşlarına ya da memeli türlerine bulaştıklarında virüsün ve bulaştığı canlıların özelliğine bağlı olarak kimi zaman pandemik seyir gösteren salgınlara neden olurlar. Hastalık oluşturdıkları canlılar içinde, insan, evcil kanatlılar, at, köpek, kedi, balina gibi farklı türler yer almaktadır⁴². Genetik ve konak çeşitliliği nedeniyle sadece influenza A virüsleri pandemik potansiyel taşımaktadır. İnfluenza B virüslerinin genel olarak insanları enfekte ettiği kabul edilse de, konak çeşitliliği konusundaki bilgiler sınırlıdır. Son yıllarda yapılan araştırmalar influenza B virüslerinin insan dışındaki canlıları da, örneğin fokları ve domuzları da enfekte ettiğini göstermiştir⁹⁵. İnfluenza B virüslerinde A virüslerine kıyasla mutasyon oranları daha düşük olduğundan dolayı genetik çeşitlilikleri de A virüslerine kıyasla sınırlıdır^{85,96}. İnfluenza B suşlarının farklı serotiplerinin bulunmaması, bu virüse karşı bağışıklık kazanımının küçük yaşlarda başlamasını sağlar. Ancak sonuçta kısıtlı da olsa devamlı bir mutasyon söz konusu olduğundan dolayı influenza B virüslerine karşı kazanılan bağışıklık da yaşam boyu ya da uzun süreli olmaz⁹³. Hem farklı alt tiplerinin

bulunmaması, hem de konak çeşitliliğinin kısıtlı olması nedeniyle influenza B virüsleri pandemi riski taşımazlar⁶³. İnfluenza C virüsleri insanları, domuz ve köpekleri enfekte ederler. Alt tipleri bulunmaz. İnfluenza A ve B virüsleri kadar yaygın değildirler, ancak ağır hastalık semptomlarıyla seyreden yerel epidemilere neden olabilirler⁴². Çocuklarda ise hafif bir hastalık tablosu oluştururlar⁹⁷.

Yukarıda açıklandığı şekliyle influenza A virüslerinin günümüzde saptanmış 16 HA, dokuz NA alt tipinin bulunmaktadır. 1977 yılından bu yana insan popülasyonunda H1N1, H3N2 influenza A alt tipleri ile influenza B virüslerinin dolaşımında olduğu bilinmektedir. Bu üç virüs grubunun prevalansı hem coğrafik olarak hem de zamansal olarak değişkenlik gösterir. Bu durum influenza virüslerinin epidemiyolojisini karmaşık hale getirir. Solunum yolu virüslerinin birçoğunun aksine influenza virüsleri sahip oldukları “antijenik drift” ve “antijenik shift” mekanizmalarıyla immün sistemden kaçabilmekte ve insanlarda tekrarlanan enfeksiyonlara neden olmaktadırlar^{42,98}.

Kuzey Yarımkürede influenza epidemileri hemen her zaman kış aylarında ortaya çıkmaktadır. Bunun nedeni tam olarak bilinmemekle beraber, nemli ve soğuk havanın virüsün enfektivitesi üzerine olumlu etkisi ve kış aylarında insanların kapalı ortamlarda ve daha kalabalık şekilde birarada bulunmaları nedenler arasında sayılmaktadır. Okul çocuklarının influenza epidemilerinin yayılmasında önemli rolü olduğu ileri sürülmektedir. Ekvatoryal iklimlerde ise, influenza mevsimselliği tam olarak tanımlanmamıştır⁶³.

İnfluenza epidemileri her sene dünya nüfusunun 5-15%'ini etkilemekte ve yaklaşık olarak 500 bin kişinin ölümüne neden olmaktadır⁹⁹. DSÖ ve Centers for Disease Control and Prevention (CDC), ABD ve İngiltere gibi bazı ülkelerde hastane yatış ve ölüm kayıtlarının düzenli ve kurallar dahilinde tutuluyor olması nedeniyle influenza ile ilişkilendirilen hastaneye yatış ve ölüm oranlarını bu verilere dayanarak dünya genelinde varsayımlar şeklinde hesaplanmasına olanak sağlamaktadır. Ancak, ülkemizde influenza nedeniyle hastaneye yatış ve ölüm oranları konusunda veriler kısıtlı olduğundan dolayı influenza ilişkili hastaneye yatış ve ölüm oranlarıyla ilgili bir çıkarım yapmak olası değildir^{100,101}. Dolaşımdaki virüsün karakterine göre değişen mevsimsel özellikler gösteren influenza enfeksiyonları, toplumda önemli bir hastalık yüküne neden olur. Örneğin, Amerika Birleşik Devletlerinde 1979-1980 sezonundan başlayarak 2000-2001 sezonunun da içeren influenza surveyans verilerinin toplu

analizi yapılmış; bu verilere göre 1979-2001 yıllarını kapsayan 20 yıllık bir dönemde özellikle 85 yaş ve üzeri bireylerin influenza nedeniyle hastaneye yatışlarında önemli bir artış olduğu, beş yaşın altındaki çocuklarda hastaneye yatış oranlarının 50-64 yaş arasındaki bireylerle aynı olduğu saptanmıştır. Ayrıca hastaneye yatış oranlarının H3N2 virüsünün dolaşımında olduğu senelerde daha yüksek olduğu, bunu influenza B ve H1N1 virüslerinin takip ettiği saptanmıştır ¹⁰². Aynı çalışma grubu ülkenin 1976 -1999 yılları arasında elde edilen ölüm ve sürveyans bilgilerini analiz ederek influenzanın neden olduğu ölüm oranlarını hesaplamışlardır. Bu verilere göre, 1976-1999 yılları arasında influenza ile ilişkilendirilen ölüm oranlarının önemli derecede arttığı ve ölüm oranlarının da hastaneye yatış oranlarında olduğu gibi en çok H3N2 salgınlarının olduğu yıllarda arttığı; bunu influenza B ve H1N1 virüslerinin neden olduğu salgınların izlediği ve ölümlerin en çok 65 yaş üzeri bireylerde görüldüğü saptanmıştır ¹⁰³. Bu veriler influenza A/H3N2 virüslerinin influenza B ve A/H1N1 virüslerine göre daha ciddi seyreden epidemilere neden olduğunu göstermektedir.

Mevsimsel influenzanın özelliklerinden biri de nedeni bilinmeyen ölümlere yol açmasıdır. Bu tür ölümlerin çoğu influenza sonrası gelişen viral ya da bakteriyel enfeksiyonlardan kaynaklanmasına rağmen, grip, ölüm nedeni olarak kayıtlara geçmemiştir. Örneğin, İngiltere’ de 1975-1990 yılları arasında her yıl 5.000-29.000 arasında değişen beklenenin üzerinde ölüm vakası bildirilmiştir ki bu şekilde tanımlanan ölümler gribe atfedilen ölümlerin 5 katı kadardır ⁶³.

İnfluenza virüsleri ile ilgili epidemiyolojik verilerin elde edilmesi ancak sürveyans sistemleri ile mümkün olmaktadır. Bu bağlamda DSÖ, influenza virüslerinin izlemi için 1952 yılında Küresel İnfluenza Sürveyans Ağı (Global Influenza Surveillance Network; GISN) kurmuştur ⁹⁹. Bugün Türkiye dahil olmak üzere 104 ülkeyi ve bu ülkelerdeki 134 Ulusal İnfluenza Referans Laboratuvarını kapsayan GISN sayesinde her yıl dolaşımdaki influenza virüsleri izlenmekte, influenza virüs tip ve alt tipleri belirlenerek antijenik karakterizasyonları gerçekleştirilmekte ve genetik değişimler belirlenmektedir. GISN yoluyla influenza virüslerinin evrimi ve epidemiyolojisi hakkında dünya genelinde veriler elde edilmektedir. Elde edilen bu veriler değerlendirilerek, bir sonraki sene dolaşımda bulunma olasılığı en yüksek olan virüsler seçilmekte, morbidite ve mortaliteyi azaltmada anahtar olan aşılarda üretimi için gerekli tohum virüsü belirlenmektedir ⁹⁹. Bu bağlamda, GISN ile bağlantılı olarak

Avrupa’da 30 ülkeyi kapsayan bir sürveyans ağı (European Influenza Surveillance Scheme-EISS-) oluşturulmuş; böylece yaklaşık 450 milyon kişiyi kapsayan 12 milyon kilometrekarelik bir alan sürveyans kapsamına alınmıştır ¹⁰⁴ .

GISN üyesi laboratuvarların birincil sorumluluğu ülkelerinde sürdürülebilir bir sürveyans sistemi kurmak, sürveyansın düzenli bir şekilde yürütülmesini sağlamak ve sürveyans verilerini GISN üyesi diğer ülkelerle paylaşmaktır. Ülkemizde ilk olarak 2003 yılında İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Viroloji Laboratuvarı sürveyans çalışmalarını başlatmış, 2005 yılından bu yana da T.C. Sağlık Bakanlığı bünyesinde Ulusal İnfluenza Referans Laboratuvarı olarak GISN’e dahil olmuştur. Ülkemizde sürveyans çalışmaları sonucunda virolojik veriler laboratuvar tarafından üretilip hasta bilgileri ile birlikte değerlendirilmekte, epidemiyolojik veriler ise Sağlık Bakanlığı’nın ilgili bölümlerince toplanıp değerlendirilmektedir. Bu nedenle laboratuvarımızda incelenen örneklerin virolojik özellikleri ile ilgili yeterli bilgi mevcut olmasına karşın epidemiyolojik veriler zaman zaman sınırlı olabilmektedir. Ülkemizde 2003-2004 sezonundan 2006-2007 sezonuna kadarki dönemde elde edilen sürveyans verileri Önal ve ark. ve Ciblak ve ark. ^{100,101} tarafından yayınlanmıştır.

2.9.1. Ülkemizde 2003-2007 yılları arasında elde edilen sürveyans bulguları

2003-2004 sezonunda 12 sağlık kurumundan toplam 37.921 hastaya ait epidemiyolojik veriler laboratuvara ulaşmış bunların 11.678’ine (%30,8) İBH tanısı konduğu saptanmıştır. İBH tanısı alanların yaş gruplarına göre dağılımına bakıldığında 0-4 ve 5-14 yaş gruplarına ait olguların sezonun erken dönemlerinde ilk sırayı aldıkları saptanmıştır. Grip olgularının ülkemizde ne oranda iş gücü veya okul günü kaybına neden olduğunu saptamak amacıyla yapılan sorgulamada 5 yaş üstünde İBH tanısı konmuş 7 765 kişinin toplam 752 gün rapor kullandıkları saptanmıştır.

Bu sezonda toplam 23 merkezden 204 örnek laboratuvara gönderilmiş; bunların 91’inde (%44,6) influenza A izole edilmiştir. Bu sezonda influenza B izole edilememiştir. Aylara göre en yüksek izolasyon sayısı aralık ve ocak aylarında olmak üzere sırasıyla %58,9 ve %54,5 olarak saptanmıştır. Sonuç olarak en yüksek virüs izolasyonları 50. ve 3. haftalarda gerçekleşmiştir. İnfluenza izolasyon oranlarını yaşlara göre dağılımına bakıldığında en yüksek izolasyonun 15-59 yaş gruplarında görüldüğü saptanmıştır. İzole edilen influenza A virüslerinin alt tiplendirim yapılmış ve tümünün

H3N2 altipine ait oldukları ve antijenik olarak da A/ A/Fujian/411/02 (H3N2) benzeri virüsler oldukları saptanmıştır¹⁰⁰.

2004-2005 sezonunda yine dört bölgeden 12 sağlık kurumundan laboratuvarımıza epidemiyolojik verisi ulaşan 38.798 hastanın 9.859'una (%26) GBH tanısı konmuştur. Bu sezonda 42. ve 52. haftalar arasında İBH tanısı alan hastaların toplam hastalara oranı en yüksek değerini bulmuştur. İBH tanılı hastaların yaş gruplarına göre dağılımları incelendiğinde sezonun en erken döneminde 0-4 yaş gruplarına ait İBH tanılı hastaların sayısı yüksek gözükmemekte, bu yaş grubu hasta sayısının düşüşe geçtiği sonraki haftalarda ise diğer yaş grupları hasta sayısının arttığı görülmektedir. İBH tanılı 5 yaş üstü 4.212 hastanın toplam olarak 233 gün rapor aldıkları belirlenmiştir.

Bu dönemde laboratuvarımıza ülke genelindeki 23 merkezden toplam 458 örnek gönderilmiş olup 86 örnekte (%18,8) influenza A, 14 örnekte (%3,1) influenza B saptanmıştır. 2003-2004 sezonundan farklı olarak en yüksek influenza izolasyonu (%24,9) 0-14 yaş grubunda saptanmıştır. Aylara göre virüs izolasyon dağılımı incelendiğinde en yüksek influenza A izolasyonu ocak (%67,4) ve aralık (%22) aylarında influenza B izolasyonu ise mart ayında (%100) gerçekleşmiştir. Sonuç olarak İBH semptomları bulunan hastaların haftalık sayısının 50. ve 2. haftalar arasında virüs izolasyonu ile ilgili olduğu saptanmıştır. İzole edilen influenza A suşlarından 43'ünün alt- tiplendirilmesi yapılmış 27 tanesi H1N1 bulunurken 38'inin de H3N2 olduğu saptanmıştır. Antijenik karakterizasyonu yapılan H1N1 virüslerinin tamamının A/New Caledonia/20/99 (H1N1) benzeri, H3N2 virüslerinin de bir bölümünün A/Netherlands/128/2004 (H3N2) ile A/Shantou/1219/2004 (H3N2) benzeri virüsler olduğu saptanmıştır.

2005-2006 sezonunda Sağlık Bakanlığı süveyans merkezleri dışında işbirliği yaptığımız kurumlarda izlenen 16.626 hastanın haftalık bilgileri laboratuvarımıza ulaşmış, bunlardan 4.353'üne (%26,2) İBH tanısı konduğu gözlenmiştir. Bu tanıyı alan hastaların, toplam sağlık kurumlarına yapılan başvurulara oranlarının haftalara göre dağılımları incelendiğinde, 41. ve 1. haftalarda olmak üzere, İBH tanısı alan olguların iki dönemde pik yaptıkları görülmüştür. Bu sezonda 0-4 yaş grubu olguların dönem boyunca en sık İBH tanısı alan grup olduğu; rapor alımları irdelendiğinde ise 5 yaş üstü gruptan 2.158 hastanın toplam 98 gün rapor aldıkları saptanmıştır.

Bu sezonda Sağlık Bakanlığına bağlı beş ilin Sağlık Müdürlükleri de dahil olmak üzere toplam 46 kurumdan 1.317 örnek laboratuvarımıza gönderilmiş ve solunum yolları enfeksiyonları etkenleri yönünden incelenmiştir. Bu örneklerden 168 adet Influenza A (%12,8), 20 adet Influenza B (%1,5) izole edilmiştir. İnfluenza A izolasyonlarının aylara göre dağılımlarına bakıldığında şubat ayında en yoğun dönemin (toplam A izolasyonlarının %39,9'u) yaşandığı; izolasyonların 2. haftadan itibaren artış gösterdiği, 3. ve 8. haftalarda pik yaparak 11. haftadan itibaren inişe geçtiği belirlenmiştir. İzolasyonunları yaş gruplarına göre irdelediğimizde ise, en yüksek pozitifliğin 0-14 yaş grubunda (%52) saptandığı görülmüştür. İzole edilen İnfluenza A suşlarının tamamının H3N2 alt tipinden oldukları, antijenik olarak da A/Hong Kong/443/05 benzeri virüs oldukları saptanmıştır. Antijenik irdelenmesi gerçekleştirilen iki adet Influenza B suşundan birinin B/Jiangsu/10/03 ve B/Florida/7/05 referans suşları; diğerinin B/Malaysia/2506/04 referans suşu ile ilintili oldukları belirlenmiştir.

2006-2007 sezonunda ise sağlık kurumlarına yapılan başvurular ve klinik tanıya ait veriler elimize eksik biçimde ulaştığından, kantitatif göstergeler olan morbidite verilerini istatistiki olarak değerlendirmek mümkün olmamıştır.

Bu dönemde, Sağlık Bakanlığı sürveyans çalışması kapsamında toplam beş ilden 824 örnek; ayrıca beş ile ilave olarak Tekirdağ, Ankara, Hatay, Samsun, Erzurum ve Mersin illeri sağlık kurumlarından (s: 207) ve İstanbul Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalından gönderilen yatan pediatrik olgulara ait (s: 87) olmak üzere toplam 1.118 örnek Influenza virüsleri açısından incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara bakıldığında 41. ve 17. haftalar arasında incelenen toplam 1.118 örnekte 46 adet Influenza A (%4,1), 25 adet Influenza B (%2,2) saptanmıştır. İnfluenza virüslerinin izolasyonları haftalara göre irdelendiğinde, en yüksek orana 2. ve 7. haftalar arasında erişildiği; 4. haftada izolasyon oranının pik yaptığı (%18,3); influenza A pozitif örneklerin sayısının 8. haftadan sonra azalmaya başladığı, influenza B virüsü ise sezonun başlangıcında (49. hafta), influenza A'dan önce dolaşıma girmiş; tüm sezon boyunca varlığını sürdürmüş ve influenza A'nın ortamdan çekildiği 11. haftadan 17. haftaya kadar artış göstererek varlığını sürdürmüştür. Yaş gruplarına göre Influenza pozitifliği incelendiğinde en yüksek pozitifliğin (%7,1) 15-59 yaş grubunda saptandığı; bu grubu %6,7'lik oranla 60 yaş üstü grubun izlediği görülmektedir. Bu sezonda 0-14 yaş grubundan Influenza virüs izolasyonu, diğer gruplardan daha az oranda (%5,2) saptanmıştır. İzole edilen 46 influenza A suşunun 42'sinde alt tiplendirme yapılmış ve

tamamı H3N2 olarak saptanmıştır. Bu suşların antijenik olarak A/Wisconsin/67/2005 ve A/California/7/2004 benzeri virüs oldukları; antijenik tiplendirilmesi yapılan 7 adet influenza B suşunun, altısı B/Victoria/2/87, birisi B/Yamagata/16/88 benzeri virüs olarak saptanmıştır.

Bir toplumda grip ile mücadeleden söz edildiğinde, öncelikle o bölgede grip aktivitesinin başlangıç tarihi, süresi ve salgından sorumlu virüs tiplerinin belirlenmesi gerekmektedir. Bu amaçla bir yandan ulusal süveyans çalışmalarına ağırlık verilirken, öte yandan uluslararası işbirliği ile elde edilen bilgiler paylaşılmakta; alışlagelenin dışında bir alt tipin izolasyonu durumunda gerekli önlemlerin zamanında alınabilmesi için hazırlıklar yapılmaktadır. Süratle yayılma özelliğe sahip grip salgınlarının hızını kesmek, böylece sağlık sisteminin aksamaya uğramasını önlemek ve gerekli üniteleri hızla harekete geçirmek, ancak salgın öncesi oturtulmuş sağlıklı bir yapılanma ile mümkün olabilir. Ayrıca her yıl dolaşımdaki virüslerin belirlenmesi, bir sonraki yılın aşı içeriğini belirlemek için de elzemdir. İşte tüm bu nedenlerden ötürü, alınacak önlemleri devreye sokmak ve toplumu uyarmak için tüm dünyada grip süveyansına önem verilmektedir. Ülkemizde 2003 yılında başlatılan süveyans çalışmaları Sağlık Bakanlığı denetiminde Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezinde yeralan Ulusal İnfluenza Merkez Laboratuvarı ve İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi bünyesinde yeralan Ulusal İnfluenza Referans Laboratuvarı tarafından sürdürülmektedir. Süveyans ile elde edilen epidemiyolojik ve virolojik veriler EuroFlu veri tabanına bildirilmekte ve bu veriler Avrupa Birliği Ülkelerinden Avrupa Hastalıkları Koruma Merkezine (ECDC) bildirilen veriler ile birleştirilerek FluNet web tabanlı veri bankasında toplanmaktadır. Böylece tüm Avrupa kıtasından influenza aktivitesine ait veriler toplanmakta ve tüm GISN üyeleri ile paylaşımına sunulmaktadır.

2.10. Hastalık: Patoloji ve Klinik Özellikler

İnfluenza enfeksiyonları çoğunlukla öksürme ve hapşıрма ile damlacıklarla çevreye saçılırlar. Konağa girdiklerinde trakeobronşiyal epitele yerleşirler ve burada 4-6 saat içinde ilk replikasyon döngülerini tamamlarlar. Bu ilk enfeksiyon fazında oldukça yüksek titrede virüs saçılımı gözlenir ⁶³.

İnfluenza virüsleri tüm solunum yolunda değişikliklere neden olmakla birlikte en önemli *patolojik belirtiler* alt solunum yolunda gözlenir. Komplike olmayan influenza enfeksiyonları larinks, trakea ve bronşlarda akut yaygın inflamasyon ve ödem

ile karakterizedir. Işık mikroskopunda incelenen enfekte kolumnar fırçalı hücrelerin vakuollü, ödemli hücrelere dönüştüğü ve fırçalı yapısını yitirdiği gözlenir. Daha sonra bu hücrelerin dökülmeye başlamasıyla alttaki tek hücreli bazal katman açığa çıkar. Submukozada nötrofil ve mononükleer hücrelerin infiltrasyonu ile beraber ödem ve hiperemi gözlenir. Şiddetli primer viral pnömonilerde, kapiller damarlarda genişleme ve mononükleer lökosit infiltrasyonu ve tromboz nedeniyle belirgin bir hiperemi ve alveol duvarlarında genişleme ile karakterize bir intersitisyel pnömoni gözlenir. Alveol ve bronşiyol duvarlarının yıkımı ile beraber nekrotizan değişimler meydana gelebilir. Hücresel düzeyde influenza virüsleri hücrenin protein sentez mekanizmasını sonlandırır ve apoptozisi uyarır. Hastalık semptomlarının başlangıcından sonraki 3-5'inci günler arasında epitel hücrelerinde rejenerasyon başlar, ancak yıkım olayları da devam eder. İnfluenza enfeksiyonuna bağlı olarak epitelde meydana gelen hasarın onarımı bir ay sürebilir⁴².

Klinik olarak influenza enfeksiyonları asemptomatik hastalıktan hızla ilerleyerek ölümle sonuçlanan viral pnömonilere kadar değişen özellikte bir seyir gösterir. Yetişkinlerde, komplike olmayan tipik bir influenza sendromu küçük hava yollarını da içeren bir trakeobronşitten ibarettir. Konağın bağışıklık sistemine ve virüsün dozuna bağlı olarak inkubasyon süresi 1-2 gün ile 4-5 gün arasında değişebilir. Genellikle ani başlayan semptomlar başağrısı, titreme, kuru öksürük, ateş yükselmesi ve bunu takiben kas ağrısı ve iştahsızlık şeklinde seyir gösterir. İlk 24 saat içinde ateş 38-40 °C'ye kadar çıkabilir. İkinci üçüncü günde düşmeye başlayan ateş genellikle altıncı günde tamamen kaybolur. Ateş düşmeye başladığında solunum yolu semptomları daha da ağırlaşabilir. Ateş ve üst solunum yolu semptomları iyileştikten sonra öksürük ve yorgunluk 1-2 hafta kadar sürebilir. Yaşlılarda ise influenza, hiç bir solunum yolu semptomu gözlenmeksizin sadece ateş ve yorgunluk ile seyredebilir. Çocuklarda da genellikle yetişkinlere benzer seyretse de bazı önemli farklılıklar gözlenir. Örneğin çocuklarda ateş daha yüksek seyredebilir ve febril konvülsiyonlara neden olabilir. Orta kulak iltihabı, krup, pnömoni, miyosit çocuklarda çok daha sık görülen tablolardır. Üç yaşın altındaki çocuklarda bulantı, kusma ve ishal gibi sindirim sistemi belirtileri de gözlenebilir. İnfluenzanın çocuklarda astımı da şiddetlendirdiği bilinmektedir^{42 105}.

İnfluenza komplikasyonlara neden olabilir. Bunlar akut viral pnömoni ile birlikte gözlenen bakteriyel pnömoni, sekonder bakteriyel pnömoni, miyozit,

myoperikardit, Reye sendromu (aspirin kullanımına bağlı), ensefalopati ve post influenza ensefaliti gibi merkezi sinir sistemi (MSS) bozuklukları olarak sıralanabilir. Kalp damar hastalığı olanlar, astımlı hastalar, kronik obstrüktif akciğer hastalığı olanlar ksitik fibrozlu hastalar, diyabetli hastalar, immün sistemi baskılanmış hastalar, 65 yaş üzerindeki bireyler ve gebeler gibi risk gruplarında influenza enfeksiyonlarının daha ciddi bir seyir göstererek ölümlerle sonuçlandığı bilinmektedir ¹⁰⁵. Özellikle gebeliğin ikinci yada üçüncü trimestr döneminde olan gebe kadınlarda influenza ölümlere neden olabilmektedir ⁴².

2.11. Tanı

Influenza virüs enfeksiyonlarının patognomik belirtileri olmadığından dolayı sadece klinik özelliklere bakılarak kesin tanı koymak mümkün değildir. Bu nedenle influenza enfeksiyonlarının kontrolünde laboratuvar tanısı önemli bir yer teşkil eder. Hızlı ve doğru tanı, gerek hasta bireyin gerekse toplum sağlığının korunması için enfeksiyon kontrol stratejilerinin zamanında uygulanmasını mümkün kılar ve gereksiz antibiyotik kullanımı gibi ek harcama gerektiren uygulamaların da önlenmesini sağlar. Buna ek olarak, laboratuvar tanısını takiben yapılacak olan antiviral direnç çalışmaları ile dolaşımdaki virüslerin mevcut antivirallere karşı direnç durumları araştırılarak hekimlerin bilgilendirilmesiyle tedavi stratejilerinin düzenlenmesi konusunda destek sağlar ¹⁰⁶.

Laboratuvar tanısında kullanılan yöntemler hücre *kültüründe virüs izolasyonu*, *virüs tiplendirimi*, *nükleik asit testleri*, *hızlı antijen saptama testleri* ve *seroloji* olarak beş grup altında incelenebilir.

2.11.1. Tanı Amacıyla Örneklerin Alınması

İyi kalitede solunum yolu örneği alınması laboratuvar tanısının doğru yapılabilmesi dolayısıyla influenza enfeksiyonlarının kontrolünde gerekli en önemli bileşendir. Örnekler ideal olarak hastalığın başlangıcından sonraki 72 saat içinde, en geç ise 96 saat içinde alınmalı ve izolasyon gerektiren durumlarda +4°C de, diğer testlerin uygulanacağı durumlarda oda ısısında laboratuara transportu sağlanmalıdır. Yetişkinlerden alınan en pratik örnekler *burun sürüntüsü* ve *boğaz sürüntüsü* örnekleridir. 3 yaş altındaki çocuklarda ise *nazofaringeal aspirat* tercih edilen örnektir. Virüs izolasyonu için nazofaringeal aspirat, nazal yıkama ve bronkoalveolar lavaj örnekleri, nazofaringeal sürüntü, boğaz sürüntüsü ve balgamdan üstündür. Çünkü

nazofaringeal sürüntü, boğaz sürüntüsü ve balgam az sayıda kolumnar hücre (influenza virüsünün tercih ettiği hücreler), daha çok sayıda skuamoz epitel hücresi içermektedir.

Örnek alım ve transport koşulları tüm tanı testleri için aynıdır. Ancak serolojik testler için serum örnekleri semptomların başlangıcından itibaren ilk 7-10 gün içinde ve semptomların başlangıcından sonraki 14-21 gün içinde iki kez alınmalı ve iki örnek de aynı anda test edilmelidir ¹⁰⁶.

2.11.2. Virüs İzolasyonu

Virüs izolasyonunda geleneksel olarak hücre kültürü kullanılmaktadır. İnfluenza virüslerinin izolasyonunda en yaygın kullanılan hücreler MDCK hücreleridir. İnfluenza virüs replikasyonu genellikle ekimden sonraki beşinci günde sitopatik etkinin gözlenmesinin akabinde uygulanan HA ya da in-house ELISA testleriyle saptanabilmektedir ⁴². ELISA testiyle tip ayrımı yapılan virüslerin alt- tiplendirimi, ve antijenik tiplendirimi spesifik antiseranın kullanıldığı HAI testi ile gerçekleştirilebilmektedir. Buna ek olarak, gerek virüs izolatlarında gerekse direkt olarak hasta örneklerinde monoklonal antikorların kullanımı esasına dayanan ve H1N1 ve H3N2 alt tiplerinin ve B virüslerinin soy (lineage) ayrımında kullanılan daha hızlı testler de mevcuttur ¹⁰⁷. Son yıllarda ise hücre kültürü üst sıvısından “reverse transcription polymerase chain reaction” (RT-PCR) yöntemi ile tipe özgü primerler kullanılarak birçok insan ve kanatlı virüslerinin alt tiplendirimi yapılabilmektedir ¹⁰⁸. İzolasyondan sonra, hemaglütinin ve nöraminidaz genlerinin dizilenerek incelenmesi de alt tipleme amaçlı kullanılabilmektedir. Bu yöntem, birbirinden farklı suşların ayırımına olanak tanınması, suşlar arasındaki varyasyonun ve salgınların orijinlerinin saptanması açısından önemlidir ¹⁰⁶.

Virüs izolasyonu amacıyla 10-11 günlük embriyonlu yumurta da kullanılmaktadır. Ancak embriyonlu yumurtanın allantoik ve amniyotik keselerinden virüs izolasyonu emek yoğun bir işlem olduğu için tanı laboratuvarları tarafından tercih edilen bir yöntem değildir. Bununla beraber, embriyonlu yumurtada virüs izolasyonu yüksek titrede virüs üretimini mümkün kılması nedeniyle aşı üretimi için hayati öneme sahiptir. Duyarlılığı %100 olan hücre kültürü yönteminde sonuç almak için 4-5 günlük bir süreye ihtiyaç bulunması nedeniyle diyagnostik amaçlı kullanımı azalmasına rağmen diğer testlerle saptanamayacak yeni virüslerin saptanmasını, virüslerin ileri tetkiklerle antijenik olarak karakterize edilmesini, aşı üretiminde kullanılacak virüslerin elde

edilmesini sağladığı için referans laboratuvarlarında önemini korumaya devam etmektedir ¹⁰⁶.

2.11.3. Nükleik Asit Testleri

İnfluenza virüsleri klinik örneklerden RT-PCR ile saptanabilirler. İnfluenza virüslerinin klinik örneklerden saptanmasına olanak tanıyan sağlayan bir çok in-house RT-PCR tekniği geliştirilmiştir ^{106,109}. Bu yöntemle tipe ve alt tipe özgü primerler kullanılarak birçok influenza virüsünün tiplendirimi ve alt tiplendirimi yapılabilmektedir. Bu yöntemin uygulanabilmesi için canlı virüse gereksinim yoktur. Bundan dolayı örneklerin laboratuvara transportu özel koşullar gerektirmez. Nükleik asit testlerinin bir diğer üstünlüğü de hücre kültüründen daha duyarlı ve neredeyse hızlı testler kadar da çabuk sonuç vermeleridir. Son yıllarda kullanıma giren ve özellikle 2009 pandemisinin gündeme gelmesiyle referans laboratuvarlarının büyük çoğunluğunda kullanılmaya başlanan gerçek zamanlı revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (real time reverse transcription polymerase chain reaction- rRT-PCR) tanı yöntemi günümüzde influenzanın hızlı ve doğru tanısında altın standart olarak kullanılmaya girmiştir ¹¹⁰.

2.11.4. Hızlı Antijen Saptama Testleri

Klinik örneklerden direkt olarak virüse ait korunmuş antijenlerin tipe özgü spesifik monoklonal antikorlarla saptanması esasına dayanan immunofloresan ya da enzim immünoassay testleri bulunmaktadır. Hücre kültürü ile karşılaştırıldığında direkt ve indirekt immunofloresan tekniklerinin duyarlılığı %60-100 dolaylarındadır ¹¹¹. Bu teknikte örnekler floresan mikroskopunda incelenirken örnek kalitesi de saptanabilmektedir. Örnekte kolumnar epitel hücrelerinin az olması örneğin kalitesinin düşük olduğunu ve yeniden örnek alınması gerektiğini gösterir ¹⁰⁶.

Nöraminidaz inhibitörlerinin kullanıma girmesinden sonra influenza enfeksiyonlarının erken tanısı daha da önem kazanmış, bu ihtiyacı karşılamak üzere “hasta başı-point of care” testleri adı verilen hızlı testler geliştirilmiştir. İnfluenza A ve B virüslerinin nükleoproteinine karşı elde edilmiş özgül monoklonal antikorlar kullanılarak tasarlanan bu testler 15 dakika gibi kısa bir sürede sonuç vermelerine karşın duyarlılıkları oldukça düşüktür. Hücre kültürü ile karşılaştırıldıklarında edildiğinde duyarlılıkları %56-100 özgüllükleri ise %73-99 olan bu testlerin RT-PCR ile karşılaştırıldıklarında duyarlılıkları %56-74 civarlarındadır ^{111,112}. Hızlı testler viroloji

laboratuvarlarına erişimin zor olduğu ya da pandemi nedeniyle laboratuvarlardaki yükün ağır olması durumlarında çekici hale gelirler. Aynı zamanda acil kliniklerinde nöraminidaz inhibitörlerinin kullanımı sözkonusu olduğu durumlarda doktora hızlı rehberlik gerektiğinde önem taşırlar ¹¹³. Ancak, bu testler yerlerini nükleik asit amplifikasyon testlerine bırakmaktadır.

2.11.5. Seroloji

Virüs izolasyonunun gerçekleştirilemediği, virüsün saptanamadığı ya da yetersiz olduğu durumlarda antikor titresini belirlemek amacıyla serolojik yöntemlerden faydalanılmaktadır. Bu amaçla, akut ve konvalesan dönemde alınan çift serum örneğinde antikor titresini araştırmak amacıyla HAI ve mikro nötralizasyon yöntemlerinden faydalanılmaktadır. Antikor titresindeki dört kat ve üzerindeki artış koruyucu antikor titresinin varlığını gösterir (serokonversiyon) ¹¹⁴.

İnfluenza enfeksiyonları tekrarlanan özellikte olmaları nedeniyle toplumdaki bireylerin büyük çoğunluğunda antikor bulunmaktadır. Bu nedenle tek bir serum örneğinde influenzaya özgü IgG yada total antikor saptanması hastanın son günlerde influenza enfeksiyonu geçirdiğinin göstergesi olamaz. Bu nedenle, serolojinin diagnostik bir anlamının olabilmesi için mutlaka akut ve konvalesan dönemlerde alınan iki serum örneğinin incelenerek antikor titresindeki artış durumuna bakılmalıdır ¹⁰⁶.

Komplement fiksasyon (CF), hemaglutinasyon inhibisyon, nötralizasyon, immunofloresan ve enzim immünoassay gibi influenzaya özgü bir çok serolojik test bulunmaktadır. İnfluenzaya özgü antikorların saptanması amacıyla kullanılan nötralizasyon ve HAI altın standart olarak kabul edilmektedir. Bu iki yöntemle alt tipe özgü ve suşa özgü değişiklikler saptanabilmektedir. CF diğer iki testen daha kolay olduğu için daha sıklıkla kullanılmaktadır ancak bu test alt tip ayırımına olanak tanımaz. Serolojik testlerde konvalesan serumlardaki influenzaya özgü antikor titresinde 4 kat artış yakınlarda geçirilmiş enfeksiyonun göstergesi olarak kabul edilir ¹⁰⁶ Serolojik çalışmalar daha çok epidemiyolojik araştırmalarda kullanılmaktadır.

2.12. Korunma

İnfluenzadan korunmanın en etkin yolu aşılardır. Bu amaçla günümüzde çeşitli firmaların ürettiği yumurta ve hücre kültürü bazlı aşılar kullanılmaktadır. İnfluenza virüslerinin yüzey moleküllerinin değişken olması nedeniyle aşı

formülasyonu her yıl değişmektedir dolayısıyla influenzadan korunmak için her yıl aşılanmak gerekmektedir.

2.12.1. Embriyonlu Yumurtada Üretilen Aşılar

Günümüzde canlı-attenüe ve inaktif influenza aşıları (whole ya da sub-virion/split virion) olmak üzere embriyonlu yumurtada üretilen klinik kullanım için onaylanmış iki tip influenza aşısı bulunmaktadır. Bu aşıların üretiminde ilk aşama, aşı içeriğinde bulunacak aday virüsün belirlenmesi ve bu aday virüs ile yumurtada üreme kapasitesi yüksek “donör” virüsün embriyonlu yumurtada birlikte üretilerek HA ve NA genlerini aday virüsten, diğer 6 geni ise “donör” virüsten alan harmanlanmış (re-assortan) tohum virüsün üretilmesidir. İnaktif aşılar için donör virüs olarak A/Puerto Rico/8/1934 H1N1, canlı attenüe aşılar için ise A/Ann Arbor/6/1960 ca H2N2 virüsü kullanılmaktadır ¹¹⁵.

Embriyonlu yumurta teknolojisi ile aşı üretimi 5-6 ay süren oldukça karmaşık bir işlem gerektirmektedir ¹¹⁵. Ancak embriyonlu yumurta virüsün bol miktarda üretilmesi açısından oldukça iyi bir ortamdır ve bu yöntemle 1945 yılından beri kazanılan tecrübe ile güvenilir aşılar üretilmektedir ¹¹⁶.

2.12.1.1. İnaktif Bütün-Virüs Aşıları (Inactivated Whole-Virüs Vaccines)

1970’li yıllara kadar üretilen aşıların tümü inaktif whole-virüs aşılarından oluşmaktaydı. Ancak, immünojenik olarak oldukça iyi sonuç vermesine karşın istenmeyen reaksiyonlara yol açması nedeniyle 1970’li yıllardan itibaren alternatif olarak, virüsün kimyasal yolla (formaldehit ya da β -propiolakton ile) inaktive edildikten sonra deterjanlarla parçalanmasıyla elde edilen “sub-virion” ya da “split” aşı adı verilen aşıların kullanımı gündeme gelmiştir. Hemaglütinin (HA), tüm inaktif influenza aşılarının ana immünojenidir. Aşı içindeki HA miktarı ise aşının immünojenitesi ile doğru orantılıdır ¹¹⁷. İnaktif bütün- virüs aşılarının üretiminde ilk aşama, yumurtada yüksek titrede üreyebilen “reassortan tohum” virüsün elde edilmesidir. Bunu takiben tohum virüsün embriyonlu yumurtada büyük ölçekli olarak üretilip formalin ile inaktive edilmesiyle bütün virüs aşıları elde edilir ¹¹⁶. Donör virüs olarak kullanılan A/Puerto Rico/8/1934 H1N1 suşu yumurtada üretilen tüm rekombinant inaktif aşıların üretiminde kullanılmaktadır. İnaktif aşıların üretiminde influenza B virüsleri için donör virüs bulunmamaktadır ¹¹⁷.

İnaktif bütün virüs aşılarının özellikle çocuklarda istenmeyen reaksiyonlara neden olması, parçalı (split) ve alt-ünite (sub-unit) aşılarını tercih edilir konuma getirmiştir. Bununla beraber, tüm virüs aşılarının parçalı ve alt-ünite aşılara kıyasla daha iyi immün yanıt oluşturduğu, üretim sırasında daha az manüplasyon gerektirdiği için antijen kaybını önlediği bilinmektedir.

2.12.1.2. İnaktif Parçalı-Virüs Aşıları (Inactivated Split-Virüs Vaccines)

İnaktif parçalı virüs aşıları, bütün virüs aşılarının neden olduğu istenmeyen reaksiyonları azaltmak amacıyla virüsün deterjanlarla parçalanması ile elde edilirler. Günümüzde yaygın olarak kullanılan bu aşılarda içeriğinde aşının uygulanacağı sezonda dolaşımda bulunma olasılığı en yüksek olan H1N1, H3N2 ve B virüslerine ait antijen bulunmaktadır²³. Ülkemizde kullanımda olan aşılar bu grupta yer almaktadır.

2.12.1.3. Soğuğa Adapte Canlı-Attenüe Aşılar (Cold Adapted Live-Attenuated Vaccines)

İnfluenza virüsleriyle yapılan çalışmalar doğal influenza virüslerinin (wild-type virüs) en iyi 37-39°C'de çoğaldıklarını, 25°C'de ise çok düşük oranda çoğaldıklarını ortaya koymuştur¹¹⁸.

Soğuğa adapte attenüe influenza virüsleri, 1960'lı yıllarda doğal influenza virüslerinin tavuk embriyo böbrek hücrelerinde, sıcaklığın adım adım düşürüldüğü ortamda seri pasajlanmaları ile elde edilmiştir¹¹⁹. Seri pasajlamalar sonucunda soğuğa adapte bu virüslerin birçok geninde (NA ve HA genleri hariç) meydana gelen mutasyonların virüsün attenüasyonuna neden olduğu saptanmış; gelinciklerle yapılan deneysel çalışmalarda soğuğa adapte-attenüe bu virüslerin hastalık oluşturmadığı gözlenmiştir¹²⁰. Bu çalışmalardan sonra, günümüzde soğuğa adapte canlı-attenüe aşılarda donör olarak kullanılan A/Ann Arbor/6/1960 (H2N2) ve B/Ann Arbor/1/1966 virüsleri üretilmiştir. Bu iki attenüe virüs, embriyonlu yumurtada çok iyi çoğalabilmekte ancak 25-33 °C'de optimum düzeyde çoğalabilirken 37°C'de minimum düzeyde çoğalabilmektedir (soğuğa adapte/cold adapted). Bu nedenle soğuğa adapte attenüe canlı aşılarda alt solunum yollarında enfeksiyon oluşturmazlar.

İnaktif aşılar gibi, donör virüs ile bir sonraki sene dolaşıma girmesi muhtemel olan aday virüs yumurtada birlikte üretilirler. Bu birlikte üreme sonucunda oluşan harmanlanmış virüslerden HA ve NA genlerini aday virüsten, diğer 6 geni ise donör virüsten almış olan virüsler seçilir. Böylelikle seçilen harmanlanmış virüs

nötralizan antikor oluşumunu tetikleyen HA ve NA yüzey moleküllerini aday virüsten alan soğuğa adapte bir virüstür. Bu virüsler tekrar embriyonlu yumurtada büyük ölçekli olarak üretilerek soğuğa adapte canlı attenüe aşılar elde edilir. Aşı canlı virüs içeriği için inaktive aşılar göre çok daha hızlı ve güçlü bir immun yanıt oluşturur.

Mevcut canlı attenüe aşılar intranazal-sprey şeklinde uygulanmaktadır. İğne kullanılmadan aşılamayı mümkün kılması, bir pandemi durumunda toplu aşılamayı özellikle çocukların toplu aşılanmasını kolaylaştırır. Araştırmalar bu aşıların kronik hastalarda ve yüksek riskli hastalarda da oldukça iyi sonuç verdiğini hatta heterojen suşlara karşı çapraz koruma da sağladığını göstermiştir ¹²¹. Tüm bu avantajlarının yanında, canlı attenüe aşılar enfeksiyöz orijinal virüs tipine geri dönüşebilir, canlı virüs saçılımına neden olabilir ve istenmeyen reaksiyonlar oluşturabilir. Ancak, araştırmacılar bu tip aşıların yukarıda sayılan dezavantajlarının avantajları yanında minör düzeyde olduğuna, bu aşıların toplum sağlığı açısından önemli olduğuna vurgu yapmaktadırlar ¹²² ¹²³. Ülkemizde bu aşılar kullanıma girmemiştir.

2.12.2. Hücre Kültüründe Üretilen İnaktif Bütün-Virüs Aşıları

Aşı üretiminde hücre kültürü yönteminin embriyonlu yumurta yöntemine (klasik yöntem) kıyasla birçok avantajı bulunmaktadır. Bunlardan bazılarını şöyle sıralayabiliriz: geleneksel yöntemle kıyasla hücre kültüründe aşı üretimi hızlı olması nedeniyle bu yolla aşı üretilmesinin üretim kapasitesini %25 oranında artıracakı düşünülmektedir. Ayrıca klasik yöntemde aşıların üretimi 5-6 ay alırken, hücre kültüründe aynı miktar aşı 1-3 ay gibi bir sürede üretilmektedir. Bunun yanı sıra, hücre kültüründe üretim teknolojisi yumurta teknolojisine kıyasla daha kapalı bir sistem olduğu için, gerek aşının gerekse çevrenin kontamine olma riskini önemli ölçüde azaltmaktadır ¹²⁴ ¹²⁵. Yumurta alerjisi olan ve bu nedenle aşı yaptıramayan bireyler için hücre kültürü aşıları bu sorunu ortadan kaldırmaktadır. Aşı içeriğinde yer alacak virüs seçilirken bir sonraki sene dolaşımda olma olasılığı en yüksek aday suş belirlenir. Ancak, belirlenen aday suş kimi zaman yumurtada optimum düzeyde üreme özelliğine sahip olmadığı için aşı içeriğine alınmamakta, bunun yerine aday suşa antijenik olarak en yakın suş aşı içeriğine alınmakta bu da aşının etkinliğini azaltmaktadır. Buna karşın, hücre kültüründe böyle bir sorunla karşılaşılmamıştır. Bugüne kadar çalışılan tüm influenza virüslerinin uygun hücre kültürlerinde optimum düzeyde üredikleri gözlenmiştir ¹²⁴. Buna ek olarak virüsler yumurtada üremeye adapte edilme aşamasında

immünojenitelerinin de azaldığı bilinmektedir. Hücre kültüründe böyle bir sorunla karşılaşılmamıştır ¹²⁴. Son ve belki de en önemli olarak da olası bir pandeminin patojenitesi yüksek bir avian influenza virüsü ile gerçekleşmesi durumunda karşılaşılabilecek embriyonlu yumurta açığı sorunudur. Böyle bir durumda tavukların da hastalanması durumunda aşı üretimi için gerekli yumurta bulmak kolay olamayacaktır. Hücre kültürleri bu sorunu da ortadan kaldırmaktadır. Aşı üretiminde kullanılmak üzere, Madin Darby Köpek Böbrek Hücreleri (Madin-Darby Canine Kidney Cells-MDCK , Afrikan Yeşil Maymun Böbrek Hücreleri (African Green Monkey Kidney Cells-VERO) ve Ölümsüzleştirilmiş Embriyonik İnsan Retinal Hücreleri (PER.C6) DSÖ tarafından onay almıştır.

Aşı üretiminde sağlanan en önemli gelişmelerden biri tersine genetik (Reverse genetics) metodu kullanılarak tohum virüslerin elde edilmesidir. Bu yöntem, klasik harmanlama yöntemine kıyasla daha az emek yoğunudur ve daha kısa sürede tohum virüs elde edilmesini sağlamaktadır.

2.13. Tedavi

Virüsler yaşam döngülerini konak hücreyi kullanarak tamamlarlar. Bu nedenle konak hücreye zarar vermeyen antivirallerin tasarlanması kolay bir süreç değildir. Ancak, moleküler tekniklerin geliştirilip virüslerin moleküler yapıları ve virüs-konak hücre interaksiyonlarının moleküler düzeyde ortaya konmasıyla viral hastalıkların tedavisi için geliştirilen antiviral sayısı da artışa geçmiştir. Günümüzde influenza tedavisinde aşağıda ayrıntılı olarak irdelenecek olan iki grup antiviral kullanılmaktadır: M2 blokörleri (adamantanlar) ve Nöraminidaz inhibitörleri (NAI/NI).

2.13.1. M2 İyon Kanalı Blokörleri (Adamantanlar)

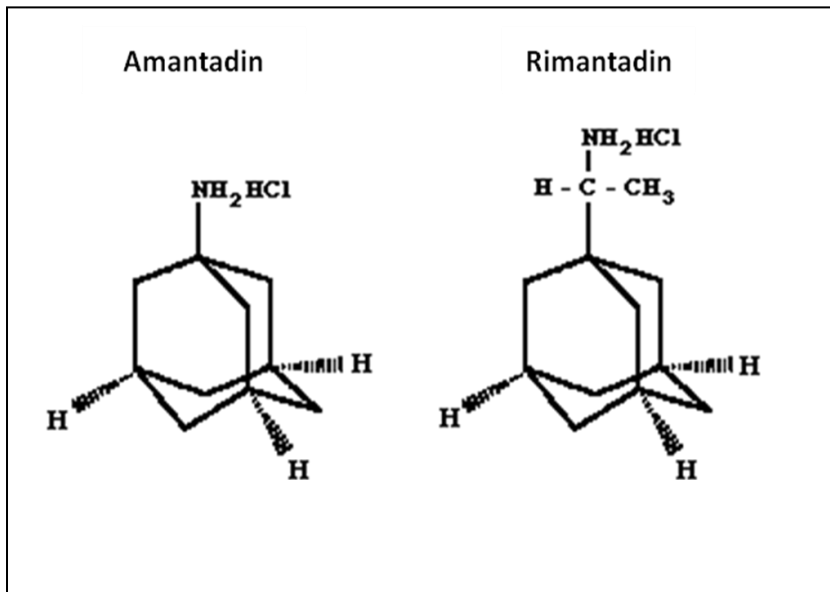
2.13.1.1. Amantadin ve Rimantadin

Amantadin ve Rimantadin influenza A virüslerinin M2 proteininin fonksiyonunu bozarak antiviral etki gösterirler. Söz konusu antiviraller influenza A virüslerinin M2 kanalına bağlanarak oluşturdıkları konformasyon değişikliğiyle iyon kanalını oluşturan bölgenin yapısını dolayısıyla işlevini de bozarlar; ancak bu grup antivirallerin influenza B ve C virüslerine karşı antiviral etkileri bulunmamaktadır ¹²⁶.

Amantadinin influenza A/H2N2 virüslerine karşı antiviral etkinliğinin bulunduğunu ilk olarak 1963 yılında Illinois Üniversite Hastanesinden (ABD) George

Gee Jackson bildirmiştir ¹²⁷. H2N2 virüsü inoküle edilen gönüllülere günlük olarak uygulanan amantadinin enfeksiyonu önlediğini bildiren araştırmacı, takip eden klinik çalışmalarla amantadinin klinik semptomları %70 oranında azalttığını saptamıştır. Daha sonra Davis ve ark. ¹²⁸ adamantanların influenza H2N2 virüslerine karşı antiviral etkinliğini laboratuvar deneyleriyle saptamış ve bunun üzerine amantadin 1966 yılında H2N2 virüslerine karşı kullanılmak üzere FDA'dan onay alan ilk antiviral olmuştur. 1968 yılında ortaya çıkan A/H3N2 salgınında kullanımı gündeme gelen amantadinin yeni virüse karşı etkinliğinin sadece hücre kültüründe gösterilip, klinik çalışmalarla saptanamamış olması bilim dünyasında tartışma yaratmıştır. Bu tartışmalar sonucunda amantadin H3N2 epidemisinde neredeyse hiç kullanılmamıştır ¹²⁹. Aynı dönemde, İngiltere, Çekoslovakya, Hollanda, İsviçre ve Sovyetler Birliğinde yapılan büyük çaplı araştırmalar amantadinin sadece H2N2 ve H3N2 virüslerinin değil tüm influenza A virüslerinin neden olduğu enfeksiyonlarında semptomları büyük ölçüde azalttığını göstermiştir. Bu çalışmaların sonucunda elde edilen bulguların doğrultusunda FDA 1976 yılında amantadinlerin influenza A enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılması için onay vermiştir ¹²⁹.

Adamantanlar, C-10 primer amin yapısında, ısıya dayanıklı simetrik yapıda moleküllerdir (Şekil 2.15). Bu temel yapı üzerinde bazı kimyasal değişiklikler yapılarak birçok bileşik elde edilmiş ancak bu yeni üretilen bileşiklerden sadece rimantadinin anti influenza etkisi olduğu saptanmıştır ¹²⁶.



Şekil 2-15: Amantadin ve amantadin derivatifi olan rimantadinin kimyasal yapısı.
[Kaynak 126'dan uyarlanmıştır].

Amantadinin enfeksiyondan 1 saat ve 72 saat önce tek doz halinde verilğinde koruyucu etki gösterdiği saptanmıştır. Fare ve gelinciklerde yapılan çalışmalar, rimantadinin etkinliğinin amantadine kıyasla daha üstün olduğunu göstermiştir ¹²⁶.

Amantadin plazmadan tamamen renal-tubuler yol ve glomerular filtrasyonla; rimantadin ise %65 hepatik, %20 renal metabolizma ve %15 de değişikliğe uğramadan renal yolla atılır. Renal yetmezlik durumunda klinik belirti göstermeksizin birikime neden olurlar. Kronik karaciğer hastalığının rimantadin farmakokinetiğini değiştirmedini göstermiştir. Ancak karaciğer yetmezliği ileri derecede olanlarda karaciğer atılımının %50 azaldığı bildirilmiştir. Amantadinlerin yan etkileriyle ilgili sürdürülen çalışmaların sonucunda 200 mg günlük amantadin kullanımına bağlı olarak bireylerin %7'sinde sinir sistemi bozukluğunun (uykusuzluk, hafif sersemlik, sinirlilik, konsantrasyonda zorlanma, baş dönmesi gibi) görüldüğü bildirilmiştir. Geçici olan bu semptomların ilaç alındıktan sonraki bir kaç saat içinde gözlemlendiği bildirilmiştir. Ancak, toksik doz ile terapötik doz aralığının düşük olması nedeniyle özellikle kronik hastalarda dozaj ayarının önemine vurgu yapılmıştır ¹²⁶.

Amantadin ve rimantadinlerin antiviral etkinliklerinin saptanmasının hemen sonrasında yapılan çalışmalar bu ilaçlara karşı hızla direnç geliştiğini göstermiştir. Örneğin, virüslerin adamantanlarla hücre kültüründe yalnızca bir kez pasajlanmasından sonra direnç geliştiği bildirilmiştir ¹³⁰. In-vivo çalışmalarda ise seri olarak tedavi almış farelerde direnç gelişimine rastlanmadığına dair sonuçlar bildirilmiş olmasına karşın, tedavi altındaki farelerde direncin kolayca geliştiğini bildiren çalışmalar da yayınlanmıştır ^{131,132}. Bu çalışmaları takiben 1979'lu yıllarda CDC'den Gary Noble hücre kültüründe amantadine karşı hızla direnç geliştiğini ve bunun endişe verici olduğunu ancak insanlardan henüz dirençli suş elde edilmemiş olmasının önemini vurgulamıştır ¹²⁹. İnsanlarda ilk olarak 1981 yılında Berlin'deki bir epidemi sırasında izole edilen 21 influenza A/H3N2 virüsünün 2'sinde amantadinlere karşı direnç bildirilmiştir ¹³³. Amantadin ve rimantadine dirençli suşların sekanslanmasıyla tek bir amino asit rezidüsünde meydana gelen değişimin bile dirence yol açabileceği gösterilmiştir. Bu residülerin M2'nin membrana gömülü bölgesinde yer alan 26, 27, 30, 31 ve 34'üncü amino asitler olduğu ve amantadine direnç geliştiren virüslerin rimantadinlere karşı da direnç geliştirdikleri saptanmıştır ^{134,135}.

Amantadin ve rimantadin 1966'da FDA'dan onay almış olmasına rağmen geniş kullanım alanı bulamamıştır. Bunun nedenleri arasında: 1- Sadece influenza A virüslerine karşı etkin olmaları, 2- Hızla direnç gelişimi, 3- İstenmeyen yan etkiler ve ağır hastalardaki etkinliklerinin netlik kazanamamış olması sayılabilir. 2005-2006 yıllarında CDC'nin yaptığı bir çalışmayla ABD'de dolaşımdaki influenza A virüslerinin %91'inin amantadin ve rimantadine dirençli olduğu saptanmış ve bunu takiben 2005-2006 sezonunda bu antivirallerin profilaksi ya da tedavi amaçla kullanılmasının önerilmediğini bildirmiştir ¹³⁶. Patojenitesi yüksek H5N1 virüslerinin de bu ilaçlara karşı dirençli oldukları bildirilmiştir ⁴².

Ülkemizde influenza enfeksiyonlarının tedavisi amacıyla adamantanlar kullanıma girmemiştir.

2.13.2. Nöraminidaz İnhibitörleri

İnfluenzanın profilaksisinde ve tedavisinde kullanılan adamantanların yukarıda sayılan nedenlerden ötürü geniş kullanım alanı bulamaması influenzaya karşı etkin ve güvenilir yeni ilaç araştırmalarının gerekliliğini ortaya koymuştur.

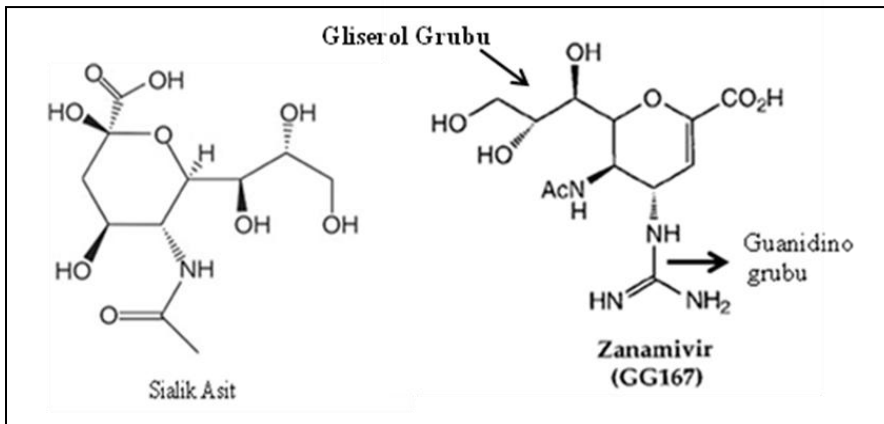
1966 yılında bir grup araştırmacı antiviral aktivitesi olabileceği düşüncesiyle influenza nöraminidaz molekülüne karşı inhibitör taramalarına başlamıştır ^{54,137}. Bu tür inhibitör araştırmaları sırasında nöraminidaz enziminin bilinmeyen fonksiyonları da ortaya çıkarılmıştır. Örneğin, virüsün çoğaldıktan sonra konak hücreden ayrılması için nöraminidaz aktivitesinin gerekli olduğu ortaya konmuştur. Nöraminidaz inhibitörü araştırmalarındaki devrim NA molekülünün kristalize edilip üç boyutlu yapısının ortaya konmasıyla gerçekleşmiştir. Bu gelişmelerle NA molekülünün bilinen tüm influenza A alt tiplerinde ve influenza B virüslerinde tamamen korunmuş aktif bölgesinin (siyalik aside bağlanan ve katalizasyonu sağlayan bölgesinin) üç boyutlu yapısı saptanmış ve takip eden inhibitör araştırmaları enzimin aktif bölgesinin üç boyutlu yapısı gözönüne alınarak gerçekleştirilmiştir ^{54,137,138}. Bu bilgilerin ışığında N2 ve N9 molekülünün yapısal özellikleri baz alınarak kompetitif inhibisyon yoluyla etkinlik göstermesi hedeflenen iki siyalik ait analogu geliştirilmiştir ⁷². Nöraminidaz inhibitörleri NA molekülüne bağlanarak enzimi etkisiz hale getirirler. NA enziminin etkisiz kalması ile virionların konak hücreden ayrılması imkânsızlaşır; dolayısıyla enfeksiyonun yayılımı engellenir (Bkz. Şekil 2.13). Adamantanların aksine, hem influenza A, hem de B virüslerine karşı etkili olan siyalik asit analoglarından zanamivir ve oseltamivir sırasıyla

26 Temmuz ve 27 Ekim 1999'da influenzanın profilaksi ve tedavisinde kullanılmak üzere FDA'dan onay almıştır.

Nöraminidaz inhibitörlerinin tasarımının N2 ve N9 molekülleri baz alınarak yapılmış olması ve in-vitro direnç çalışmalarının N2 virüslerinde gerçekleştirilmiş olması nedeniyle mutasyonla değişen rezidüler genel olarak N2 molekülü baz alınarak numaralandırılmaktadır. Örneğin, H1N1 virüslerinin N1 molekülünde oseltamivir direncine neden olan amino asit değişikliği N2 numaralandırma sistemine göre H274Y olarak bildirilmektedir. Oysa N1 virüslerinde bu değişim 274. değil, 275. amino asit rezidüsünde meydana gelmektedir. Son zamanlarda araştırmacılar bu karışıklığın önüne geçmek amacıyla mutasyonları bildirirken N2 numaralandırma sistemini değil orijinal molekülün numaralandırma sistemini kullanmaktadırlar (H274Y yerine H275Y gibi)

2.13.2.1. Zanamivir

Nöraminidaz enziminin aktif bölgesi baz alınarak geliştirilen 4-guanidino-2,4-dideksi-2,3-dehidro-N-asetilnöraminik asit bileşiğinin güçlü bir nöraminidaz inhibitörü olduğu ortaya konmuş; bir siyalik asit analogu olan bu bileşik zanamivir olarak adlandırılmıştır (Şekil 2.16).

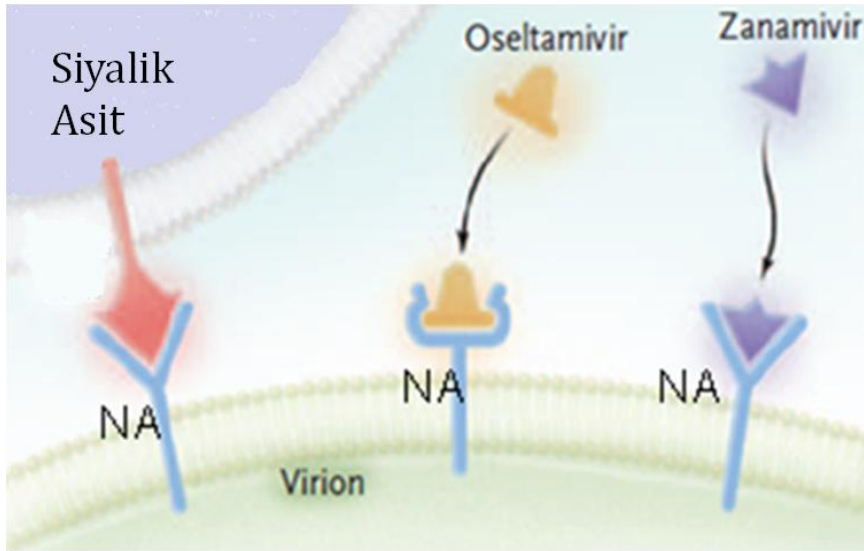


Şekil 2-16: Siyalik asit (Neu5Ac) ve siyalik asit analogu zanamivirin kimyasal yapıları.

Zanamivirini çerdığı gliserol grubu (OH-OH-OH) bu antiviralin hidrofilik özellikte olmasını sağlar. [Kaynak 139'dan uyarlanmıştır].

Zanamivir, yapısındaki polar gliserol ve guanidino grupları sayesinde influenza nöraminidaz enziminin aktif bölgesine yüksek affinite gösterir ¹³⁹. Siyalik asit, zanamivir ve oseltamivirin C2 karbonuna bağlı bulunan karboksilat grubu, NA molekülünün yapısındaki R118, R292, ve R371 amino asit rezidülerinin oluşturduğu pozitif yüklü bölgeye bağlanır. Yine siyalik asit, zanamivir ve oseltamivirin yapısında

bulunan amino nitrojen yan zinciri de NA yapısındaki R152 (B virüslerinde R150) amino asit rezidüsü ile hidrojen bağı kurar. Bunlara ek olarak sadece zanamivirin C4 karbon bölgesine bağlı olarak bulunan guanidino grubu, NA yapısındaki E119 ve E227'inci rezidülerdeki amino asidin (Glu) oluşturduğu negatif yüklü bölgeye yüksek affiniteyle bağlanır ki bu özellik zanamivirin güçlü bir antiviral olmasını sağlar. Zanamivirin C6 karbon bölgesindeki gliserol yan zinciri de NA yapısındaki R224 ve E276 amino asit rezidüleri ile ilişki kurar ¹⁵. Zanamivirin, NA molekülüne bağlanması enzimin aktif bölgesinde morfolojik değişime neden olmazken oseltamivirin bağlanması değişime neden olur (Şekil 2.17). Bu nedenle NA molekülünde meydana gelen ve oseltamivir direncine neden olan bazı mutasyonlar zanamivir direncine neden olmazlar.



Şekil 2-17: Siyalik asit, oseltamivir ve zanamivirin NA molekülüne bağlanmaları.

Görüldüğü gibi siyalik asit ve zanamivir bağlanma sırasında NA yapısında morfolojik değişikliğe neden olmazken, oseltamivirin NA molekülü üzerindeki reseptöre bağlanabilmesi için NA molekülünün morfolojik değişim geçirmesi gerekmektedir. [Kaynak 140'dan uyarlanmıştır].

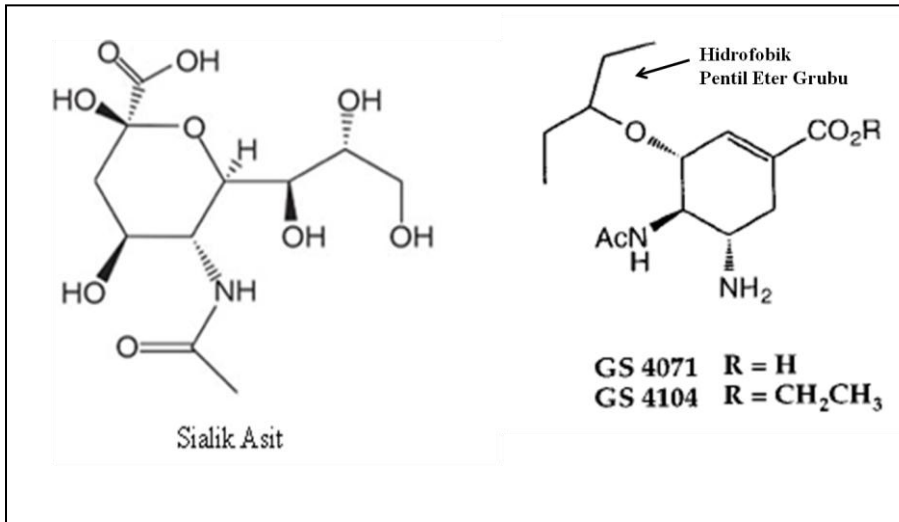
Hidrofilik yapısı nedeniyle barsaklardan emilimi kısıtlı olan, bu nedenle ağızdan yutulduğunda biyoyararlılığı oldukça düşük olan zanamivirin en etkin uygulama yolunun ağızdan inhalasyon olduğu, profilaktik ve tedavi dozlarında uygulandığında teratonejik ve karsinojenik bir özelliğinin bulunmadığı, influenzanın tedavisinde kullanılabilecek muhtemel ilaçlarla kullanımında çapraz etkileşim görülmediği ortaya konmuştur ¹³⁸. Deneysel çalışmalar bu bileşiğin influenza nöraminidazına spesifik olduğunu, memeli nöraminidaz enzimlerine karşı ise kısmen etkili olduğunu göstermiştir ^{137 138}. İdrar yoluyla değişime uğramadan atılan zanamivirin böbrek

hastalarında da dozaj değişimi yapılmadan inhalasyon yoluyla kullanılabileceği gösterilmiştir ¹³⁸.

İnfluenza gibi sürekli mutasyon geçiren bir virüse karşı ilaç geliştirilirken ilaç direnç çalışmalarının da öncelikli olarak gerçekleştirilmesi gerekmektedir ¹³⁷. Bu bağlamda, in-vitro aktivitesi MDCK hücre kültüründe saptanan zanamivirin IC_{50s} değerinin oldukça düşük olduğu ve tekrarlanan pasajlarda direnç gelişiminin gözlenmediği bildirilmiştir ¹⁴¹.

2.13.2.2. Oseltamivir

Zanamivirin oral yolla uygulandığında biyoyararlılık oranının çok düşük olması, oral yolla uygulanabilir antiviral arayışlarını gündeme getirmiştir. Oseltamivir de zanamivirde olduğu gibi N2 nöraminidaz enziminin aktif bölgesinin morfolojik ve kimyasal özelliği baz alınarak tasarlanmıştır ¹⁴². Kimyasal adı (3R,4R,5S)-4-asetilamino-5-amino-3(1-etilpropoksi)-1-sikloheksen-1-karboksilik asit, etil ester, fosfat (1: 1) olan oseltamivirin fosfat (pro-drug) ve karboksilat formları (aktif ilaç) Şekil 2.18’de gösterilmiştir.



Şekil 2-18: Sialik asit ve analogu oseltamivir fosfat (GS 4071) ve oseltamivir karboksilatın (GS 4104) kimyasal yapısı. Ac= asetil. Oseltamivir fosfat molekülünde R ile gösterilen bölgeye H, Oseltamivir karboksilat molekülünde ise R ile gösterilen bölgeye CH₂CH₃ grubu eklenmiştir. [Kaynak 139 ve 143’den uyarlanmıştır].

Oseltamivir, sialik asitteki şeker halkası yerine sikloheksen halkası, C4 bölgesinde amino grubu içerir. C6 bölgesinde ise zanamivirin aksine gliserol yan zinciri yerine hidrofobik (lipofilik) pentil eter grubu içerir. Bu özellik oseltamivirin hücre içine

penetre olmasını sağlar ¹⁵. Oseltamivir, hidrofobik yan zincirler aracılığı ile NA enziminin aktif bölgesine bağlanırken aktif bölgenin morfolojisinin değişimi ile sonuçlanan hidrofobik bir kovuğun oluşmasını indükler ve kurduğu güçlü hidrofobik bağlar sayesinde kovuk içine tutunur (Şekil 2.17).

İn-vitro çalışmalarla güçlü bir NA inhibitörü olduğu ortaya konan oseltamivirin MDCK, VERO, MRC-5 ve 293 hücrelerinde yapılan çalışmalarla sitotoksik etkisinin bulunmadığı gösterilmiştir ¹⁴². Bu veriler ışığında oseltamivirin oral yolla kullanımının uygunluğunu araştıran in vivo çalışmalar başlatılmış; oseltamivir fosfat (GS 4104) oral yolla fare ve gelinciklere uygulanmış ve bileşiğin aktif ilaç oseltamivir karboksilata (GS 4071) metabolize olarak influenzaya karşı sistemik etkin bir koruma sağladığı gösterilmiştir ¹³⁹. Oral yolla alınan oseltamivir fosfatın %80'inin sistemik olarak emildiği, emilen oseltamivir fosfatın karaciğer esterazları tarafından aktif ilaç oseltamivir karboksilata dönüştürüldüğü saptanmıştır ¹⁴⁴. Oseltamivir karboksilatın yarı ömrünün 6-10 saat olup büyük çoğunluğunun glomerular filtrasyon ve tubuler sekresyonla atıldığı, metabolize olmayan oseltamivir fosfatın da yine aynı yolla atıldığı, bu nedenle böbrek hastalarında doz ayarı yapılması gerektiği bildirilmiştir ¹⁴⁴.

Zanamivirde olduğu gibi oseltamivire karşı da direnç gelişiminin oldukça sınırlı olduğu gösterilmiştir. Örneğin, oseltamivire karşı direncin hücre kültüründe 10, in vivo ortamda ise 20 pasajdan sonra geliştiği gösterilmiştir ³⁶.

2.13.3. Nöraminidaz İnhibitörleri ve Direnç

Nöraminidaz inhibitörlerinin dünyanın çeşitli bölgelerinde 1999-2000 yıllarında kullanıma girmesinden sonra olası direnç gelişimini izlemek üzere kurulan NISN, DSÖ tarafından koordine edilen GISN aracılığı ile elde edilen klinik izolatları inceleyerek nöraminidaz inhibitörlerine karşı direnç durumunu takip etmektedir.

İnfluenza A virüslerinin hücre kültüründe nöraminidaz inhibitörlerinin baskısı altında uzun süre pasajlanması sonucu bu antivirallere karşı direnç mutasyonları saptanmıştır ^{5,145}. Ancak, direnç gelişimi zanamivire kıyasla oseltamivire karşı daha sıklıkla gözlenmiştir ¹⁴⁶. Adamantanlarla kıyaslandığında ise direnç gelişiminin nöraminidaz inhibitörlerinde oldukça zor olduğu ve direnç oranının da düşük olduğu bildirilmiştir ³⁶.

2001 yılında influenza ile doğal enfeksiyon geçiren ve oseltamivir tedavisi alan 2500 kişiden alınan örneklerden yapılan direnç mutasyonu araştırmasında in vitro verilere uyumlu olarak çok düşük oranda R292K (N2 virüslerinde) ve bir tane de H274 (N1 virüslerinde) mutasyonu saptanmış, influenza B virüslerinde ise direnç mutasyonu saptanmamıştır ¹⁴⁷. Önemli klinik verilerin elde edildiği bu çalışma influenza A virüslerinde saptanan R292K, H274Y ve E119V mutasyonlarının oseltamivir baskısıyla, Gubareva ve ark. ^{147,148} ise B virüslerinde saptanan R152K mutasyonunun zanamivir baskısıyla oluştuğunu göstermiştir. R292K mutasyonu taşıyan influenza A virüsleri ile yapılan hayvan deneylerinde orijinal suşlarla kıyaslandığında, mutant suşların gelinciklerde infektivite ve replikasyon yeteneğinin düşük olduğu gösterilmiştir ¹⁴⁹. Bununla beraber, dirençli virüs izole edilen hastaların klinik seyrinin mutasyona uğramamış suşlar izole edilen hastaların klinik seyrinden farklı olmadığı da ileri sürülmüştür ¹⁴⁷.

2005 yılına gelindiğinde zanamivir tedavisi alan hiçbir immunokompetan hastadan tedavi esnasında direnç saptanmamıştır. Buna karşın, nöraminidaz inhibitörleri kullanıma girdikten sonra yapılan klinik çalışmalarda oseltamivire karşı direnç gelişiminin yetişkinlerde %0,4-%1, çocuklarda ise %4-%8 dolaylarında olduğu bildirilmiştir ^{5,144}. Çocuklarda viral saçılımın yetişkinlere göre daha uzun sürmesi ve viral yükün daha yüksek olması, direnç oranlarının çocuklarda yetişkinlere göre daha yüksek olmasını belirleyen faktörler olduğu ileri sürülmektedir ¹⁴⁴.

2008 yılına gelindiğinde in-vitro çalışmalarla, klinik izolatlardan zanamivir ve oseltamivir direncine yol açan birçok mutasyon saptanmıştır (Tablo 2.3 ve Tablo 2.4) 2010 yılına kadar immunokompetan hastalardan izole edilen influenza B virüslerinde oseltamivir ya da zanamivir direnci saptanmamıştır. Ancak, immün sistemi baskılanmış bir çocuktan izole edilen influenza B suşunda zanamivir direnci, R150K, (N2’de R152K) ve bir yetişkinden elde edilen influenza B suşunda da oseltamivir direnci, D197N, (N2’ de D198N) saptanmış, söz konusu iki mutasyonun hem zanamivire hem de oseltamivire karşı direnç gelişimine neden olduğu bildirilmiştir ^{148 150}. 2010 yılına gelindiğinde sağlıklı ve daha önce antiviral kullanmamış bir çocuktan izole edilen influenza B virüsünde D197N (N2 numaralama sistemine göre D198N) mutasyonu saptanmış ve bu mutasyonun her iki nöraminidaz inhibitörüne karşı dirençli olduğu bildirilmiştir ¹⁴⁶.

NA molekülünde meydana gelen mutasyonlardan bazıları hem NA alt tipine hem de kullanılan antivirale özgü olabilmektedir. Örneğin, R292K mutasyonu hem oseltamivir hem de zanamivire karşı direnç oluşturmakla birlikte N2 molekülüne özgüdür. N1 molekülünde revers genetik yoluyla oluşturulan R292K mutasyonunun oseltamivir direnci oluşturmaması, bu direnç mutasyonunun N2 alt tipine özgü olduğunu ortaya koymaktadır ¹⁴⁷. Örneğin, N2, N9 ve B virüslerinde saptanan E119G ve E119A mutasyonları zanamivir direncine neden olmasına karşın oseltamivir direncine neden olmamaktadır. Buna karşın N1 alt tipinde oseltamivir direncine neden olan H274Y mutasyonunun zanamivire karşı direnç oluşturmadığı gözlenmiştir ¹⁵².

Tablo 2-3: İn-vitro ortamda antiviral baskısıyla saptanan direnç mutasyonları.

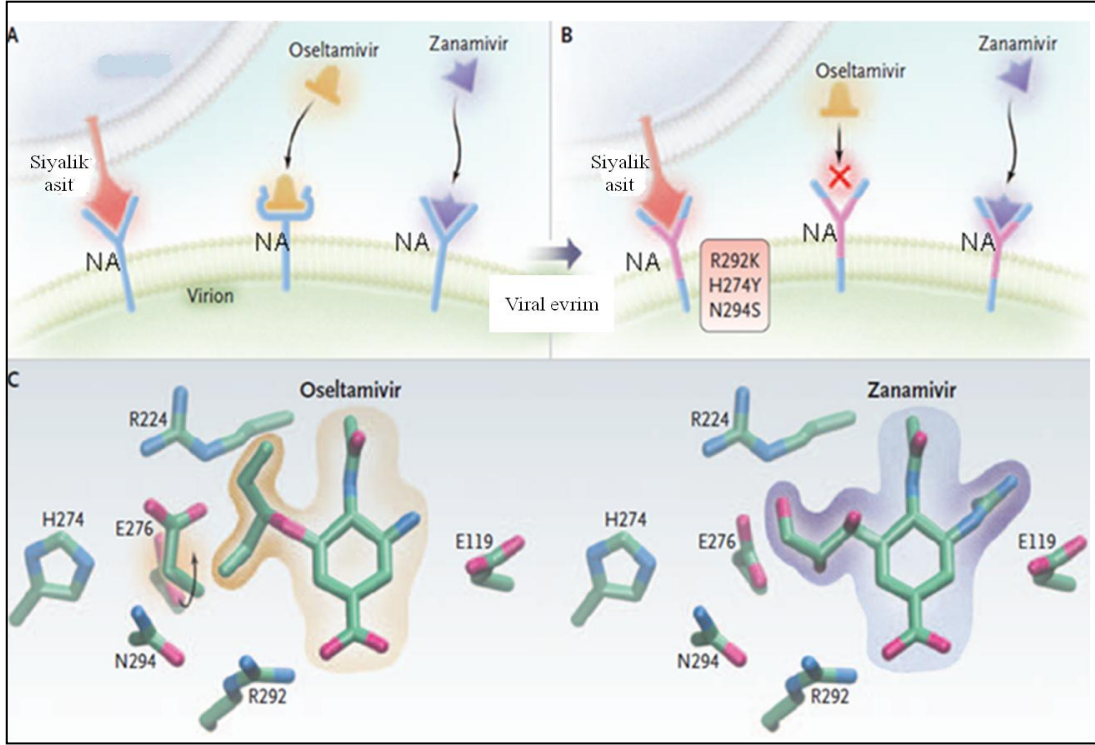
Amino asit numaralandırmaları N2 molekülüne göre yapılmıştır ¹⁵¹. [Kaynak 15 ve 150'den uyarlanmıştır].

Mutasyon	Saptandığı Ortam	Kullanılan Antiviral	Direnç Saptanan NA	Direnç Durumu Zanamivir	Direnç Durumu Oseltamivir	Bildirim Yılı
Katalitik						
Rezidüler						
R292K	İn-Vitro	Zanamivir	N2	Dirençli	Dirençli	2002
	Revers Genetik	-	N2	Dirençli	Dirençli	2005
	Revers Genetik	-	B	Dirençli	Dirençli	2005
D151E	Revers Genetik	-	N2	Duyarlı	Düşük Dirençli	2006
R152K	Revers Genetik	-	B	Duyarlı	Duyarlı	2005
			N2	Duyarlı	Duyarlı	2006
R371K	Revers Genetik	-	N2	Dirençli	Dirençli	2006
R224K	Revers Genetik	-	N2	Dirençli	Dirençli	2006
E276D	Revers Genetik	-	N2	Dirençli	Düşük Dirençli	2006
Çatki						
Rezidüleri						
E119V	Revers Genetik	-	N2	Duyarlı	Dirençli	
E119G	İn-Vitro	Zanamivir	N9	Dirençli	Duyarlı	1995
	İn-Vitro	Zanamivir	B	Dirençli	-	1999
	Revers Genetik	-	B	Dirençli	Dirençli	2005
E119A/D	İn-Vitro	Zanamivir	N2	Dirençli	Duyarlı	1996
E119A/D	Revers Genetik	-	N2	Dirençli	Duyarlı	2006
E119A/D	Revers Genetik	-	B	Dirençli	Dirençli	2005
H274Y	Revers Genetik	-	N2	Duyarlı	Duyarlı	2006
	Revers Genetik	-	N9	Duyarlı	Dirençli	2002
I222V	Revers Genetik	-	N2	-	Düşük Direnç	2006
Q136K	İn-Vitro		N1	Dirençli	Duyarlı	2009

Tablo 2-4: NAI tedavisi almış hastalardan alınan örneklerde saptanan direnç mutasyonları.
[Kaynak 15 ve 150'den uyarlanmıştır].

Mutasyon	Tedavi	Hastanın İmmün Durumu	Direnç Saptanan NA Alt tipi	Direnç Durumu		Bildirim Yılı
				Zanamivir	Oseltamivir	
<i>Katalitik Rezidüleri</i>						
R152K	Relenza	Baskılanmış	B	Dirençli	Dirençli	1998
R292K	Tamiflu	Sağlıklı	N2	-	Dirençli	2002
<i>Framework Rezidüleri</i>						
E119V	Tamiflu	Sağlıklı	N2	-	Dirençli	2006
D198N	Tamiflu	Baskılanmış	B	Duyarlı	Dirençli	2006
H274Y	Tamiflu	Sağlıklı	N1	Duyarlı	Dirençli	2000
N294S	Tamiflu	Sağlıklı	N2	-	Düşük Dirençli	2004
			N1	-	Düşük Dirençli	2005

Oseltamivire karşı direnç gelişiminin zanamivirden daha fazla olması bu iki molekülün NA aktif bölgesine bağlanma özelliğindeki farklılıktan kaynaklandığı düşünülmektedir. Moleküler çalışmalar NA molekülünde oseltamivir yan zincirini içine alan kovuğun oluşması için E276 amino asidinin rotasyon yaparak R224 ile bağ kurması gerekmektedir (Şekil 2.19). R292K, N294S, ve H274Y (H275Y N1) mutasyonları E276'nın rotasyonunu engelleyerek kovuk oluşmasını dolayısıyla oseltamivirin NA'ya bağlanmasını engeller.



Şekil 2-19: Oseltamivire karşı oluşan direncin mekanizması. A: Nöraminidazın aktif bölgesi şekil değiştirerek oseltamivir için bir kovuk (cep) oluşturur; zanamivir için böyle bir değişikliğe gerek yoktur. B: Birçok mutasyondan herhangi biri bu kovuğun oluşumuna engel olarak oseltamivirin bağlanmasına da engel olur. Ama oseltamivire dirençli virüs konak hücre siyalik asit reseptörüne ve zanamivire bağlanabilir. C: Oseltamivir kovuğunu oluşturan amino asitler. E276'nın rotasyon yaparak R224 ile bağ kurar ve kovuğu oluşturur. R292K, N294S, ve H274Y mutasyonları E276'nın rotasyonunu engeller. Böylece kovuk oluşamaz, oseltamivir bağlanamaz ve suş oseltamivire direnç kazanır. E119V mutasyonu valinin küçük olmasından oluşan boşluğa bir su molekülünün bağlanmasını sağlayarak oseltamivirin bağlanmasını engeller. Bu mutasyonların hiç biri zanamivirin ya da siyalik asidin nöraminidaza bağlanmasına engel olmaz. [Kaynak 140'dan uyarlanmıştır].

Zanamivir direncine yol açan ve NA molekülünde en sık gözlenen mutasyon E119G değişimidir. Bazı durumlarda E119D ya da E119A'da gözlemlenmiştir. Daha az sıklıkla da mutasyon 292'nci rezidüde meydana gelmektedir. E119 tüm influenza virüslerinde korunmuş bir residüdür, katalitik bölgede değildir yani bir "framework" residüsüdür ama enzimin yapısını stabilize eder. 119 ve 227'inci amino asitlerdeki E (glutamik asit) ile zanamivirin 4-guanidinum bölgesi arasındaki interaksiyon zanamivirin güçlü bir antiviral olmasını sağlar. Doğal olarak 119.uncu amino asitte meydana gelecek değişiklikler zanamivirin nöraminidaza bağlanma gücünü azaltmak suretiyle etkinliğini de azaltacaktır. Klinik izolatlarda zanamivir direncinin saptanamamasının nedeni olarak ilacın tedavi süresinin (5 gün) dirençli suş oluşumu için yeterli olmaması gösterilmektedir. Uzun süre tedavi alan immun sistemi

baskılanmış bir hastadan izole edilen influenza B suşundan zanamivir direnci saptanmış olması yukarıdaki görüşü desteklemektedir ⁴².

Son yıllarda yapılan bir çalışmada, 2006-2008 yılları arasında Avustralya ve Güneydoğu Asya'dan izole edilen 391 influenza A/H1N1 virüsünün 9 tanesinde (%2,3) zanamivir direncine neden olan ve daha önce tanımlanmamış Q136K mutasyonu saptanmıştır. Bu mutasyonun oseltamivire karşı direnç oluşturmadığı saptanmıştır. Ancak, bu yeni mutasyon primer klinik örnekte saptanamamış, klinik örneğin MDCK hücrelerinde üretilip pasajlanmasından sonra saptanmıştır. Önceki araştırmalardan farklı olarak bu araştırmada Q136K mutasyonunu taşıyan virüsün MDCK hücrelerinde doğal virüs tipine kıyasla daha iyi çoğaldığı ve gelinciklerde imfektivite ve bulaştırıcılığının da doğal virüsten farklı olmadığı saptanmıştır ¹⁵¹.

Kimi zaman direnç gelişimi NA molekülündeki değişime bağlı olmaksızın HA molekülündeki değişimlerle ilgili olarak da gelişebilmektedir. Direnç oluşumu ilk olarak HA molekülünde siyalik asit reseptörüne bağlanma bölgesini çevreleyen residülerde gözlenmiştir. HA molekülünde meydana gelen bu mutasyonlar antiviral etkisiyle azalan nöraminidaz aktivitesini kompanse eder. Şöyle ki, HA molekülünde meydana gelen bu mutasyonlar HA'nın siyalik aside bağlanma afinitesini düşürür, dolayısıyla virüsün konaktan ayrılması için nöraminidaz aktivitesine gereksinimi de azaltır ^{5,42}. Örneğin, H1 molekülünde siyalik aside bağlanma bölgesinin yakınında bulunan residülerde meydana gelen T155A, V223I, R229I, K222T, S186F, S165N mutasyonları HA molekülünün siyalik aside bağlanma afinitesini azaltmakta; bu nedenle tomurcuklanma esnasında NA molekülüne gereksinim azalmaktadır. Bu durumda uygulanan oseltamivir ya da zanamivir etkisiz kalmaktadır ⁵². Hatta HA molekülünde S165N mutasyonu taşıyan virüsler enfeksiyöz olabilmek için nöraminidaz inhibitörüne gereksinim duyarlar. Bir enfeksiyonun gerçekleşebilmesi için HA ve NA moleküllerinin denge içinde olması ve HA molekülünün siyalik asite yeterli afinitesinin olması gerekmektedir. NAI baskısına bağlı olarak HA'nın molekülünde meydana gelen mutasyonların büyük çoğunluğunun zanamivire bağlı olarak olduğu bildirilmiştir ¹⁴⁷.

Sonuç olarak, 2003 yılından beri dünya çapında influenza enfeksiyonlarının tedavisi için kullanılmakta olan nöraminidaz inhibitörlerine karşı karşı direnç gelişiminin minor düzeyde olduğu ve H5N1 avian influenza virüslerine karşı da etkin

olmaları nedeniyle bu virüslerle gerçekleşebilecek bir pandemiye karşı savunmada major rol alacakları bildirilmiştir ^{5,6}. 2005 yılına gelindiğinde ülkemiz dahil birçok ülke pandemi hazırlık planları dahilinde NI stoklamayı hedeflemiştir. Ancak, 2007 yılının sonlarına kadar çok düşük düzeyde direnç bildirilmesine karşın 25 Ocak 2008 tarihinde Norveç'te oseltamivir direncinin A/H1N1 alt tipinde önemli derecede arttığının bildirilmesi pandemi korkusu içinde olan tüm dünya ülkelerini direnç sorunu konusunda alarma geçirmiştir ^{5,6,14,16,17}. Bu bağlamda ülkemizin iki Ulusal İnfluenza Referans Laboratuvarından biri olan İTF laboratuvarında antiviral direnç çalışmaları başlatılmıştır.

2.13.4. Antiviral Direnç Saptama Yöntemleri

Antivirallere karşı direnç gelişimi, fenotipik ve genotipik olmak üzere iki yöntemle saptanabilmektedir. Bir nevi antiviral etkinlik deneyi olan fenotipik direnç saptama yönteminde, virüs hücre kültürlerinde söz konusu antiviralin çeşitli konsantrasyonları varlığında çoğaltılarak antiviralin virüsün çoğalması üzerine etkisi araştırılır. Bunu takiben fenotipik olarak antivirale karşı dirençli olduğu saptanan virüslerin genetik analizi yapılarak dirence neden olan mutasyon saptanır.

Adamantan grubu antivirallerde fenotipik direnç çalışmasında plak deneyi ve ELISA olmak üzere iki yöntem kullanılmıştır ¹⁵³. Yaygın olarak kullanılan olan plak yöntemi, standart titrasyondaki virüsün hücre kültüründe oluşturduğu plak sayısında %50 azalmaya neden olan antiviral konsantrasyonunun belirlenmesi esasına dayanmaktadır ^{77, 153, 154}. ELISA deneyi ise, virüsün oluşturduğu plaklar yerine, antiviral etkisiyle enfekte hücre üzerinde eksprese edilen HA miktarındaki azalmanın saptanması esasına dayanmaktadır ¹⁵³. Plak deneyinde, plak oluşumunu %50 oranında inhibe eden amantadin konsantrasyonu duyarlı suşlarda 0.1 µg/ml ya da ≤5µM olarak bildirilmiştir ^{77,154}. Adamantanlarla yapılan fenotipik direnç çalışmaları sonucunda elde edilen dirençli virüs varyantlarıyla yapılan çalışmalar, dirence neden olan genetik belirteçlerin M2 geni üzerinde olduğunu ortaya koymuştur ^{77,153,154}. Günümüzde adamantan direncine neden olduğu bilinen toplam 5 mutasyon saptanmıştır (L26F, V27A, A30T, S31N G34E).

Nöraminidaz inhibitörlerine karşı fenotipik direnç araştırma yöntemleri, NA enziminin aktivitesi baz alınarak geliştirilmiştir. Bu bağlamda NA aktivitesinin ölçümüne dayanan iki fenotipik direnç saptama yöntemi bulunmaktadır: floresan (FL) ve kemiluminesan (CL) yöntemler. Her iki yöntem de NAI'lerinin virüsün NA

aktivitesinde %50 oranında azalmaya neden olan antiviralin konsantrasyonunu belirlemek amacıyla gerçekleştirilmektedir ^{155,156}. Floresan yöntem yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemle göre NA aktivitesinin %50 oranında azalmasına neden olan oseltamivir konsantrasyonu (IC₅₀) duyarlı izolatlarda 1.66 nM, zanamivir konsantrasyonu ise 1.17 nM olarak bildirilmiştir ¹⁶. Genotipik direnç ise fenotipik direnç saptanan virüslerin NA geni dizileme ile incelenerek dirence neden olan mutasyonların saptanmasıyla gerçekleştirilmektedir.

Adamantan direncine neden olan mutasyonlar NI'leri direncine neden olan mutasyonlara göre daha stabildir. Örneğin dirence neden olan yukarıda sıralanan beş mutasyondan farklı bir mutasyon uzun yıllardır bildirilmemiştir. Ancak NI'lerine karşı yeni direnç mutasyonları günümüzde de saptanmaktadır ¹⁴⁶. Bu nedenle özellikle NI'lerine karşı olası yeni mutasyonların saptanması için fenotipik direnç çalışmalarının rutin olarak gerçekleştirilmesi gerekmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Antiviral Direnç Çalışmasında Kullanılan Örnekler

Bu çalışma, influenza sürveyansı kapsamında 2007-2008 ve 2008-2009 sürveyans sezonlarında İTF Ulusal İnfluenza Referans Laboratuvarına Antalya, Bursa, Edirne, İstanbul ve İzmir illerinden İBH ön tanısı ile gönderilen örnekleri kapsamaktadır. Bu bağlamda, 2007-2008 sürveyans sezonunda toplam 524, 2008-2009 sürveyans sezonunda ise toplam 580 burun sürüntüsü örneği influenza virüsleri açısından incelenmek üzere laboratuvarımıza ulaştırılmıştır. Bu örneklerden izolasyon, tiplendirme ve alt tiplendirme sonucunda elde edilen influenza A virüslerinden RNA ekstraksiyonu yapılmış, dizileme çalışmaları için yeter miktarda RNA sağlanan izolatlar antiviral direnç çalışmasında kullanılmıştır.

3.2. Hücre Kültürü ve Virüs Ekimi İçin Kullanılan Gereçler

Hücre kültürü çalışmalarında pozitif standart suş olarak Ulusal İnfluenza Merkezi, Lyon, Fransa tarafından gönderilen A/Solomon Islands/3/2006 (H1N1), A/Wisconsin/67/2005 (H3N2) ve B/Malaysia/2506/2004 suşları; negatif kontrol olarak serumsuz ekim besiyeri kullanılmıştır.

1. Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) hücresi, Ulusal İnfluenza Merkezi, Lyon, Fransa
2. Minimum Essential Medium 500ml 1X, Gibco, Ref No: 31095-029
3. Fetal Sığır Serum, Biochrom, Ref No: S 0113
4. Tripsin-EDTA 1X, Sigma, Ref No: T3924
5. Sodyum bikarbonat solüsyonu %7,5, Sigma, Ref No: S8761
6. Penisilin-Streptomisin çözeltisi, Sigma, Ref No: 4333
7. Steril fosfat tamponlu su (PBS) pH 7,2
8. Dimetilsülfoksit (DMSO), Sigma Ref No: D5879
9. Tripsin TPCK 50 mg, Sigma Ref No: T8802
10. 25 cm³'lük hücre kültür flaskı, Orange Scientific Ref No: 2010100
11. 75 cm³'lük hücre kültür flaskı, Orange Scientific Ref No: 2010200
12. 24 kuyucuklu hücre kültür plağı, Orange Scientific Ref No: 20000542
13. Kriyotüp 1,8 ml'lik, Nunc, Ref No: 375418
14. Tek kullanımlık pipetler (1, 10, 25 ml'lik)

15. Saklama kutusu MAX100, Nunc, Ref No: 374187
16. Pipetör, Powerpette Prizma
17. Laminar Akım Kabini, Heraeus Instruments, Tip: HS9, Almanya
18. İnvert mikroskop, Nikon, Model: TMS, Japonya
19. Vorteks karıştırıcı, Zx 3 Velp Scientifica , Model: Fuse T, İtalya
20. Soğutuculu santrifüj, Jouan CR312, Thermo Elektron, ABD
21. Benmari, Elektromag, Model: M96K, Türkiye
22. CO₂'li etüv, Heraeus Instruments, Almanya
23. Etüv, Heraeus Instruments, Model: Rb500, Almanya
24. Bidistile su cihazı, Milli-Q RG, Millipore, ABD
25. Buzdolabı +4 °C, Arçelik, Türkiye
26. Derin dondurucu –86 °C, Thermo Electron Corporation, Model: 706, ABD

3.3. İmmun-Yakalama (Immun--Capture) ELISA Deneyi için Kullanılan Gereçler

1. Fareden elde edilmiş anti-İnfluenza A monoklonal antikoru, Ulusal İnfluenza Merkezi, Lyon, Fransa, Ref No: T17C2
2. Fareden elde edilmiş anti-İnfluenza B monoklonal antikoru, Ulusal İnfluenza Merkezi, Lyon, Fransa, Ref No: 8F10E10
3. Fareden elde edilmiş anti-İnfluenza A (H3N2) poliklonal antikoru, Ulusal İnfluenza Merkezi, Lyon, Fransa, Ref No: 21 21 748
4. Fareden elde edilmiş anti-İnfluenza A (H1N1) poliklonal antikoru, Ulusal İnfluenza Merkezi, Lyon, Fransa, Ref No: 21 21 750
5. Fareden elde edilmiş anti-İnfluenza B poliklonal antikoru, Ulusal İnfluenza Merkezi, Lyon, Fransa, Ref No: 21 21 755
6. İnfluenza A/Panama/2007/99 (H3N2) referans antijeni, Ulusal İnfluenza Merkezi, Lyon, Fransa
7. İnfluenza A/New Caledonia/20/99 (H1N1) referans antijeni, Ulusal İnfluenza Merkezi, Lyon, Fransa
8. İnfluenza B/Hong Kong/330/01 referans antijeni, Ulusal İnfluenza Merkezi, Lyon, Fransa
9. ABTS 5 mg 20 tablet, Roche Diagnostics, Ref No: 1 204 521
10. ABTS tamponu 125 ml, Roche Diagnostics, Ref No: 1 204 530

11. HRP ile konjuge keçiden elde edilen anti-tavşan antikoru Biosource, Ref No: ALI3404
12. Triton X-100 100 ml, Sigma, Ref No: T-8787
13. Sığır albümin fraksiyon V 500 gr, Sigma Ref No: A-4503
14. Tween 20, Merc, Ref No: 8 22184 0500
15. Mikroplak 96 kuyucuklu düz tabanlı, Nunc Ref No: 439454
16. Falkon santrifüj tüpü 50 ml, Nunc, Ref No: 373660
17. Otomatik pipet, tek uçlu, 0,5-10 µl, Medi-pipet, Medisis, Türkiye
18. Otomatik pipetler, tek uçlu, 0,5-10 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl, Finnpipette, Thermolab, Finlandia
19. Otomatik pipet, 8 uçlu, 20-200 µl, Finnpipette, Thermolab, Finlandia
20. ELISA optik okuyucu, LP400 Diagnostics Pasteur, Sanofi Diagnostics Pasteur, Fransa
21. Distile su cihazı, GFL, Türkiye

3.4. Moleküler Çalışmalarda Kullanılan Gereçler

3.4.1. Viral RNA Ekstraksiyonu için Kullanılan Gereçler

1. High Pure RNA Isolation Kiti, Roche, Ref No: 11 828 665 001. Kitin içerdikleri:
 - Lizis/bağlama tamponu (Lysis/Binding Buffer)
 - Liyofilize DNase I (DNase I, Recombinant Lyophilized)
 - DNase inkübasyon tamponu (DNase Incubation Buffer)
 - Yıkama Solusyonu I, kullanmadan önce 20 ml etanol eklenir (Wash Buffer I)
 - Yıkama Solusyonu II, kullanmadan önce 40 ml etanol eklenir (Wash Buffer II)
 - Çözücü tampon (Elution Buffer)
 - Spin filtreli kolon (High Pure Filter Tubes)
 - Toplama tüpleri (Collection Tubes)
2. Vortex Karıştırıcı, Zx³ Velp Scientifica, Model: Fuse T, İtalya
3. Mikro Santrifüj, Denville 2600. Ref No: C0260-18-230, ABD

3.4.2. RT-PCR ile İnfluenza A virüslerinin Alt-tiplendirilmesi için Kullanılan Gereçler

1. Qiagen One Step RT-PCR Kiti, Qiagen, Ref No: 210212. Kitin içerdikleri:
 - Tek aşamalı RT-PCR enzim karışımı (OneStep RT-PCR Enzyme Mix)

- Tek aşamalı RT-PCR tamponu (5X OneStep RT-PCR Buffer)
 - dNTP karışımı (dNTP Mix, 10mM)
 - 5X Q-Solüsyonu (5X Q Solution)
 - RNase içermeyen su (RNase-free water)
2. PCR termal döngü cihazı, Sensoquest Labcycler, Ref No: 1117230141, Almanya
 3. 0.2 ml PCR Tüpleri
 4. Alt-tiplendirilmede kullanılan primerler ve dizilimleri Tablo 3,1’de gösterilmiştir.

Tablo 3-1: Alt-tiplendirilmede Kullanılan Primerler.

Virüs	Primer İsmi	Sense	Primer Dizisi (5'-3')	Hedef Gen	Ürün Uzunluğu (bp)	Kaynak
H1N1	H1-1	+	gat gca gac aca ata tgt ata gg	HA	611	109
	H1-2	-	cic tac aga gac ata agc att t			
	N1-1	+	ttg ctt ggt cag caa gtg ca	NA	620	109
	N1-2	-	tct gtc cat cca tta gga tcc			
H3N2	HA3-115	+	gct act gag ctg gtt cag agt tc	HA	961	108
	H3-2	-	att ttt gat gcc tga aac cgt			109
	Na2-560	+	aag cat ggc tgc atg ttt gtg	NA	298	108
	Na2-858	-	acc agg ata tcg agg ata aca gga			

3.4.3. Dizileme ve Dizi Analizi için Kullanılan Gereçler

1. Qiagen One Step RT-PCR Kiti, Qiagen, Ref No: 210212. Kitin içerdikleri:
 - Tek aşamalı RT-PCR enzim karışımı (OneStep RT-PCR Enzyme Mix)
 - Tek aşamalı RT-PCR tamponu (5X OneStep RT-PCR Buffer)
 - dNTP karışımı (dNTP Mix, 10mM)
 - 5X Q-Solüsyonu (5X Q Solution)
 - RNase içermeyen su (RNase-free water)
2. PCR termal döngü cihazı, Sensoquest Labcycler, Ref No: 1117230141, Almanya
3. DNA temizleme (pürifikasyon) kiti (High Pure PCR Product Purification Kit, Roche, Ref no: 1173267600). Kitin içeriği:

- Bağlama tamponu (Binding Buffer)
- Yıkama tamponu (Washing Buffer)
- Elüsyon tamponu (Elution buffer)
- Spin filtreli kolon (High Pure Filter Tubes)
- Toplama tüpleri (Collection Tubes)

4. Promega, (Kat No: G2101) 100 bp DNA marker

5. Temizlenen örnek cDNA'ları dizileme amacıyla hizmet alımı kapsamında REFGEN Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji Ltd. Şti. Ankara firmasına gönderilmiştir. Dizilemede Tablo 3,2'de listelenen primerler kullanılmıştır.

Tablo 3-2: Dizilemede Kullanılan Primerler. H1N1 izolatlarında nöraminidaz molekülünde araştırılan tüm direnç mutasyonlarının saptanabilmesi için bir çift primer, H3N2 izolatlarında ise üç çift primer kullanılmıştır. Adamantan direnç mutasyonlarının saptanması için ise H1N1 ve H3N2 izolatlarının ikisi için de bir çift primer kullanılmıştır.

Antiviral	Primer ismi	Sense	Primer Dizi (5' -)	Virüs	Hedef Gen	Ürün Uzunluğu (bp)	Kaynak
Oseltamivir ve Zanamivir	N1-1	+	ttg ctt ggt cag caa gtg ca	H1N1	NA	620	[131]
	N1-2	-	tct gtc cat cca tta gga tcc				
	Na1F-133	+	ccc cca aac aac caa gtg	H3N2	NA	360	In-house
	Na1R-492	-	ccc cag atg aaa agg aac a				
	Na2-560	+	aag cat ggc tgc atg ttt gtg			298	[94]
	Na2-858	-	acc agg ata teg agg ata aca gga				
	Na3F-575	+	ttt gta taa cgg ggg atg at			642	In-house
	Na3R-1216	-	aac egg acc tat tac etc tgt				
Adamantan	M2F	+	cag atg car cga ttc agt g	H1N1 ve H3N2	M2	264	[10]
	M2R	-	gaa aca agg tag ttt ttt act c				

3.5. Yöntemler

3.5.1. Örneklerin Alınması ve Transportu

2007-2008 ve 2008-2009 sürveyans sezonunda Antalya, Bursa, Edirne, İstanbul ve İzmir illerinden İBH ön tanısı ile alınan burun sürüntüsü örnekleri hasta bilgi formu eşliğinde kurye sistemi ile 48 saat içinde İTF, Ulusal Influenza Referans Laboratuvarına ulaştırılmıştır. Transport esnasında soğuk zincire gereksinimi ortadan kaldıran ViroCult (Medical Wire Equipment CO, Ref No: MW 950, İngiltere) transport ortamı kullanılarak alınan burun sürüntüsü örnekleri laboratuara ulaştıktan sonra:

1. Örneklerle ilgili tüm işlemler laminar kabinde gerçekleştirilmiş,

2. Hasta örneğinin ViroCult içindeki besiyerine geçmesi ve homojenizasyon amacıyla ViroCult vorteksledikten sonra içindeki besiyeri krio tüpe aktarılmış, kriotüp üzerine örnek numarası, örneğin alındığı tarih ve muayene maddesi olduğunu belirten P0 ibaresi (sıfırıncı pasaj) yazılmıştır (örnek: 106/05, P0). İki gün içinde hücre kültürüne ekimi yapılacak örnekler +4°C'de, daha uzun süreyle bekletilecek örnekler -80°C'de saklanmıştır.
3. Örnek numarası ve örneğin laboratuara ulaştığı tarih, hasta bilgi formu üzerine yazılarak dosyalanmış; aynı bilgiler bilgisayara da kaydedilmiştir.

3.5.2. Hücre Kültürü Çalışmaları

Hücre kültürü çalışmaları virüs ekimi için gerekli hücrelerin çoğaltılması ve virüsü çoğaltmak amacıyla ekimi için gerekli işlemleri içermektedir.

3.5.2.1. Hücre Çoğaltma ve Saklama Besiyerlerinin Hazırlanması

1. 500 ml'lik 1X MEM besiyerine, 10 ml streptomisin-penisilin çözeltisi ve hücre çoğaltma besiyeri için 50 ml, saklama besiyeri için 10 ml FSS ilave edilmiştir
2. Besiyerini uygun pH'a getirmek için 13-15 ml NaHCO₃ çözeltisi eklendikten sonra, +4°C'da en fazla bir hafta muhafaza edilmiştir

3.5.2.2. Virüs Ekim Besiyerinin Hazırlanması

Serumun influenza virüsleri üzerine olan inhibitör etkisinden dolayı virüs ekiminde kullanılacak olan besiyeri serum içermemelidir.

1. 500 ml'lik 1X MEM besiyerine, 10 ml streptomisin-penisilin çözeltisi ilave edilmiş;
2. Hazırlanan, serum içermeyen bu ekim besiyerine ekim işlemi sonrasında konulmak üzere, 2µg/ml olacak şekilde TPCK-tripsin ilave edilmiştir.

3.5.2.3. Fetal Sığır Serumunun (FSS) İnaktivasyonu

FSS'nin, içerdiği kompleman sisteminin hücre üremesi üzerine olabilecek olumsuz etkisini ortadan kaldırmak için, inaktivasyonu gereklidir. Bu amaçla;

1. -20°C'da donmuş halde bulunan FSS, 37°C'daki su banyosunda çalkalanarak çözülmüş;
2. Tamamen çözölen FSS, 56°C'lık su banyosunda zaman zaman çalkalanarak 30 dakika bekletilerek inaktive edildikten sonra steril şartlarda 50 ml'lik falkon

tüplerine bölünmüş ve üzerine inaktivasyon tarihi yazılarak, -20°C 'da saklanmıştır.

3. Besiyeri hazırlanması sırasında çözölen FSS tüpleri, 56°C 'da su banyosunda 10 dakika bekletildikten sonra besiyerine eklenmiştir.

3.5.2.4. TPCK-Tripsin Çözeltisinin Hazırlanması

İnfluenza virüsünün MDCK hücrelerinde replike olabilmesi için, hemaglütinin glikoproteininin ribozom ve trans Golgi cisimciğinde sentez edildikten sonra kesilmesi ve alt birimlere ayrılması gereklidir. İn-vivo enfeksiyonlarda bu işlem konak hücre proteazları tarafından gerçekleştirilir. MDCK hücre kültürüne ise, tripsin eklenerek bu işlem gerçekleştirilir. Bu amaçla ekim besiyerine ilave edilen TPCK-tripsin, aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır:

1. 20 mg TPCK-tripsin 20 ml ekim besiyeri (MEM + penisilin+streptomisin+ NaHCO_3 içeren besiyeri) içinde çözülmüş; bu şekilde 1 mg/ml konsantrasyonda hazırlanmış olan çözelti, $0,2\ \mu\text{m}$ 'lik filtreden süzölmüştür
2. Çözelti $200\ \mu\text{l}$ 'lik hacimlerde küçük steril tüplere ayrıldıktan sonra, hazırlama tarihi yazılarak -20°C 'da en fazla bir sene olmak üzere muhafaza edilmiştir
3. Örneklerin inokölasyonu sonrasında kullanılan ekim besiyerine, son konsantrasyonu $2\ \mu\text{g}/\text{ml}$ olacak şekilde TPCK-tripsin ilave edilmiştir.

3.5.2.5. Hücre Kültürü ve Virüs Ekimi

İnfluenza virüslerinin izolasyonu için, Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) hücreleri kullanılmıştır. Bu hücre dizisi epitelooid yapıda olup, influenza virüslerinin üremesine imkan verecek siyalik asit reseptörleri taşımaktadır.

Hücre kültür yöntemi, hücrelerin pasaj yapılarak çoğaltılması ve örneklerin hücrelere ekimi olmak üzere iki basamaktan oluşur. Hücre kültürü yönteminde tüm işlemler, laminar akım kabini içinde steril ortamda gerçekleştirilmiştir.

3.5.2.6. Virüs Ekimi İçin Gerekli 24'lük Hücre Plağının Hazırlanması

1. 25 ml'lik flasklarda saklanan tam tabaka MDCK hücrelerinin üzerindeki çoğaltma besiyeri dökölmüş ve tripsin üzerinde inhibitör etkisi olan fetal sığır serumu tamamen gidermek için, steril PBS (pH 7,4) ile bir kez yıkanmış ve daha sonra bir kez daha 5ml tripsin-EDTA çözeltisi ile aynı işlem yinelenmiştir.

2. Ortama 5 ml tripsin-EDTA çözeltisi eklenmiş; bir dakika bekledikten sonra 4ml sıvı, pipetle ortamdan uzaklaştırılmış 1 ml çözelti ise flaskta bırakılmıştır. Hücrelerin yüzeyden tamamen ayrılması için flask, % 5 CO₂ 'li etüvde 37°C'da bir süre bekletilmiş; 5 dakika arayla hücrelerin dökülüp dökülmediği invert mikroskopta kontrol edilmiştir.
3. Dökülen hücrelerin üzerine tripsin-EDTA aktivitesini durdurmak için, 10 ml % 10 FCS içeren besiyeri eklenmiş ve 10 ml'lik tek kullanımlık pipetle, karışım iyice süspansiyon haline getirildikten sonra 24'lük plakların her kuyucuğuna 8×10^3 hücre düşecek şekilde %10'luk FSS içeren gelişme besiyeri ile süspanse edilen hücre süspansiyonundan 1'er ml dağıtılmış ve 37 C de, %5 CO₂'li etüvde tam tabaka oluncaya kadar inkübasyona bırakılmıştır.

3.5.2.7. 24'lük Hücre Kültürü Plaklarına Hastalardan Alınan Örneklerin Ekimi

1. 24'lük plaktaki tam tabaka halinde bulunan MDCK hücrelerinin üzerindeki besiyeri, hücrelere zarar vermeden tek kullanımlık pipetle çekilip atılmış; sığır serumunun influenza virüsünün üremesi üzerine inhibitör etkisini ortadan kaldırmak amacıyla, her kuyucuğa birer ml ekim besiyeri eklenerek hücreler bir kere yıkanmış ve besiyeri hücrelere zarar vermeden pipetle uzaklaştırılmıştır. Her kuyucuğa kriyotüplerdeki hasta örneklerinden 200'er µl ekim yapılmıştır.
2. Pozitif kontrol olarak standart suşlar (A/Solomon Islands/3/2006 (H1N1), A/Wisconsin/67/2005 (H3N2) ve B/Malaysia/2506/2004), negatif kontrol olarak ise serumsuz besiyeri kullanılmıştır.
3. Ekim yapılan plak 2000 rpm ve 20 °C'da, 30 dakika santrifüjde çevrilmiş; santrifüj sonrası her kuyucuğa 2 µg/ml TPCK-tripsin içeren serumsuz besiyerinden 1,5 ml eklenmiştir.
4. İşlemi biten plaklar % 5 CO₂ 'li etüvde 33 °C'de inkübe edilmiştir.
5. İnokülasyondan üç gün sonra hasta örneğinde influenza A ve B virüslerinin üreyip üremediğini kontrol için, kültür üst sıvısı kullanılarak "in-house" immün yakalama ELISA deneyi gerçekleştirilmiştir.
6. ELISA deneyinde pozitif sonuç veren örneklerin kültür üst sıvısı, daha sonra yapılacak alt-tiplendirme işlemleri için kriyotüplere alınıp, -80°C'de saklanmıştır.

3.5.3. Hücre Kültürü Üst Sıvısından IC-ELISA Testi ile İnfluenza A ve B Virüslerinin Saptanması

ELISA çalışmalarında, laboratuvarımızın işbirliği yaptığı DSÖ-Güney Fransa Referans Laboratuvarı tarafından laboratuvarımıza gönderilen reaktifler ve protokoller kullanılmıştır.

3.5.3.1. IC-ELISA Testi için Gerekli Reaktiflerinin Hazırlanması

a- Antikorların sulandırımı:

- Anti-İnfluenza A / B monoklonal antikorları, PBS ile 1/1000 oranında sulandırılmıştır.
- Anti-İnfluenza A H3N2+H1N1 ve Anti-İnfluenza B poliklonal antikorları, PBS-Tween çözeltisi ile 1/1000 oranında sulandırılmıştır.
- Antikor dilüsyonları, deney esnasında taze hazırlanarak kullanılmıştır.

b- Antijenlerin sulandırımı:

- Virüsün antijenik alt-tipine bağlı olarak antijenler 1/5, 1/25 ve 1/50 oranlarında sulandırıldıktan sonra deney sırasında çözündürülüp kullanılmak üzere -80 °C'de saklanmıştır.

c- Sığır albümini çözeltisi:

- Deney başlangıcında 100 ml PBS içinde 1 gr sığır albümini karıştırılmadan, kendi halinde erimeye bırakılarak çözündürülmüştür.

d- Triton çözeltisi:

- Distile su ile % 5'lik çözeltisi hazırlanmıştır.

e- PBS-Tween karışımı:

- 56 °C'da inaktive edilmiş FSS'nun PBS ile %10 'luk karışımı hazırlanmıştır. Bu karışıma %0,05 konsantrasyonda tween 20 eklenerek iyice karıştırılmıştır.
- Karışım, deney esnasında taze hazırlanarak kullanılmıştır.

f- Konjuge:

- Peroksidaz işaretli keçide hazırlanan anti-tavşan antikorunun, PBS-Tween çözeltisiyle 1/1500 sulandırımı hazırlanmıştır.
- Konjuge dilüsyonu, deney esnasında taze hazırlanarak kullanılmıştır.

g- Substrat:

Deneyin son aşamasında hemen kullanılmak üzere bir adet ABTS tablet (5mg), beş ml ABTS tampon içinde karanlıkta çözündürülmüştür.

3.5.3.2. IC-ELISA Testi ile İnfluenza A ve B Tiplerinin Saptanması

Hasta örneklerinin hücre kültürüne ekiminden sonra, kültür üst sıvısında influenza A ve B virüslerinin saptanması amacıyla IC-ELISA deneyi uygulanmıştır. Bu deneyde, İnfluenza virüs tipine özgü nükleoprotein antijenine karşı oluşturulmuş monoklonal antikorlardan yararlanılmıştır. Deney öncesinde, testte kullanılan reaktifler yukarıda açıklandığı şekilde hazırlanmıştır

a- Plakların monoklonal antikorla kaplanması:

1. 1/1000 oranında sulandırılmış anti-İnfluenza A ve anti-İnfluenza B monoklonal antikorları, İnfluenza A ve B'nin aranacağı plak kuyucuklarına 100'er µl dağıtıldıktan sonra plaklar, nemli ortamda 20 °C'de bir gece bekletilmiştir.
2. Ertesi gün plaklar PBS ile üç kere yıkanmıştır.

b- Doyurma:

1. Kuyucukların hepsine 200'er µl %1'lik sığır albümini eklenmiş; nemli ortamda 37 °C'lık etüvde bir saat üstü kapalı olarak inkübe edildikten sonra PBS ile 3 kere yıkanmıştır.

c- Örneklerin ve kontrollerin çalışılması:

1. Kuyucukların hepsine %5'lik tritondan 10'ar µl eklenmiş bunu takiben kültür üst sıvılarından ve kontrollerden kuyucuklara 90'ar µl dağıtılmıştır. Pozitif kontrol olarak İnfluenza A virüsünün H1N1, H3N2 alt-tiplerini ve İnfluenza B'yi içeren antijen sulandırımları kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak ise, ayrı ayrı kuyucuklara olmak üzere hücre içermeyen ekim besiyeri (MEM P0), hücre kültüründeki negatif kontrolün üst sıvısı (MEM P1) ve PBS-Tween (PBST) olmak üzere üç negatif kontrol kullanılmıştır.
2. Plaklar, nemli ortamda 37 °C'lık etüvde iki saat üstü kapalı olarak inkübe edildikten sonra PBS ile üç kere yıkanmıştır.

d- Poliklonal antikorların eklenmesi:

1. 1/1000 oranında sulandırılmış anti-İnfluenza A (H3N2) + anti-İnfluenza A (H1N1) ve anti-İnfluenza B poliklonal antikorları, İnfluenza A ve B'nin aranacağı plak kuyucuklarına 100'er µl dağıtılmıştır;
2. Nemli ortamda 37 °C'lık etüvde bir saat üstü kapalı olarak inkübe edilmiştir.
3. İnkübasyon sonrası PBS ile üç kere yıkanmıştır.
- 4.

e- Konjuge ve substrat ilavesi:

1. Bütün kuyucuklara 100'er µl 1/1500 oranında sulandırılmış peroksidaz işaretili anti tavşan antikoru (konjuge) ilave edilip, nemli ortamda 37 °C'lik etüvde 45 dakika üstü kapalı olarak inkübe edildikten sonra PBS ile üç kere yıkanmıştır.
2. Bütün kuyucuklara 100'er µl hazırlanan ABTS çözeltisinden (substrat) dağıtılıp oda ısısında, karanlıkta, 30 dakika inkübe edilmiştir.

f- Değerlendirme :

ELISA optik okuyucusunda, 620 nm dalga boyunda absorbans değeri okutularak sonuçlar değerlendirilmiş; negatif kontrollerin ortalamasına 0,150 eklenerek cut-off değeri bulunmuş ve bu değer üzerinde sonuç veren örnekler pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3.5.4. Moleküler Çalışmalar

3.5.4.1. Viral RNA Ekstraksiyonu

RNA ekstraksiyonu için gereçler bölümünde belirtilen kit, üretici firma önerileri doğrultusunda kullanılmıştır.

1. 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine 200 µl örnek materyali eklendikten sonra üzerine 400 µl lizis tamponu ilave edilmiş ve beklemeden vorteks ile 15 sn karıştırılmıştır.
2. Toplama tüpünün içine spin filtre kolonu yerleştirildikten sonra örnek sıvısı kolon tüpünün içine aktarılıp 15 sn 8000 g'de santrifüj edilmiştir. Santrifüjleme işleminden sonra toplama tüpünün altında biriken atık atılmış, nükleik asitleri içeren filtre kolonu aynı toplama tüpü üzerine yerleştirilmiştir.
3. Örnekleri DNA kontaminasyonundan arındırmak için steril bir tüpe her örnek için 90 µl DNaz inkübasyon tamponu, 10 µl DNaz enzimi olacak şekilde bir karışım hazırlanarak bu karışımdan her filtre tüpüne 100'er µl aktarılmış ve oda ısısında 15 dakika inkübe edilmiştir.
4. Inkübasyondan sonra tüplere 500 µl Yıkama I solüsyonun eklenerek 8000 g'de 15 saniye santrifüj edilmiştir. Altta biriken filtrat atılmış, filtreli kolon tekrar toplama tüpüne yerleştirilmiştir.
5. Filtreli kolonlara 500 µl Yıkama II solüsyonu eklenerek 8000 g'de 15 saniye santrifüj edilmiş, altta biriken filtrat atıldıktan sonra filtreli kolon tekrar toplama

tüpüne yerleştirildikten sonra 200 µl Yıkama II solüsyonu eklenmiş ve 13000 g'de 3 dakika santrifüj edilmiştir.

6. Alttaki toplama tüpü atılmış, filtreli kolon, 1,5 ml'lik kapaklı, steril mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildikten sonra her tüpe 50 µl çözücü (Elution) tampon eklenmiş ve 8000 g'de bir dakika santrifüj edilmiştir.
7. Filtreli kolon atılmış, alttaki nükleik asit ekstraksiyon ürünü alt- tiplendirme ve dizileme çalışmalarında kullanılıncaya kadar -80 °C'da saklanmıştır.

3.5.4.2. RT-PCR ile İnfluenza A Virüsünün Alt-tiplendirilmesi

RNA ekstraksiyonu için gereçler bölümünde belirtilen kit, üretici firma önerileri doğrultusunda kullanılmıştır.

1. 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine 200 µl örnek eklendikten sonra üzerine 400 µl lizis tamponu ilave edilmiş ve beklemeden vorteks ile 15 sn karıştırılmıştır.
2. Toplama tüpünün içine spin filtre kolonu yerleştirildikten sonra örnek sıvısı kolon tüpünün içine aktarılıp 15 sn 8000 g'de santrifüj edilmiştir. Santrifüjleme işleminden sonra toplama tüpünün altında biriken atık atılmış, nükleik asitleri içeren filtre kolonu aynı toplama tüpü üzerine yerleştirilmiştir.
3. Örnekleri DNA kontaminasyonundan arındırmak için steril bir tüpe her örnek için 90 µl DNaz inkübasyon tamponu, 10 µl DNaz enzimi olacak şekilde bir karışım hazırlanarak bu karışımdan her filtre tüpüne 100'er µl aktarılmış ve oda ısısında 15 dakika inkübe edilmiştir.
4. İnkübasyondan sonra tüplere 500 µl Yıkama I solüsyonun eklenerek 8000 g'de 15 saniye santrifüj edilmiştir. Altta biriken filtrat atılmış, filtreli kolon tekrar toplama tüpüne yerleştirilmiştir.
5. Filtreli kolonlara 500 µl Yıkama II solüsyonu eklenerek 8000 g'de 15 saniye santrifüj edilmiş, altta biriken filtrat atıldıktan sonra filtreli kolon tekrar toplama tüpüne yerleştirildikten sonra 200 µl Yıkama II solüsyonu eklenmiş ve 13000 g'de 3 dakika santrifüj edilmiştir.
6. Alttaki toplama tüpü atılmış, filtreli kolon, 1,5 ml'lik kapaklı, steril mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildikten sonra her tüpe 50 µl Çözücü (Elution) tampon eklenmiş ve 8000 g'de bir dakika santrifüj edilmiştir.
7. Filtreli kolon atılmış, alttaki nükleik asit ekstraksiyon ürünü alt- tiplendirme ve dizileme çalışmalarında kullanılıncaya kadar -80 °C'da saklanmıştır.

a. PCR aşaması

H1 ve H3 ile N1 ve N2'nin saptandığı alt-tiplendirme işleminde, hemaglütinin ve nöraminidaz için işlemler ayrı tüplerde gerçekleştirilmiştir.

- İki adet 1,5 ml'lik ependorf tüpü HA ve NA için ayrı olarak işaretlendikten sonra tek bir örnek için PCR karışımı aşağıdaki gibi ve örnek sayısına göre hesaplama yapılarak hazırlanmıştır.

Hemaglütinin için PCR	Miktar	Nöraminidaz için PCR	Miktar
Reaktifleri		Reaktifleri	
Tampon 5X	5 µl	Tampon 5X	5 µl
DNTP (10mM)	1 µl	dNTP (10mM)	1 µl
Enzim karışımı	1 µl	Enzim karışımı	1 µl
Q solüsyon	3 µl	Q solüsyon	3 µl
H1-1 primer (10mM)	1 µl	N1-1 primer (10mM)	1 µl
H1-2 primer (10mM)	1 µl	N1-2 primer (10mM)	1 µl
HA3-115 primer (10mM)	1 µl	Na2-560primer (10mM)	1 µl
H3-2 primer (10mM)	1µl	Na2-858 primer	1µl
Steril distile su	8,5 µl	Steril distile su	8,5 µl

- PCR tüplerine, hazırlanan PCR karışımından her örnek için 22,5'er µl dağıtıldıktan sonra 2,5 µl RNA ekstraktı ilave edilmiştir.
- Termal döngü cihazı, 50 °C'de 30 dakika revers transkripsiyon, 95 °C'de 15 dakika ön denatürasyon, 40 döngü için sırasıyla: 95 °C'de 30 saniye denatürasyon, 55 °C'de 30 saniye primer bağlanması, 72 °C'de 1 dakika primer uzaması ve son olarak 72 °C'de 10 dakika son uzama şeklinde ayarlandıktan sonra tüpler cihaza yerleştirilerek program başlatılmış; program tamamlanmasından sonra tüpler jel elektroforez işlemine kadar 4°C de saklanmıştır.

b. PCR Ürünlerinin Agaroze Jel Elektroforez Yöntemiyle Saptanması

- 10 mM Tris asetik asit ve bir mM EDTA karıştırılarak, Tris asetik asit–EDTA (TAE) tamponu hazırlanmıştır.
- 10X stok çözeltisi halinde hazırlanan TAE çözeltisi, jel hazırlanması esnasında 1X olacak şekilde distile su ile sulandırılmıştır.

3. 1,2 gr agaroz jel, 40 ml TAE çözeltisi içinde kaynatılarak eritilip, sıcaklığı 40-50 °C'ye düşürüldükten sonra, 4 µl etidyum bromid ilave edilerek jel tankına dökülmüş, jelin katılaşması için 20 dakika beklenmiştir.
 4. 10 µl çoğaltma ürünü, 2 µl yükleme tamponu (%0,25 bromofenol mavisi, %30 gliserol) ile karıştırılıp jel kuyucuklarına yüklenmiştir. 5 µl 100pb DNA marker da jeldeki ayrı bir kuyuya yüklendikten sonra 1X TAE tamponu içinde 100 voltluk akımda, 15-20 dakika elektroforez işlemi gerçekleştirilmiştir.
- Sonuçta UV transilüminatörde gözlenen bant profilleri, belirtilen HA ve NA baz uzunluklarına göre değerlendirilmiştir: H1 için 611 baz çifti, H3 için 961 baz çifti, N1 için 620 baz çifti, N2 için 298 baz çiftine tekabül eden bantlar pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir.

3.5.4.3. Dizileme Amacıyla Örneklerden Ekstrakte Edilen RNA'ların RT-PCR Yöntemi ile Çoğaltılması

Hücre kültürlerinde üretildikten sonra tiplendirimi ve alt-tiplendirimi yapılan örneklerden elde edilen RNA'lar, gereçler bölümünde belirtilen dizileme primerleri kullanılarak klasik RT-PCR ile çoğaltıldıktan sonra elde edilen cDNA miktarının dizileme için yeterli olup olmadığı kalitatif olarak jel- elektroforez ile araştırılmıştır. Yukarıda detaylarıyla anlatılan jel elektroforez işlemi standart bir yöntem olduğu için bu bölümde detaylı olarak anlatılmayacaktır (Bknz 3.5.4.2-b)

a. RNA Ekstraksiyonu

Hücre kültürü üst sıvısından ekstrakte edilen RNA (Bknz 3.5.4.1) hem alt tiplendirme hem de dizileme RT-PCR işlemleri için kullanılmıştır.

b. RT-PCR Aşaması

H1N1 Virüsünün N1 Geni için PCR

- H1N1/NA genindeki hedef mutasyonların (H275Y ve N294S) saptanması amacıyla bir örnek için RT-PCR karışımı aşağıdaki gibi hazırlanmış ve örnek sayısına göre miktarlar ayarlanmıştır.

N1 için PCR Reaktifleri	Miktar
Tampon 5X	10 µl
dNTP (10mM)	2 µl
Enzim karışımı	2 µl
Q solüsyon	6 µl
N1-1 primer (10mM)	2 µl
N1-2 primer (10mM)	2 µl
Steril distile su	21 µl

- Hazırlanan PCR karışımından her örnek için 45'er µl PCR tüplerine dağıtılmış, tüplerdeki PCR karışımı üzerine 5 µl RNA ekstraktı ilave edilmiştir.

- Termal döngü cihazı, 50 °C'de 30 dakika revers transkripsiyon, 95 °C'de 15 dakika ön denaturasyon, 40 döngü için sırasıyla: 95 °C'de 30 saniye denatürasyon, 55 °C'de 30 saniye primer bağlanması, 72 °C'de 1 dakika primer uzaması ve son olarak 72 °C'de 10 dakika son uzama şeklinde ayarlanarak içinde PCR karışımı olan tüpler, termal döngü cihazına yerleştirilmiş ve program başlatılmıştır.

H1N1 ve H3N2 Virüslerinin M2 Geni için PCR

- H1N1/M2 ve H3N2/M2 genindeki hedef mutasyonların (H1N1 virüslerinde V27A, A30T, S31N, G34E ve H3N2 virüslerinde L26F, V27A, A30T, S31N) saptanması amacıyla bir örnek için RT-PCR karışımı aşağıdaki gibi hazırlanmış, örnek sayısına göre miktarlar ayarlanmıştır.

M2 için RT- PCR Reaktifleri	Miktar
Tampon 5X	10 µl
dNTP (10mM)	2 µl
Enzim karışımı	1 µl
Q solüsyon	10 µl
RNAse Out (40 U/µL)	0.125µl
M2-F primer (20 µM)	1.5 µl
M2-R primer (20 µM)	1.5 µl
Steril distile su	18.9 µl

- Hazırlanan PCR karışımından her örnek için 45'er µl PCR tüplerine dağıtıldıktan sonra tüplerdeki PCR karışımı üzerine 5 µl RNA ekstraktı ilave edilmiştir.

- Termal döngü cihazı, 50 °C’de 30 dakika revers transkripsiyon, 95 °C’de 15 dakika ön denatürasyon, 40 döngü için sırasıyla: 94 °C’de 45 saniye denatürasyon, 55 °C’de 45 saniye primer bağlanması, 72 °C’de 45 saniye primer uzaması ve son olarak 72 °C’de 10 dakika son uzama şeklinde ayarlandıktan sonra içinde PCR karışımı olan tüpler cihaza yerleştirilmiş ve program başlatılmıştır.

H3N2 Virüslerinin N2 Geni için PCR

H3N2 virüslerinin N2 genindeki hedef mutasyonların tümünün saptanması için aşağıda açıklanan üç farklı primer seti kullanılmıştır:

Birinci Primer Seti (Na1F-133, Na1R-492) İle RT-PCR :

- Bu primer seti N2 genindeki E119V, D151E mutasyonları araştırmak amacıyla kullanılmıştır. Bu mutasyonların saptanması amacıyla bir örnek için RT-PCR karışımı aşağıdaki gibi hazırlanmış, örnek sayısına göre miktarlar ayarlanmıştır.

NA2 için RT- PCR Reaktifleri	Miktar
Tampon 5X	10 µl
dNTP (10mM)	2 µl
Enzim karışımı	2 µl
Q solüsyon	6 µl
Na1F-133 (10 mM)	1 µl
Na1R-492 (10 mM)	1 µl
Steril distile su	23 µl

- Hazırlanan PCR karışımından her örnek için 45’er µl PCR tüplerine dağıtıldıktan sonra tüplerdeki PCR karışımı üzerine 5 µl RNA ekstraktı ilave edilmiştir.

- Termal döngü cihazı, 50 °C’de 30 dakika revers transkripsiyon, 95 °C’de 15 dakika ön denaturasyon, 40 döngü için sırasıyla: 95 °C’de 45 saniye denatürasyon, 55 °C’de 45 saniye primer bağlanması, 72 °C’de 1 dakika primer uzaması ve son olarak 72 °C’de 10 dakika son uzama şeklinde ayarlandıktan sonra içinde PCR karışımı olan tüpler, cihaza yerleştirilerek program başlatılmıştır.

İkinci Primer Seti (Na2F-560, Na2R-858) İle RT-PCR

• I222V, R224K, E276D mutasyonlarının saptanması amacıyla kullanılan bu primer seti ile bir örnek için RT-PCR karışımı aşağıdaki gibi hazırlanmış, örnek sayısına göre miktarlar ayarlanmıştır.

NA2 için RT- PCR Reaktifleri	Miktar
Tampon 5X	10 µl
dNTP (10mM)	2 µl
Enzim karışımı	2 µl
Q solüsyon	6 µl
Na2F-560 (10 mM)	2 µl
Na2R-858(10 mM)	2 µl
Steril distile su	21 µl

• Hazırlanan PCR karışımından her örnek için 45'er µl PCR tüplerine dağıtıldıktan sonra tüplerdeki PCR karışımı üzerine 5 µl RNA ekstraktı ilave edilmiştir.

• Termal döngü cihazı, 50 °C'de 30 dakika revers transkripsiyon, 95 °C'de 15 dakika ön denaturasyon, 40 döngü için sırasıyla: 95 °C'de 30 saniye denatürasyon, 55 °C'de 30 saniye primer bağlanması, 72 °C'de 1 dakika primer uzaması ve son olarak 72 °C'de 10 dakika son uzama şeklinde ayarlandıktan sonra içinde PCR karışımı olan tüpler, cihaza yerleştirmiş ve program başlatılmıştır.

Üçüncü Primer Seti (Na3F-575, Na3R-1216) İle RT-PCR :

• R292K, N294S ve R371K mutasyonların saptanması amacıyla bir örnek için RT-PCR karışımı aşağıdaki gibi hazırlanmış, örnek sayısına göre miktarlar ayarlanmıştır.

NA2 için RT- PCR Reaktifleri	Miktar
Tampon 5X	10 µl
dNTP (10mM)	2 µl
Enzim karışımı	2 µl
Q solüsyon	6 µl
Na3F-575 (10 mM)	1 µl
Na3R-1216 (10 mM)	1 µl
Steril distile su	23 µl

• Hazırlanan PCR karışımından her örnek için 45'er µl PCR tüplerine dağıtılmıştır, tüplerdeki PCR karışımı üzerine 5 µl RNA ekstraktı ilave edilmiştir.

- Termal döngü cihazı, 50 °C’de 30 dakika revers transkripsiyon, 95 °C’de 15 dakika ön denaturasyon, 40 döngü için sırasıyla: 95 °C’de 45 saniye denatürasyon, 55 °C’de 45 saniye primer bağlanması, 72 °C’de 1 dakika primer uzaması ve son olarak 72 °C’de 10 dakika son uzama şeklinde ayarlandıktan sonra içinde PCR karışımı olan tüpler cihaza yerleştirilip program başlatılmıştır.

c. RT-PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforez Yöntemiyle Saptanması

- 10 µl RT-PCR ürünü, 2 µl yükleme tamponu ile karıştırılmış bu karışımdan 10 µl alınarak, jel kuyucuklarına yüklenmiştir. PCR işaretleyicisi de (PCR marker) jele yüklendikten sonra, elektroforez işlemine geçilmiştir.

- 100 Voltluk akımda, 15-20 dakika elektroforez uygulandıktan sonra sonuçlar aşağıdaki tablodaki veriler ışığında değerlendirilmiştir.

Antiviral	Primer ismi	Sense	Primer Dizi (5' -)	Virüs	Hedef Gen	Ürün Uzunluğu (bp)
Oseltamivir ve Zanamivir	N1-1	+	ttg ctt ggt cag caa gfg ca	H1N1	NA	620
	N1-2	-	tct gtc cat cca tta gga tcc			
	Na1F-133	+	ccc cca aac aac caa gfg	H3N2	NA	360
	Na1R-492	-	ccc cag atg aaa agg aac a			
	Na2-560	+	aag cat ggc tgc atg ttt gfg			298
	Na2-858	-	acc agg ata teg agg ata aca gga			
	Na3F-575	+	ttt gta taa egg ggg atg at			642
	Na3R-1216	-	aac egg acc tat tac etc tgt			
Adamantan	M2F	+	cag atg car cga ttc agt g	H1N1 ve H3N2	M2	264
	M2R	-	gaa aca agg tag ttt ttt act c			

d. RT-PCR Ürünlerinin DNA Temizleme Kiti ile Temizlenmesi ve Dizileme Çalışmaları

Yukarıda c bölümünde tanımlandığı şekliyle jel elektroforezle saptanan RT-PCR ürünleri, üreticinin açıklamaları doğrultusunda kullanılan DNA temizleme kiti ile saflaştırılmış, saflaştırılan ürünler yeniden jel elektroforezde yürütülerek kalitatif miktar tayini yapılmış; uygun miktarda ürün elde edilen örnekler dizileme amacıyla REFGEN Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji Ltd. Şti., Ankara merkezine gönderilmiştir.

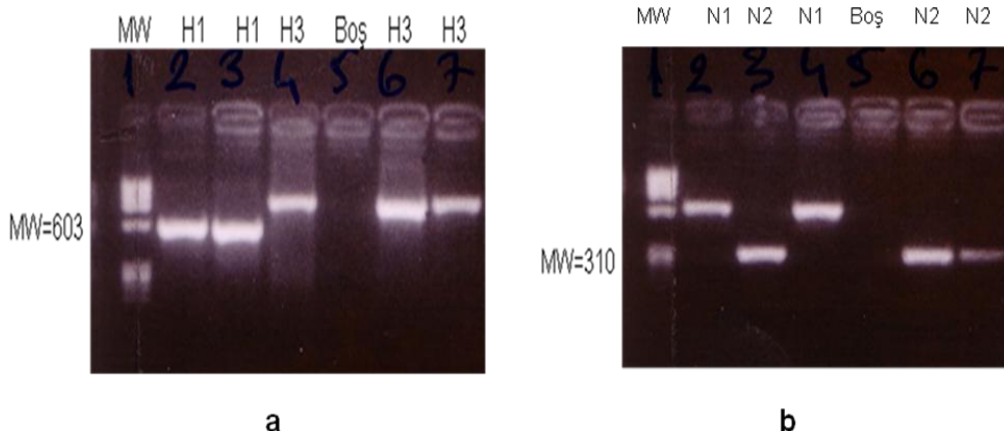
3.5.4.4. DNA Dizilerinin Analizi

REFGEN firmasında dizilemeleri tamamlanan örneklerin dizileme kromotogramları laboratuvarımızda Chromas Lite programı ile incelenerek dizilemenin doğru bir şekilde yapıldığı kontrol edilmiş, uygun olmayan dizilemeler tekrarlatılmıştır. Bunu takiben kromotogramlar FASTA formatına dönüştürülerek DNASTar (DNASTAR, Inc., 3801 Regent Street, Madison, WI 53705, USA) gen analiz programının EditSeq modülüyle edit edilerek nükleotid ve amino asit dizilimleri belirlenmiştir. Daha sonra Megalingment modülü kullanılarak NCBI Gen bankasından elde edilen referans örneklerin nükleotid ve aminoasit dizilimleri ile CLUSTAL analiz yöntemine göre karşılaştırılmış influenza A/H1N1 ve A/H3N2 alt tiplerinde M2 geninde adamantanlara ve NA geninde nöraminidaz inhibitörlerine karşı direnç mutasyonları araştırılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Hücre Kültürü Sonrası IC-ELISA ile Tiplendirme ve İn-house RT-PCR ile Atl-tiplendirme Sonuçları

2007-2008 sezonunda süveyans kapsamında laboratuvarımıza gönderilen ve MDCK hücre kültürüne ekilen toplam 524 örnekte IC-ELISA yöntemi ile influenza virüslerinin varlığı araştırılmış, bu döneme ait örneklerin 111'inin influenza A, 52'sinin de influenza B virüsleri açısından pozitif oldukları; in-house RT-PCR çalışmaları sonucunda da influenza A izolatlarının tamamının H1N1 alt-tipinden oldukları saptanmıştır. 2008-2009 sezonunda laboratuvarımıza gönderilen örnekler de yine MDCK hücre kültürüne ekilmiş toplam 580 örnekte IC-ELISA ile influenza virüslerinin varlığı araştırılmış; sonuçta bu döneme ait örneklerin 31'inin influenza A ve 31'inin de influenza B virüsleri açısından pozitif oldukları; in-house RT-PCR çalışmaları sonucunda da influenza A izolatlarının tamamının H3N2 alt-tipinden oldukları saptanmıştır (Şekil 4.1).



Şekil 4-1: 2008-2009 sezonunda izole edilen ve tamamı H3N2 olarak saptanan influenza A virüslerinden ikisine ait alt-tiplendirme sonuçları. Moleküler ağırlık (MW) markırı olarak ROCHE, DNA Molecular Weight Marker IX kullanıldı (Kat.No. 11 449 460 001). a) 1. kuyucuk marker, 2 ve 3. kuyucuklar H1 kontrolleri (611 bp), 4. kuyucuk H3 kontrol (961 bp), 5. kuyucuk boş, 6 ve 7. kuyucuklar H3 alt-tipinden örnekler. b) 1. Kuyucuk marker, 2. kuyucuk N1 kontrol (620 bp), 3.kuyucuk N2 (298 bp) kontrol, 4. kuyucuk N1 extra kontrol, 5. kuyucuk boş, 6 ve 7. kuyucuklar N2 alt-tipinden örnekler.

2007-2008 ve 2008-2009 sürveyans dönemlerine ait influenza virüs izolasyon oranları ve alt- tipleme sonuçları Tablo 4.1’de özetlenmiştir.

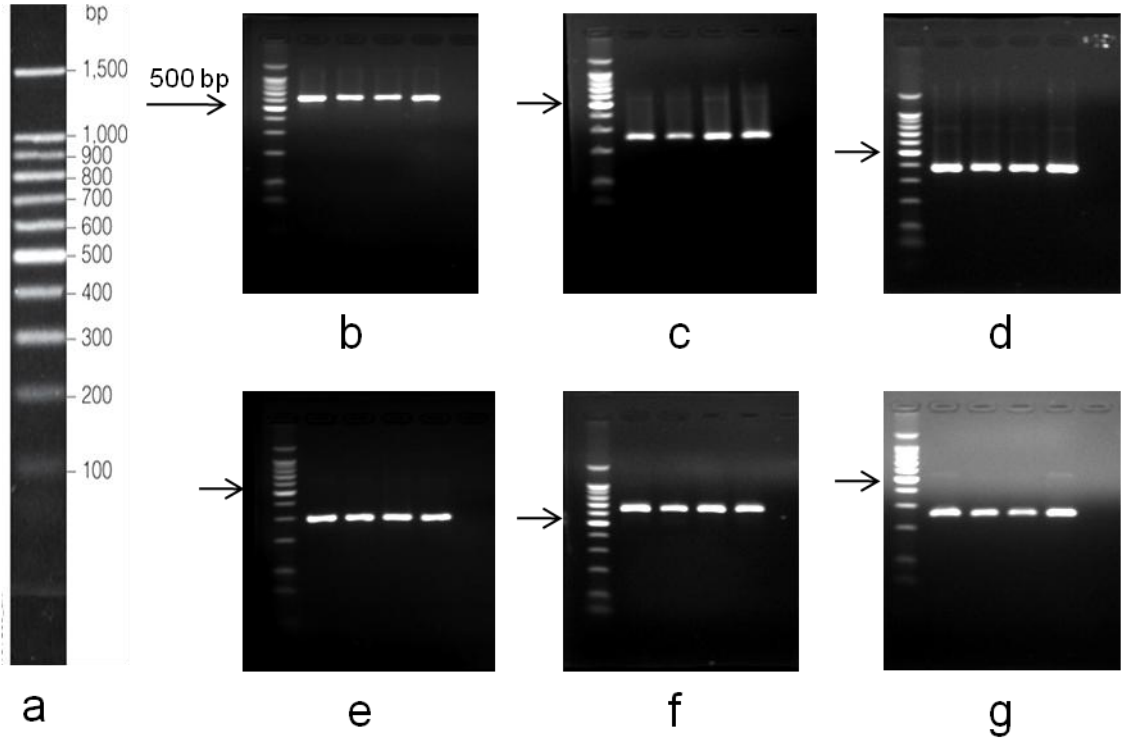
Tablo 4-1: 2007-2008 ve 2008-2009 Sezonları Sürveyans Sonuçları. Sürveyans kapsamında influenza virüsleri açısından test edilmek üzere İTF Ulusal İnfluenza Referans Laboratuvarına gönderilen örnek sayıları, influenza izolasyon oranları ve alt tipleme sonuçları.

2007-2008 Sürveyans Dönemi		2008-2009 Sürveyans Dönemi	
Toplam İzolasyon/Toplam Örnek/ (%İzolasyon)		Toplam İzolasyon/Toplam Örnek/ (%İzolasyon)	
İnf A/H1N1	İnf B	İnf A/H3N2	İnf B
111 / 524 (%21,1)	52 / 524 (%9,9)	31 / 580 (%5,3)	31 / 580 (%5,3)

4.2. DNA Dizileme Çalışmaları Sonuçları

4.2.1. Dizileme Amacıyla Gerçekleştirilen RT-PCR ve RT-PCR Ürününü Temizleme Çalışmaları Sonuçları

Moleküler dizileme çalışmalarının anlamlı bir sonuç verebilmesi için izolatlardan elde edilen RNA’nın kalitatif olarak uygun miktarda olması gerekmektedir. Bu nedenle, dizileme için kalitatif olarak uygun miktarda RNA elde edilemeyen izolatlar direnç çalışması kapsamına alınmamıştır. Sonuçta, 2007-2008 sezonununun erken ve geç dönemine ait toplam 30 H1N1 izolatı ile 2008-2009 sezonuna ait toplam 28 H3N2 izolatından ekstre edilen RNA örneği dizileme için uygun bulunmuş ve dizileme primerleri kullanılarak RT-PCR ile çoğaltılmıştır. Çoğaltılan RT-PCR ürünleri temizlendikten sonra dizileme amacıyla REFGEN Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji Ltd. Şti., Ankara merkezine gönderilmiştir. Temizlenen RT-PCR ürünlerinden her primer seti ile çoğaltılan dörder tanesine ait deney sonuçları Şekil 4.2’de gösterilmiştir.



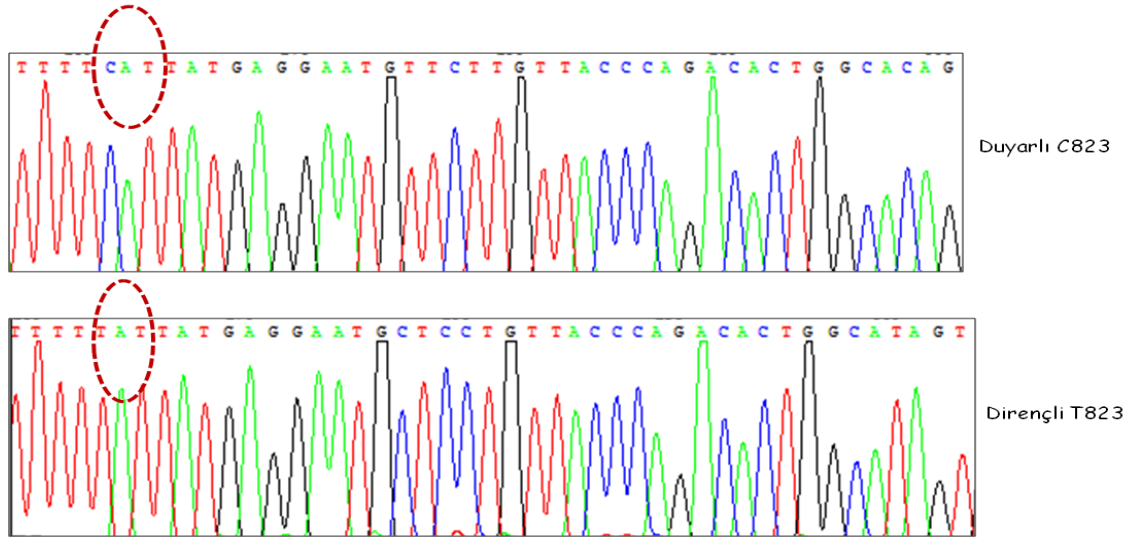
Şekil 4-2: Farklı alt-tiplerden dörder örneğe ait RT-PCR sonuçları. **a.** Promega, 100 bp DNA marker. **b.** H1N1 virüsünün N1 geninde H275Y mutasyonunun saptanmasında kullanılan primer setiyle (N1-1; N1-2) çoğaltılan bölgenin RT-PCR ürünü. Ürün uzunluğu: 620bp, **c.** H1N1 virüsünün M2 geninde V27A, A30T, S31N, G34E mutasyonlarının saptanmasında kullanılan primer setiyle (M2F, M2R) çoğaltılan bölgenin PCR ürünü. Ürün uzunluğu: 264 bp, **d.** H3N2 virüsünün N2 geninde E119V, D151E mutasyonlarının saptanmasında kullanılan primer setiyle (Na1F-133 Na1R-492) çoğaltılan bölgenin PCR ürünü. Ürün uzunluğu: 360 bp, **e.** H3N2 virüsünün N2 geninde R224K, E276D mutasyonlarının saptanmasında kullanılan primer setiyle (Na2-560, Na2-858) çoğaltılan bölgenin PCR ürünü. Ürün uzunluğu: 298 bp, **f.** H3N2 virüsünün geninde R224K, E276D, R292K, N294S, R371K mutasyonlarının saptanmasında kullanılan primer setiyle (Na3F-575, Na3R-1216) çoğaltılan bölgenin PCR ürünü. Ürün uzunluğu: 642 bp ve **g.** H3N2 Virüsünün M2 geninde L26F, V27A, A30T, S31N mutasyonlarının saptanmasında kullanılan primer setiyle (M2F, M2R) çoğaltılan bölgenin PCR ürünü. Ürün uzunluğu: 264 bp. Ok işareti, kullanılan DNA markerinin fotoğrafta parlak görünen 500 baz çiftlik bandını göstermektedir.

4.2.2. DNA Dizileme Analizi Sonuçları

4.2.2.1. H1N1 İzolatlarında NI Direnci

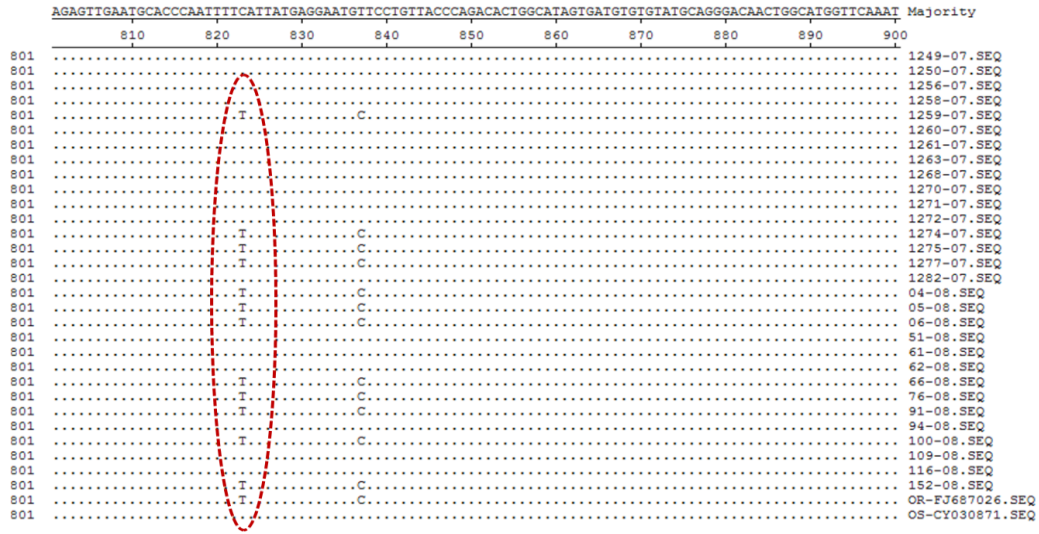
Kromotogram formatında laboratuvarımıza ulaşan dizileme sonuçları tüm örnekler için öncelikle kalite açısından değerlendirilmiştir. Kromotogramlarda her bir renk farklı bir nükleotidi temsil etmektedir. Bu bağlamda, kromotogram pikleri tek bir renkten oluşan dizilemeler değerlendirmeye alınmış, kritere uymayan örneklerin dizilemeleri yinelenmiştir. Bu aşamadan sonra, gönderilen DNA dizileme kromotogramları Chromas Lite programında incelenmiş ve 275'inci amino asitteki

H→Y değişiminine denk gelen C823T nükleotid değişimi oseltamivir direnci açısından değerlendirilmiştir (Şekil 4.3).

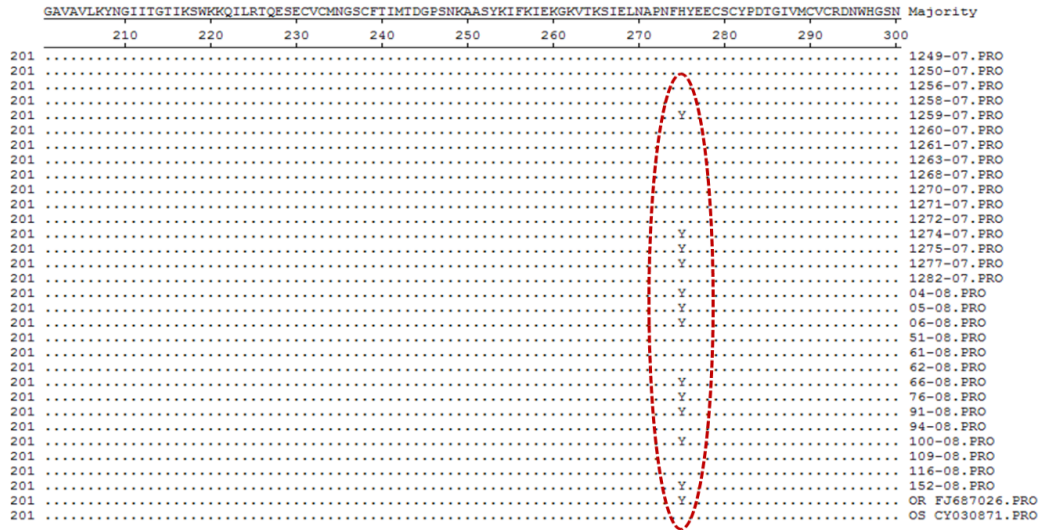


Şekil 4-3: Oseltamivire duyarlı ve dirençli izolatların dizileme kromotogramı. Kromotogramda üstteki duyarlı izolatta elips içine alınan CAT nükleoitidleri Histidin (H) amino asidini kodlayan 823, 824 ve 825'inci nükleotitleri kapsamaktadır. Altteki dirençli izolatta ise CAT→TAT kodonlarındaki 823'üncü nükleotitteki C→T değişimi H→Y(Tirozin) değişimi ile sonuçlanmıştır.

Örneklerin nükleotid dizilimleri DNASTAR programının EditSeq modülü kullanılarak aminoasit dizilimlerine dönüştürülmüş ve daha sonra yine DNASTAR programının MegAlign modülü ile Clustal analizi yapılarak örneklerin ve referans suşlarının nükleotid ve amino asit dizilimleri karşılaştırılmıştır. Nükleotid dizilimlerinin incelenmesi sonucunda 30 izolatın 12'sinde 823'üncü nükleotitte oseltamivir direncine neden olan C823T değişimi saptanmıştır (Şekil 4,4). Aynı izolatların ait amino asit dizilimi incelendiğinde nükleotit dizilimindeki bu değişimin 275'inci amino asitte H275Y değişimine neden olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4-4: H1N1 izolatlarında oseltamivir direncine neden olan 823'üncü nükleotidde C→T değişimi. En alttaki iki dizi NCBI GenBank'tan alınan dirençli ve duyarlı iki referans virüse aittir.



Şekil 4-5: H1N1 izolatlarında oseltamivir direncine neden olan 275'inci amino asit'te H→Y değişimi. En alttaki iki dizi NCBI GenBank'tan alınan dirençli ve duyarlı iki referans virüse aittir.

Sonuçta, nükleotid ve amino asit dizilimi incelenen 30 H1N1 izolatının 12'sinin (%40) N1 geninde H275Y oseltamivir direnç mutasyonu saptanmış (Tablo 4.2); 18 izolatta direnç mutasyonu saptanmamıştır. N1 geninde zanamivir direncine neden olan mutasyon bildirilmemiş olduğundan bu virüslerde zanamivir direnci saptanmamıştır. Oseltamivir dirençli virüslerin izole edildiği hastaların özellikleri incelendiğinde, hastaların 3- 65 yaş aralığında oldukları, ortalama yaştan 15,5 ve hastaların dokuzunun

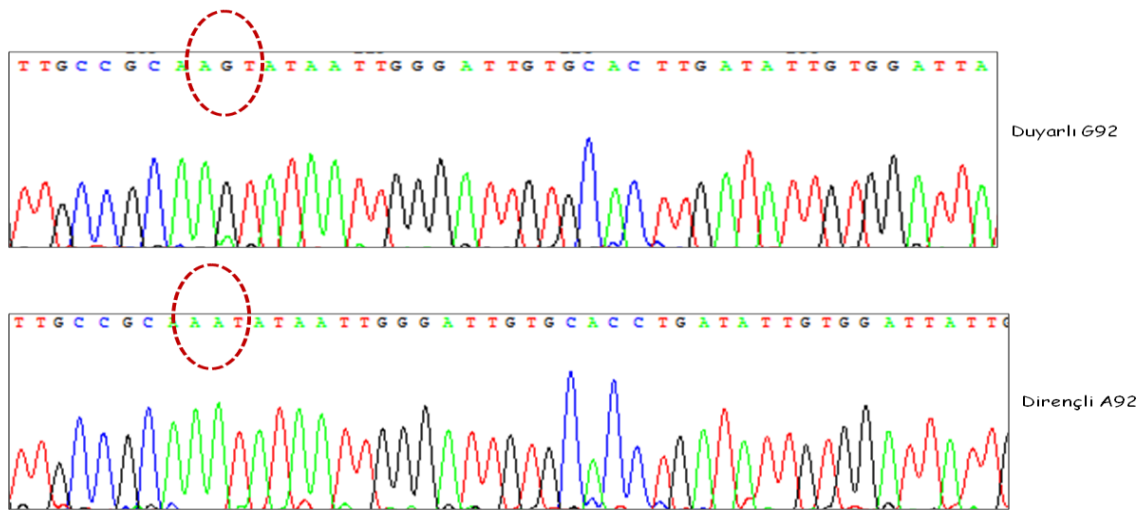
(%75) kadın olduğu, hastalardan sadece birinin (60 yaş) grip aşısı yaptırmış olduğu, tüm hastaların klasik grip belirtisi sergiledikleri ve yalnızca bir hastada (55 yaş) eşlik eden hastalık (hipertansiyon) bulunduğu saptanmıştır. Örneklerin süzgeç kapsamındaki üç ile (Bursa, İstanbul, İzmir) dağılmış oldukları gözlenmiştir.

Tablo 4-2: 2007-2008 sezonunda izole edilen, H275Y Oseltamivir direnç mutasyonu taşıyan influenza A/H1N1 virüsleri ve saptandıkları iller.

H275Y Oseltamivir Direnç Mutasyonu Taşıyan İnfluenza A H1N1 Virüsleri	Saptanan İl
A/Bursa/1259/07 (H1N1)	Bursa
A/Bursa/1274/07 (H1N1)	Bursa
A/İstanbul/1275/07 (H1N1)	İstanbul
A/İstanbul/1277/07 (H1N1)	İstanbul
A/Bursa04/08 (H1N1)	Bursa
A/Bursa/05/08 (H1N1)	Bursa
A/İstanbul/06/08 (H1N1)	İstanbul
A/İstanbul/66/08 (H1N1)	İstanbul
A/Bursa/76/08 (H1N1)	Bursa
A/İstanbul/91/08/ (H1N1)	İstanbul
A/İstanbul/100/08 (H1N1)	İstanbul
A/İzmir/152/08 (H1N1)	İzmir

4.2.2.2. H1N1 İzolatlarında Adamantan Direnci

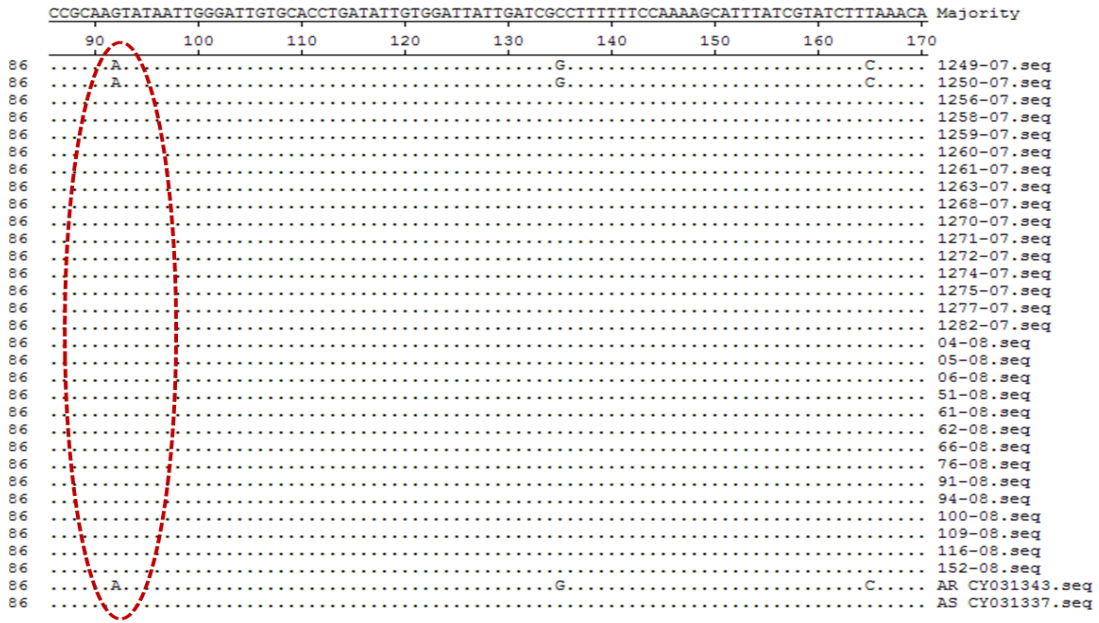
Örneklerin dizileme kromotogramları Chromas Lite programında incelenmiş ve 31inci amino asitteki S→N değişimine denk gelen G92A nükleotid değişimi adamantan direnci açısından değerlendirilmiştir (Şekil 4.6).



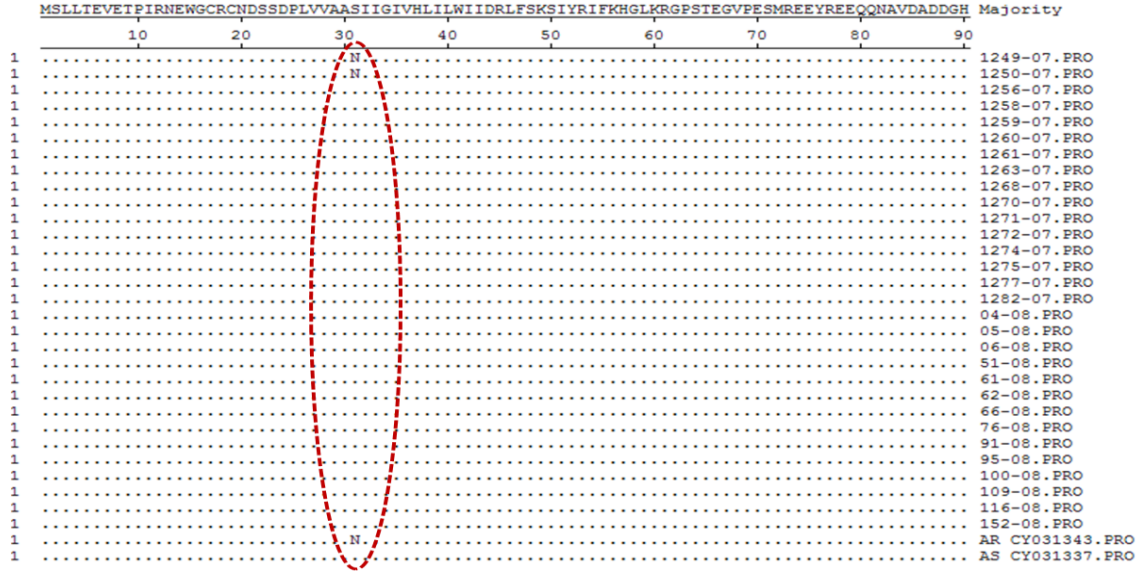
Şekil 4-6: Adamantanlara duyarlı ve dirençli izolatların dizileme kromotogramı.

Kromotogramda üstteki duyarlı izolatta elips içine alınan AGT nükleotidleri Serin (S) amino asidini kodlayan 91, 92, 93'üncü nükleotitleri kapsamaktadır. Altteki dirençli izolatta ise 92'nci nükleotitteki G→A değişimi sonucunda AGT→AAT kodonuna dönüşerek S→N(Asparjin) değişimi ile sonuçlanmıştır.

Örneklerin nükleotid dizilimleri DNASTAR programının EditSeq modülü kullanılarak aminoasit dizilimlerine dönüştürülmüş ve daha sonra yine DNASTAR programının MegAlign modülü ile Clustal analizi yapılarak örneklerin ve referans suşlarının nükleotid ve amino asit dizilimleri karşılaştırılmıştır. Nükleotid dizilimlerinin incelenmesi sonucunda 30 izolatin ikisinde (%6,6) 92'inci nükleotitte adamantan direncine yol açan G92A değişimi saptanmıştır (Şekil 4.7). Aynı izolatlardan amino asit dizilimleri incelendiğinde nükleotid dizilimindeki bu değişimin 31'inci amino asitte S31T değişimine neden olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4-7: H1N1 izolatlarında adamantan direncine neden olan 92'inci nükleotitte G→A değişimi. En alttaki iki dizi NCBI GenBank'tan alınan dirençli ve duyarlı iki referans virüse aittir.



Şekil 4-8: H1N1 izolatlarında adamantan direncine neden olan 31’inci amino asit pozisyonunda S→N değişimi. En alttaki iki dizi NCBI GenBank’tan aşınan dirençli ve duyarlı iki referans virüse aittir.

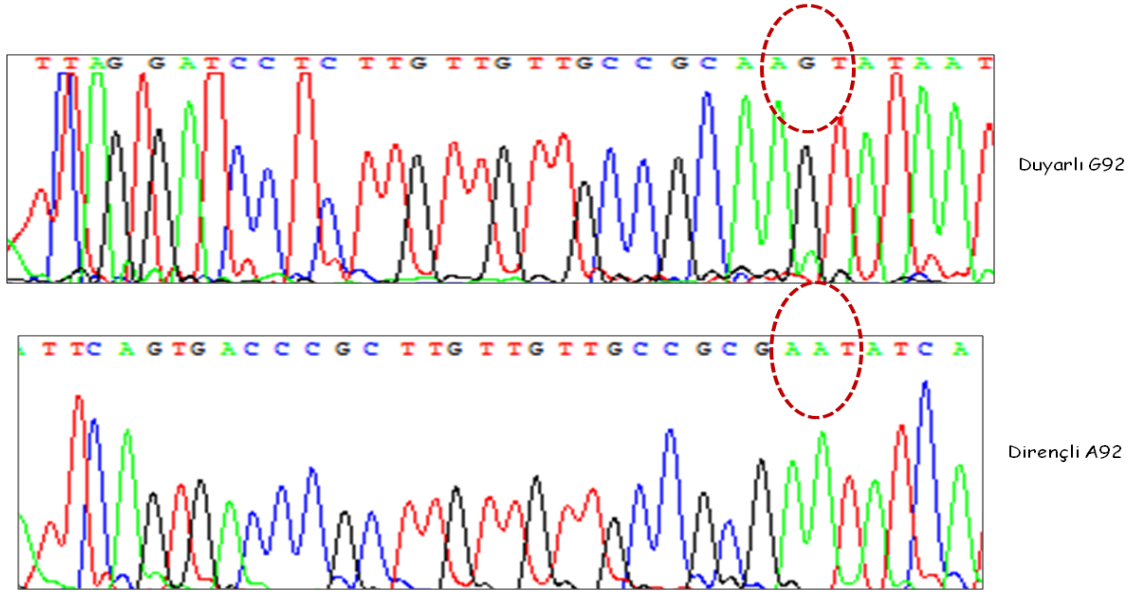
Sonuçta, incelenen 30 izolattan 2’sinde (% 6,6) adamantan direncine yol açan S31N mutasyonu saptanmış, V27A, A30T, G34E adamantan direnç mutasyonları saptanmamıştır. Adamantan direnci saptanan bu iki izolatta (A/1250/Bursa/07(H1N1), A/1249/İstanbul/07 (H1N1) nöraminidaz inhibitörlerine karşı direnç mutasyonu saptanmamıştır. Adamantan dirençli virüslerin saptandığı iki hastadan birinin 37 yaşında kadın diğerinin 11 yaşında erkek olduğu örneklerin Bursa ve İstanbul’dan gönderildiği, hastalık özelliklerinin ise klasik gripten farklı olmadığı gözlenmiştir.

4.2.2.3. H3N2 İzolatlarında Nöraminidaz İnhibitörü(NI) Direnci

Nöraminidaz direnç mutasyonları araştırılan 28 izolatın hiç birinde araştırılan zanamivir direnç mutasyonları (E119A/D, R292K, R371K, R224K E276D) ya da oseltamivir direnç mutasyonları (E119V, R292K, R371K, R224K) saptanmamıştır.

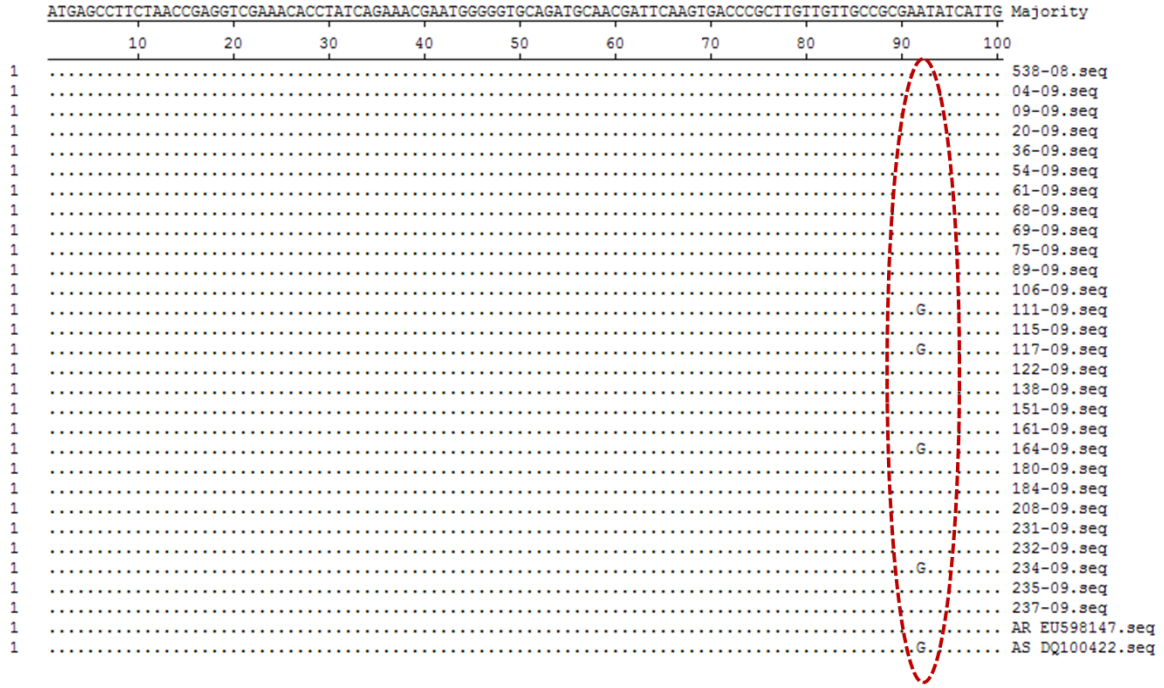
4.2.2.4. H3N2 İzolatlarında Adamantan Direnci

Örneklerin dizileme kromotogramları Chromas Lite programında incelenmiş ve 31’inci amino asitteki S→N değişiminine denk gelen G92A nükleotid değişimi adamantan direnci açısından değerlendirilmiştir (Şekil 4.9).

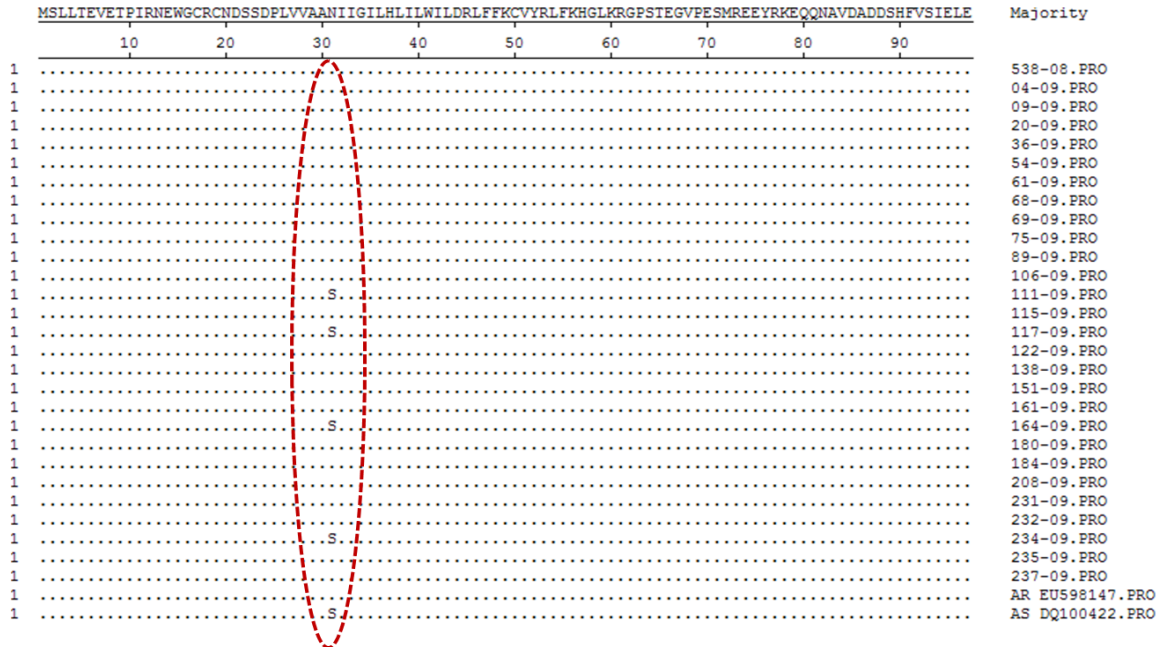


Şekil 4-9: H3N2 izolatlarında adamantanlara duyarlı ve dirençli izolatların dizileme kromotogramı. Kromotogramda üstteki duyarlı izolatta elips içine alınan AGT nükleotitleri Serin (S) amino asidini kodlayan 91, 92, 93'üncü nükleotitleri kapsamaktadır. Altteki dirençli izolatta ise 92'nci nükleotitteki G→A değişimi sonucunda AGT→AAT kodonuna dönüşerek S→N(Asparjin) değişimi ile sonuçlanmıştır.

Örneklerin nükleotid dizilimleri DNASTAR programının EditSeq modülü kullanılarak aminoasit dizilimlerine dönüştürülmüş ve daha sonra yine DNASTAR programının MegAlign modülü ile Clustal analizi yapılarak örneklerin ve referans suşlarının nükleotid ve amino asit dizilimleri karşılaştırılmıştır. Nükleotid dizilimlerinin incelenmesi sonucunda 28 izolatın 24'ünde (% 85,7) 92'inci nükleotitte adamantan direncine yol açan G92A değişimi saptanmıştır (Şekil 4.10). Aynı izolatların amino asit dizilimleri incelendiğinde nükleotid dizilimindeki bu değişimin 31'inci amino asitte S31T değişimine neden olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4-10: H3N2 izolatlarında adamantan direncine neden olan 92'inci nükleotitte G→A değişimi. Dizilemesi yapılan 28 izolatın 24'ünde, yani izolatların çoğunluğunda, G→A değişimi saptandığından dolayı, "majority" dizi bölümünde A nükleotidi yer almaktadır. Şekilde kırmızı elips içine alınan G nükleotidi ise görüldüğü üzere sadece 4 duyarlı izolatta saptanmıştır. En alttaki iki dizi NCBI GenBank'tan alınan adamantanlara dirençli ve duyarlı iki referans virüse aittir.



Şekil 4-11: H3N2 izolatlarında adamantan direncine neden olan 31'inci amino asit pozisyonunda S→N değişimi. Nükleotid diziliminde olduğu gibi direnç mutasyonunun izolatların çoğunda saptanması nedeniyle dirence neden olan N amino asidi çoğunluk (majority) amino asit bölümünde yer almaktadır. Şekilde kırmızı elips içine alınan S amino asidi ise görüldüğü üzere sadece 4 duyarlı izolatta saptanmıştır. En alttaki iki dizi NCBI GenBank'tan alınan adamantanlara dirençli ve duyarlı iki referans virüse aittir.

Sonuç olarak, incelenen 28 izolattan 24'ünde (%85,7) adamantan direncine yol açan S31N mutasyonu saptanmış (Tablo 4.3), L26F, V27A, A30T adamantan direnç mutasyonları saptanmamıştır. Dirençli izolatların saptandığı hastaların özellikleri incelendiğinde, hastaların sürveyans kapsamındaki tüm illere dağıldığı, yaş aralığının 1-49 arasında olduğu, ortalama yaşın 13 olduğu, 11'inin erkek (%45,8) 13'ünün (%54,2) kadın olduğu, hiç birinin grip aşısı yaptırmadığı, ve hiç birinde kronik bir hastalığın bulunmadığı, hastaların tümünün klasik grip belirtileri sergilediği saptanmıştır.

Tablo 4-3: 2008-2009 sezonunda izole edilen, S31N adamantan direnç mutasyonu taşıyan influenza A/H3N2 virüsleri ve saptandıkları iller.

S31N Adamantan Direnç Mutasyonu Taşıyan İnfluenza A Virüsleri	Saptanan İl
A/ İzmir/538/08 (H3N2)	İzmir
A/İstanbul/04/09 (H3N2)	İstanbul
A/Konya//09/09 (H3N2)	Konya
A/Ankara/61/09/ (H3N2)	Ankara
A/Ankara/75/09/ (H3N2)	Ankara
A/izmir/106/09/ (H3N2)	İzmir
A/İstanbul/180/09/ (H3N2)	İstanbul
A/İzmir/20/09/ (H3N2)	İzmir
A/İzmir/36/09/ (H3N2)	İzmir
A/Antalya/54/09/ (H3N2)	Antalya
A/Edirne/68/09/ (H3N2)	Edirne
A/Edirne/69/09/ (H3N2)	Edirne
A/Bursa/89/09/ (H3N2)	Bursa
A/İzmir/115/09/ (H3N2)	İzmir
A/İstanbul/122/09 (H3N2)	İstanbul
A/Edirne/138/09/(H3N2)	Edirne
A/Edirne/151/09/ (H3N2)	Edirne
A/İzmir/161/09/ (H3N2)	İzmir
A/İstanbul/184/09 (H3N2)	İstanbul
A/İstanbul/208/09 (H3N2)	İstanbul
A/İstanbul/231/09 (H3N2)	İstanbul
A/İstanbul/232/09 (H3N2)	İstanbul
A/Edirne/235/09/ (H3N2)	Edirne
A/Edirne/237/09/ (H3N2)	Edirne

Özetle, 2007-2008, 2008-2009 sezonlarında influenza sürveyansı kapsamında İTF, Ulusal Influenza Referans Laboratuvarına Antalya, Bursa, Edirne, İstanbul ve İzmir illerinden gönderilen örneklerden izole edilen influenza A virüslerindeki antiviral direnç oranları Tablo 4.4' de gösterilmiştir. Buna göre 2007-2008 sezonunda incelenen 30

H1N1 izolatında zanamivir direnci saptanmazken, 12 (%40) izolatta oseltamivir direnci, 2 (% 6,6) izolatta adamantan direnci saptanmıştır. 2008-2009 sezonunda incelenen 28

H3N2 izolatında ise oseltamivir ve zanamivir direnci saptanmazken, 24 (%85,7) izolatta adamantan direnci saptanmıştır.

Tablo 4-4: 2007-2008 (A/H1N1), 2008-2009 (A/H3N2) grip sezonunda izole edilen influenza A virüslerinde direnç durumu. Araştırılan oseltamivir direnç mutasyonlarından A/H1N1 izolatlarında H275Y, adamantan direnç mutasyonlarından A/H1N1 ve A/H3N2 izolatlarında S31N mutasyonu saptanmıştır.

Antiviral	A/H1N1	A/H3N2
	Dirençli / Toplam Örnek (%Direnç)	Dirençli / Toplam Örnek (%Direnç)
Oseltamivir	12 / 30 (%40)	0 / 28 (%0)
Zanamivir	0 / 30 (%0)	0 / 28 (%0)
Adamantanlar	2 / 30 (%6,6)	24 / 28 (%85,7)

5. TARTIŞMA

Bireysel ve toplumsal sağlık sorunlarına yol açmasının yanı sıra, bazı risk gruplarında yüksek mortalite ve morbidite oranları sonucu ciddi olumsuzluklara neden olan ve nihayet özellikle gelişmiş ülkelerde gerçekleştirilen çalışmalar ile ekonomik kayıplara yol açtığı kanıtlanan grip ile mücadelede aşılamanın yadsınmaz bir önemi vardır. Ancak bir yandan tüm dünyada aşılama oranlarının öngörülenin altında seyretmesi; öte yandan aşı başarısının dolaşımdaki suş ile aşı içeriğinin örtüşmesine bağlı olması; ayrıca yeni bir alt-tipin neden olacağı epidemilerde aşı eldesinde gecikme riskinin varlığı, tedavi ve profilaksi amaçlı anti-virallerin gündeme gelmesine neden olmuştur. Özellikle bir pandemi söz konusu olduğunda, etken virüsün yayılımını yavaşlatmada, aşı hazırlık süreci göz önüne alındığında, aşılama stratejisinin etkisiz kalma riski bulunmaktadır. Bu gibi durumlarda gündeme gelen antiviral kullanımının, enfeksiyonun kontrolünde önemli bir yer tuttuğu; ağır grip olgularında önemli rol oynadığı ve profilaktik amaçla kullanıldığında olası bir pandeminin yayılım hızını azaltacağı konusunda görüş birliğine varılmıştır ^{6,13}. Belirtilen bu gerekçelerden hareketle, mevsimsel gribin profilaksi ve tedavisinde önemli yeri olan, aynı zamanda potansiyel bir pandemi söz konusu olduğunda birçok ülkenin pandemi hazırlık planları kapsamında stoklanmaları öngörülen antivirallere karşı direnç gelişimi önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu nedenle direnç gelişiminin takibi, sorunun boyutunu anlamak, antiviral kullanım yaklaşımlarını düzenlemek ve çözüm üretmek açısından önem taşımaktadır.

Adamantanlar ve nöraminidaz inhibitörleri grip profilaksisi ve tedavisinde kullanılmak üzere onaylanmış antivirallerdir. 1966 yılında FDA'dan onay alan ve 1976 yılından bu yana da ABD'de yaygın kullanımda olan adamantanlar uzun süreden beri de Fransa, İngiltere, Rusya ve Doğu Avrupa Ülkelerinin yanı sıra, Çin, Hong Kong gibi Asya ülkelerinde kullanılmaktadır ¹⁵⁷. Bu ülkelerin bazılarında adamantanlar sadece profilaksi amacıyla kullanılmak üzere onaylanmış, bazı ülkelerde reçete ile satılırken bazılarında ise reçetelendirilmeden (tezgâh üstü) satılmaktadır. Ülkemizde adamantanların influenza tedavisinde kullanılması konusunda Sağlık

Bakanlığı tarafından yapılan bir düzenleme mevcut değildir. Ancak 2006 yılında yayınlanan Pandemik İnfluenza Ulusal Faaliyet Raporun'da antiviraller ile ilgili ABD kaynaklı düzenlemeler kabul edilmiş; buna göre adamantan ve rimantadinin olası bir pandemi durumunda sadece profilaktik amaçlı kullanımı konusunda düzenleme yapılmıştır ¹⁵⁸. Adamantanların profilaktik etkinliğinin % 80-90 dolaylarında olduğu ve hastalık semptomlarının başlangıcından sonraki 48 saat içinde kullanıldığında hastalık süresini 1,5 gün kısalttığı bildirilmiştir ¹⁰. Ancak, yalnızca influenza A virüslerine karşı etkili olmaları, toksisitesilerinin yüksek olması ve hızlı direnç gelişimi nedeniyle günümüzde adamantanların kullanımına sınırlama getirilmiştir. Bu bağlamda, CDC 2005-2006 sezonunda direnç oranlarının yüksek olması nedeniyle adamantanların profilaktik ya da tedavi amaçlı kullanılmamaları gerektiği doğrultusunda uyarıda bulunmuştur ¹⁵⁹. 1999 yılında dünyanın birçok ülkesinde kullanıma giren nöraminidaz inhibitörlerinin ise sağlıklı bireylerde 36-48 saat içinde kullanımının semptomatik hastalık süresini 1-2 gün kısalttığı, komplikasyonları ve antibiyotik kullanımını azalttığı bildirilmiştir ¹⁶⁰. Hem influenza A hem de B virüslerine karşı etkin olmaları, deneysel çalışmalarda direnç gelişiminin sınırlı oranda saptanması, iyi tolere edilmeleri ve etkinliklerinin de yüksek olması nedeniyle bu moleküllere ilgi artmış ve NAI'lerine karşı direnç gelişimini takip amacıyla işbirliği halinde çalışan araştırma ağları kurulmuştur. Bunlardan en geniş kapsamlı olanlar, dünya genelinde direncin takibi için 1999'da kurulan NISN ve Avrupa'da dolaşımda bulunan influenza virüslerinde direnci takip etmek amacıyla 2004 yılında kurulan Antiviral Dirence Karşı Tedbir Ağı'dır (for Vigilance Against Antiviral Resistance-VIRGIL) ¹⁶¹. 1991 yılından bu yana ise DSÖ'nün CDC'deki influenza kolaboratif merkezinde dünya genelinde gönderilen influenza izolatlarında antiviral direnç takibi yapılmaktadır ¹⁰. 2007 yılının son dönemlerine kadar NAI'lerine karşı endişe uyandıracak bir direnç gelişimi bildirilmemiş; direnç bildirimi çoğunlukla immün sistemi baskılanmış hastalardan izole edilen virüslerle sınırlı kalmıştır.

Adamantan direncinin izlemi çoğunlukla M2 molekülünün trans-membran bölgesinde iyi tanımlanmış mutasyonların saptanmasına dayanmaktadır. Ancak, NA molekülünde NAI'lerine karşı dirence neden olan mutasyonlar kesin olarak tanımlanmamıştır ve dirence neden olan yeni mutasyonların bildirimi sürmektedir. Bu

nedenle, adamantan direnci çoğunlukla sadece genotipik analiz ile saptanmasına karşın NAI'lerine karşı direnç durumu NA aktivitesinin inhibe edilmesi esasına dayanan fenotipik testler ve bunu takiben yapılan genetik analiz ile saptanmaktadır ¹⁶². Kısaca, fenotipik direnç çalışmaları henüz tanımlanmamış yeni direnç mutasyonlarının saptanabilmesine olanak tanırken; genotipik direnç çalışması sadece bilinen direnç mutasyonlarının araştırılması esasına dayanmaktadır.

Literatürde adamantanlara karşı yaygın direncin 2004 yılında Asya ve ABD'de SARS epidemisi sırasında antiviralin yoğun kullanımı sonucunda gerçekleştiğine dikkat çekilmiştir ¹⁶³. Nitekim, DSÖ'nün CDC kolaboratif merkezinden Ziegler ve arkadaşları ¹⁵⁷ 1991-1995 yılları arasında dünya genelinde gönderilen örneklerden izole edilen toplam 2017 influenza virüsünde fenotipik adamantan direnç araştırması yapmış; örneklerin %80'ini oluşturan H3N2 virüslerinden sadece 16'sında (%1,0) direnç saptamışken H1N1 izolatlarında ise direnç saptamamışlardır. Genotipik analizi yapılan bu dirençli izolatlardan 15 tanesinin S31N, bir tanesinin A30T mutasyonu içerdiği gösterilmiştir Aynı çalışmada, adamantanların yaygın olarak kullanımda olduğu bazı Avrupa ve Asya ülkelerinden (Çin ve Hong Kong) izole edilen virüslerde direnç saptanmazken, adamantan kullanımının oldukça sınırlı olduğu Avustralya'dan izole edilen örneklerin 5 tanesinde direnç saptanması dikkat çekicidir. Bu incelemenin verileri adamantan direncinin dünya genelinde 1995 yılına kadar oldukça düşük (yaklaşık %0,8) oranlarda seyrettiğini göstermektedir. Birçok araştırmacı 1978-1999 yılları arasında izole edilen influenza A virüslerinde genel olarak düşük düzeyde adamantan direnci bildirmişlerdir ^{135,164,165}.

Ancak, bu çalışmaları takiben yine DSÖ'nün CDC kolaboratif merkezinden Bright ve arkadaşları ¹⁰ bilinen en kapsamlı direnç çalışmasında dünya genelinde 1994-2005 yılları arasında izole edilen 6524 adet A(H3N2) ve 589 adet A (H1N1) virüsünde genotipik adamantan direncini araştırmışlar; 392 adet (%6) H3N2 ve 2 adet (%0,3) H1N1 izolatında adamantan direnç mutasyonları saptamışlardır. Dirençli H3N2 virüslerinin S31N (%98,2), L26F (%0,8), V27A (%0,8), A30T (%0,2), H1N1 virüslerinin ise V27A ve G34E direnç mutasyonu taşıdıkları saptanmıştır. Ayrıca dirençli H3N2 izolatlarının %84'ünün 2003 sezonundan bu yana izole edilen virüsler olduğu ve bu izolatların %61'inin Asya kökenli olduğunu bildirilmiştir. Antiviral

dirençli izolatların saptandığı ülkeler arasında ABD, Çin, Hong Kong, Tayvan, Güney Kore, Japonya, Meksika, Kanada, Arjantin, Fransa, İtalya, Rusya ve Peru gibi ülkelerin de bulunduğu dikkat çekilen bu çalışmada direnç oranlarının bu ülkelerde 2004 öncesinde ender olduğu; direnç oranının 1994-1995 sezonunda % 0,4'ten 2003-2004 sezonunda %12'ye yükseldiği bildirilmiştir. Zeigler ve arkadaşları¹⁵⁷ Asya'dan direnç bildirilmezken Bright ve arkadaşlarının¹⁰ bu çalışmasında Asya ülkelerinden elde edilen izolatlarda %61 oranında direnç saptanmış olması dikkat çekicidir. Bu çalışmanın verileri önceki çalışmalarla karşılaştırıldığında 2004'e gelindiğinde direnç oranlarında önemli bir artış olduğu görülmektedir. 2005-2006 sezonuna gelindiğinde adamantan direncinin H3N2 virüslerinde %96,4'e, H1N1 virüslerinde ise %15,5'e yükseldiği bildirilmiştir¹⁶⁶. DSÖ'nün Avustralya'da bulunan kolaboratif merkezinde yapılan başka bir çalışmada 2007 mevsiminde izole edilen influenza A/H3N2 virüslerinde adamantan direncinin tüm ülkelerde yükselmeye devam ettiği; buna karşın Avustralya, Yeni Zelanda ve Avrupa ülkelerinde izole edilen H1N1 virüslerinde adamantan direnci düşük iken (%2-9) Güneydoğu Asya ülkelerindeki H1N1 virüslerinde yüksek oranda (%33-100) direnç saptandığı bildirilmiştir¹⁶⁷. Bu farklılığın nedeni olarak 2007 mevsiminde birçok ülkede A/Brisbane/59/2007 (H1N1) benzeri virüs dolaşımında iken, Güneydoğu Asya ülkelerinde A/Hong Kong/2652/2006 (H1N1) benzeri virüsün dolaşımında olması gösterilmiştir. Buna göre A/Hong Kong/2652/2006 benzeri H1N1 virüslerinde adamantan direnç oranının diğer H1N1 virüslerinden daha yüksek olabileceği öne sürülmüş; ancak bunun nedeni konusunda yorum yapılmamıştır. Ancak bu iki farklı alt-tip oseltamivir direnci açısından karşılaştırıldıklarında iki grup arasında fark gözlenmediği, her iki virüsün de aynı oranda duyarlı oldukları saptanmıştır. Kanada'da 1970-2007 yıllarını kapsayan adamantan direnç çalışmasında H3N2 virüslerinde direncin 2004 yılına kadar düşük seyrettiği ancak bu yıldan sonra artmaya başladığı; saptanan mutasyonunun S31N olduğu ve iki izolatta S31N mutasyonuna ek olarak A30T mutasyonu saptandığı bildirilmiştir. H1N1 izolatlarında ise direnç saptanmamıştır¹⁶⁸. Antiviral direnci konusunda batı komşumuz Yunanistan tarafından bildirilen bir çalışmada 2004-2007 sezonlarında kuzey Yunanistan'da izole edilen toplam 34 A(H3N2) virüsü adamantan ve NI direnci açısından incelenmiş; 2004-2005 sezonuna ait 14 izolatta adamantan direncine rastlanmazken, 2005-2006 sezonunda incelenen

suşlardan 8'inde, 2006-2007 sezonunda izole edilenlerin ise 12'sinde (%88 ve %75 oranlarında) direnç mutasyonu (S31N) saptanmıştır ¹⁶³. Bu çalışmada kullanılan örnek sayısı yukarıdaki çalışmalarda kullanılan örnek sayısına göre oldukça düşük olmasına karşın antiviral direncin değişimi konusunda diğer verilerle uyumlu bilgi vermektedir.

Sonuç olarak yukarıda bildirilen tüm çalışmalar birlikte irdelendiğinde adamantan direnç oranlarının 2004 yılından başlayarak özellikle H3N2 virüslerinde hızla yükseldiğini söylemek olasıdır.

NI'lerine karşı direnç takibi bu antivirallerin kullanıma girmesinden (1999) hemen sonra başlamıştır. Bu bağlamda ilk kapsamlı çalışma bazal (baseline) düzeyi belirlemek amacıyla 1996-1999 sezonlarında izole edilen 1054 adet influenza virüsünde gerçekleştirilmiş; beklendiği üzere dirence rastlanmamıştır ⁵. Bunu takiben DSÖ, CDC kollaboratif merkezinden Sheu ve arkadaşları ¹⁶² dünya genelinde 2004-2008 yılları arasında izole edilen toplam 2364 (1128 adet H1N1, 1236 adet H3N2) influenza A izolatında NAI direncini araştırmış ve yalnızca altı adet (%0,5) A (H1N1) izolatında H275Y oseltamivir direnç mutasyonu, bir adet (% 0,08) A (H3N2) izolatında da E119V oseltamivir direnç mutasyonu saptamışlardır. Mutasyon saptanan altı adet A (H1N1) izolatından dördünün 2006-2007 sezonunda izole edildiği ve 2007-2008 sezonunun başlangıcında bu sayıda 10 kat artışına dikkat çekilmiştir. Bu veriler doğrultusunda H1N1 virüslerinde oseltamivir direncinin 2006-2007 sezonundan başlayarak artışa geçtiğini söylemek mümkündür.

2006-2007 yılına kadar düşük seyreden oseltamivir direncinin 2007 yılının son dönemlerinde Norveç'te %67 gibi endişe verici bir orana ulaştığının Lakenby ve arkadaşları ¹⁶¹ tarafından DSÖ'ne bildirilmesi, H5N1 virüsleri ile bir pandeminin beklendiği bu dönemde büyük endişe uyandırmış ve birçok ülkede antiviral direnç çalışmalarını tetiklemiştir. Bu bağlamda biz de GISN'e bir ön bilgi sağlamak amacıyla laboratuvarımızda 2007-2008 sezonunun pik dönemlerinde izole ettiğimiz bazı A (H1N1) virüslerinde sadece oseltamivir direncini araştırıp sonuçlarımızı yayınladık ¹⁶⁹. Şimdiki tez çalışmasının başlamasına önayak olan bu pilot çalışma dışında ülkemizde adamantan ya da NAI karşı direnç tespiti için herhangi bir çalışma bildirilmemiştir. Ülkemizde bir ilk olan bu çalışmada, 2007-2008 ve 2008-2009 yıllarında dolaşımda bulunan influenza A virüslerinde hem adamantanlara hem de nöraminidaz

inhibitörlerine karşı direnç durumu araştırılmıştır. Her iki antiviral grubu için tanımlanmış direnç mutasyonlarının saptanması esasına dayanan genetik analiz yöntemi kullanılarak yapılan çalışmamızda, 2007-2008 sezonunda izole edilen 30 adet influenza A/H1N1 izolatının 12'sinde (%40) H275Y oseltamivir direnç mutasyonu saptanmış; buna karşın incelenen izolatlarda zanamavir direnç mutasyonu belirlenmemiştir. Aynı H1N1 izolatlarının sadece ikisinde (%7,2) S31N adamantan direnç mutasyonu saptanmıştır. Çalışmada, dirençli izolatların iki grup antiviralden sadece birine karşı direnç mutasyonu içerdikleri, aynı anda iki mutasyonu içeren izolata rastlanılmadığı göze çarpmaktadır. 2008-2009 sezonunda izole edilen H3N2 virüslerinde ise NAI'lerine karşı direnç mutasyonu saptanmazken, 28 izolatın 24'ünde (%85,7) S31N adamantan direnç mutasyonu saptanmıştır. Kıyaslama yaptığımızda 2007-2008 sezonunda A/H1N1 izolatlarında oseltamivir direnç oranları Norveç, Fransa, Hollanda, Kanada, Çin, ABD, Japonya, İtalya'dan sırasıyla %67, %46, %30 %26, %14, %10, %1,6, %0,9 olarak bildirilmiştir ¹⁷⁰. 2007-2008 sezonunda Mart 2008 dönemini kapsayacak şekilde dünya genelinde incelenen 7530 influnenza A (H1N1) izolatından 1182'sinde (%16) H275Y mutasyonu saptanmış, komşumuz olan Yunanistan'da direnç oranı incelenen 65 A(H1N1) izolatında %11 olarak bildirilmiştir ¹⁷¹. Avrupa'da VIRGIL çalışma grubu tarafından yayınlanan raporda ise 2007-2008 sezonunda tüm bölge ülkelerinde dolaşımda baskın olan virüsün A/H1N1 alt tipi olduğu ve oseltamivir direnci saptanan izolatların zanamavir ve adamantanlara karşı duyarlı oldukları bildirilmiştir ¹⁶¹. Bu veriler bizim verilerimizle benzer özellik taşımaktadır. DSÖ'ne yapılan bildirimler toplam olarak değerlendirildiğinde dünya genelinde H1N1 virüslerinde direnç 2007-2008 sezonunda %15 iken 2008-2009 sezonunda %96'ya yükselmiştir ¹⁷². Buna göre dünya genelinde 2008-2009 sezonunda oseltamivire karşı dirençli A/H1N1 virüslerinin baskın oldukları gözlenmektedir. Ancak laboratuvarımızda 2008-2009 sezonunda H1N1 virüslerinin izole edilmemiş olması nedeniyle bu verilerin ülkemiz için geçerli olup olmadığı konusunda yorum yapmak mümkün değildir.

Orta ve Güney Amerika'da 2005- 2008 yıllarını kapsayan benzer bir direnç çalışmasında incelenen toplam 167 A/H1N1 izolatından yedi tanesinin (%4,2) H275Y oseltamivir direnç mutasyonu, bir tanesinin (%0.59) ise L26F adamantan direnç mutasyonu içerdiği saptanmıştır ¹⁷³. Söz konusu çalışmada, oseltamivir direnç

mutasyonu içeren yedi H1N1 izolatının 2007- 2008 sezonunda izole edilen virüsler olduğuna 2005-2006 ve 2006-2007 sezonlarında izole edilen A/H1N1 virüslerinde direnç mutasyonu saptanmadığına vurgu yapılmıştır. Buna göre, Orta ve Güney Amerika'da da H1N1 virüslerinde oseltamivir direncinde artışın 2007-2008 sezonunda hızlanmaya başladığı görülmektedir. Aynı çalışmada incelenen 298 A/H3N2 izolatından 285'inin (%95,5) adamantan direncine neden olan S31N mutasyonu içerdiği saptanırken, NAI'lerine karşı direnç mutasyonları saptanmamıştır. Oseltamivir direnç oranı bizim çalışmamıza kıyasla düşük oranda bulunan bu araştırmada adamantan direnç oranı bizim çalışma sonuçlarımıza benzerdir. Ancak, çalışmamızdan farklı olarak H1N1 virüslerinde adamantan direnci ile ilgili mutasyonlardan S31N değil, L26F mutasyonu sorumlu bulunmuştur.

Yukarıda bildirilen çalışmalara uyumlu olarak bizim çalışmamızda da H1N1 virüslerinde düşük olan adamantan direnç oranlarının H3N2 virüslerinde oldukça yüksek olduğu görülmektedir. H1N1 virüslerinde 2007-2008 sezonunda gözlenen yüksek oranda oseltamivir direnci ülkemiz için de geçerlidir. Ancak, ülkemizde 2007-2008 sezonundan önceki sezonlarda izole edilen virüslerde antiviral direnci konusunda veri bulunmaması nedeniyle direnç oranlarındaki değişimler konusunda yorum yapmak mümkün değildir.

Yukarıdaki çalışmaların bulgularından da görüldüğü üzere bizim verilerimizle uyumlu olarak adamantan dirençli H1N1 ve H3N2 virüslerinde çoğunlukla S31N mutasyonu, oseltamivir dirençli H1N1 virüslerinde ise H275Y mutasyonu saptanmıştır. Aynı zamanda, her iki antiviral grubuna karşı direnç oranlarının düşük olarak saptandığı dönemlerde (adamantanlar için 2004 öncesi, nöraminidaz inhibitörleri için ise 2007 öncesi) dirençli izolatların antiviral tedavi almış kişilerden izole edildiğine; direnç oranlarının yüksek olduğu dönemlerde ise dirençli izolatların büyük çoğunluğunun antiviral tedavi almamış hastalardan izole edildiğine dikkat çekilmiştir ¹⁰. Bu durum, dirençli virüslerin ortak odaklardan çıkıp dünyaya yayılmış olabileceğine işaret etmektedir. Adamantan tedavisi alan hastaların %30'unun dirençli suşları yaymaya başlamaları, dirençli virüslerin tedavi alan hastalardan köken alıp dünya genelinde yayıldığı görüşünü güçlendirmektedir ¹⁰.

Adamantan direncinin H1N1 virüslerinde düşük iken H3N2 virüslerinde yüksek olması ise dikkat çekicidir. Adamantanların henüz geliştirilmemiş oldukları dönemde

izole edilen bazı A (H1N1) suşlarında (A/PR/8/34 ve A/WSN/33) adamantan direnç mutasyonunun saptanmış olması, direnç mutasyonlarının ilaç baskısı olmadan spontan olarak oluşabileceğine işaret etmektedir. H3 virüslerinde gözlenen yaygın yüksek direnç oranının nedeni olarak M2 geninde oluşan bu spontan direnç mutasyonlarına virüslerin yayılımını kolaylaştıran HA genindeki antijenik driftin eşlik etmesiyle gerçekleşmiş olabileceği konusunda görüşler ileri sürülmüştür. Bu görüşe göre, dirençli H3 virüslerinin devam eden genetik ve antijenik değişim ile yeniden duyarlılık kazanabilme olasılıkları vardır. Bu durumda adamantanların influenzanın profilaksi ve tedavisinde kullanımı yeniden gündeme gelebilecektir ^{10,174}.

Oseltamivire dirençli H1N1 virüslerin özelliklerini ortaya koymak amacıyla birçok araştırma yapılmıştır. Bunlardan Herlocher ve ark.¹⁷⁵ dirençli virüslerin gelinciklerde bulaş özelliklerinin düşük olduğunu ileri sürmüş; Ives ve arkadaşları ¹⁷⁶ oseltamivir dirençli H1N1 virüslerinin çoğalma kinetiğinde 3 log azalma gözlemledikleri, buna karşın Rameix ve arkadaşları ¹⁷⁷ oseltamivir dirençli ve duyarlı H1N1 izolatlarının çoğalma kinetiğini karşılaştırdıkları çalışmalarında her iki virüs arasında fark olmadığını bildirmişlerdir. Biz de 2007 yılında yaptığımız pilot çalışma sırasında oseltamivir dirençli H1N1 izolatlarının hücre kültüründe duyarlı izolatlarla göre daha uzun sürede sitopatik etki göstermeye başladıklarını gözlemlemiş ancak çoğalma kinetiği konusunda araştırma yapmamıştık. 2008-2009 sezonuna gelindiğinde oseltamivir ve adamantan dirençli virüslerin dünya çapında yayılımı, dirençli virüslerin duyarlı olanlara kıyasla daha üstün bir adaptasyon özelliğine sahip oldukları olasılığını düşündürmektedir. Ancak bu konuda kesin bir yargıya varabilmek için kapsamlı verilere ihtiyaç vardır.

Adamantanlarda olduğu gibi oseltamivire karşı dirençli suşların ortaya çıkışı ve yayılımı ile oseltamivir kullanımı arasında bir bağlantı bulunamamıştır ¹⁷⁸. Aynı zamanda oseltamivire duyarlı ve dirençli A H1N1 virüslerinin benzer epidemiyolojik karakter sergilediği bildirilmiştir ¹⁷⁹. Bizim çalışmamızda da adamantan ve oseltamivire dirençli ya da duyarlı olan izolatların izole edildikleri hastaların klinik tablolarının benzer özellik taşıdıkları gözlenmiştir. İnfluenza virüslerinin uygun konak hücrelerini enfekte etmesinden sonra hastalık oluşum sürecini değiştirme konusunda yapılabilecekler sınırlıdır ¹⁶⁰. Bu nedenle influenza enfeksiyonları sözkonusu olduğunda

öncelikli olarak enfeksiyonun önlenmesine çalışılır. Bu amaçla tüm influenza virüslerine karşı etkin, antijenik değişimden etkilenmeyen evrensel (universal) influenza aşılarının geliştirilmesi için yoğun çaba harcanmaktadır¹⁸⁰. Ancak var olan influenza enfeksiyonu nedeniyle hastaneye başvuran ve tedavi gerektiren olgularda etkin antiviraller kritik rol oynamaktadır. Günümüzdeki mevcut antivirallerin kullanımından amaç gerek epidemik gerekse pandemik influenzayı önlemek ve tedavi etmektir. Gelecekteki hedef ise virüslerin yaşam döngülerinin farklı evrelerini hedef alan ve mutasyona uğrama olasılığı düşük yeni etkin antivirallerin geliştirilmesidir. Bu amaçla zanamivir modifiye edilerek kas ve damar içi uygulamaya uygun enjektabl preparatları hazırlanmaktadır. Aynı zamanda yeni bir NI olan Peramivirin de kas ve damar içi formülasyonları klinik çalışma aşamasındadır. Yeni geliştirilen inhalasyon yoluyla uygulanabilir bir antiviral de CS 8958'dur. RNA polimeraz inhibitörü favipiravirin (T-705) klinik çalışmaları Japonya ve ABD'de devam etmektedir¹⁸¹.

Antiviral direnci konusunda aydınlatılması gereken bazı önemli noktalar bulunmaktadır. Örneğin in-vitro fenotipik ve genotipik antiviral direncinin klinik sonuçlarının ne olduğu konusunda net bir bilgi mevcut değildir. Yukarıdaki bölümlerde de değinildiği gibi dirençli virüsler ilk olarak tedavisi uzun süren, çoğunlukla immün sistemi baskılanmış hastalardan izole edilmiştir. Ancak son yıllarda gripe yakalanan sağlıklı bireylerden yaygın olarak izole edilen dirençli suşların hastalığın seyrini değiştirmede göz önüne alındığında in-vitro direncin ne anlama geldiğinin belirlenmesi için yeni araştırmaların gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Ayrıca, dirençli virüslerin duyarlı virüslerden daha baskın olmasına neden olan viral, çevresel ve konak faktörlerin ortaya konması için geniş kapsamlı araştırmalara ihtiyaç vardır.

Yeni antivirallerin tasarlanması ve üretilmesi uzun zaman almaktadır. Mevcut veriler ışığında dirençli bir mutant suşun tedavi alan hastalardan çevreye yayılmasının oldukça kolay olduğu anlaşılmaktadır. Bu nedenle, reçetelendirilmemiş antiviral kullanımının engellenerek antiviral tedavileri hekim kontrolünde ve gerekli durumlarda uygulanmalı; düzenli yıllık sürveyans çalışmaları ile influenza virüslerine karşı direnç durumu takip edilerek ilgili taraflar bilgilendirilmelidir.

KAYNAKLAR

1. Cox NJ, Kawaoka Y. Orthomyxoviruses: Influenza. İçinde Mahy BWJ, Collier L, editörler. *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections*. New York: Oxford University Press; 1998. pp. 385-433
2. Nicholson KG, Wood JM, Zambon M. Influenza. *Lancet* 2003; **362**: 1733-1745.
3. Bragstad K, Nielsen LP, Fomsgaard A. The evolution of human influenza A viruses from 1999 to 2006: a complete genome study. *Virology* 2008; **5**: 40, doi:10.1186/1743-422X-5-40.
4. Eiland LS, Eiland EH. Zanamivir for the prevention of influenza in adults and children age 5 years and older. *Ther Clin Risk Manag* 2007; **3**: 461-465.
5. McKimm-Breschkin J, Trivedi T, Hampson A, Hay A, Klimov A, Tashiro M, et al. Neuraminidase sequence analysis and susceptibilities of influenza virus clinical isolates to zanamivir and oseltamivir. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**: 2264-2272.
6. Monto AS, McKimm-Breschkin JL, Macken C, Hampson AW, Hay A, Klimov A, et al. Detection of influenza viruses resistant to neuraminidase inhibitors in global surveillance during the first 3 years of their use. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**: 2395-2402.
7. McCullers JA. Antiviral therapy of influenza. *Expert Opin Investig Drugs* 2005; **14**: 305-312.
8. Lagoja IM, De Clercq E. Anti-influenza virus agents: synthesis and mode of action. *Med Res Rev* 2008; **28**: 1-38.
9. Sugrue RJ, Tan BH, Yeo DS, Sutejo R. Antiviral drugs for the control of pandemic influenza virus. *Ann Acad Med Singapore* 2008; **37**: 518-524.
10. Bright RA, Medina MJ, Xu X, Perez-Oroz G, Wallis TR, Davis XM, et al. Incidence of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005: a cause for concern. *Lancet* 2005; **366**: 1175-1181.
11. Mungall BA, Xu X, Klimov A. Surveillance of influenza isolates for susceptibility to neuraminidase inhibitors during the 2000-2002 influenza seasons. *Virus Res* 2004; **103**: 195-197.

12. CDC. FluView. A Weekly Influenza Surveillance Report Prepared by Influenza Division. 2008-2009 Influenza Season Seasonal Flu Weekly Data. 2009, Mayıs. Erişim 06.05.2010, http://www.cdc.gov/h1n1flu/pubs/pdf/FluView_Week17.pdf
13. Oxford JS. Antivirals for the treatment and prevention of epidemic and pandemic influenza. *Influenza Other Respi Viruses* 2007; **1**: 27-34.
14. Ferraris O, Kessler N, Lina B. Sensitivity of influenza viruses to zanamivir and oseltamivir: a study performed on viruses circulating in France prior to the introduction of neuraminidase inhibitors in clinical practice. *Antiviral Res* 2005; **68**: 43-48.
15. Ferraris O, Lina B. Mutations of neuraminidase implicated in neuraminidase inhibitors resistance. *J Clin Virol* 2008; **41**: 13-9.
16. Escuret V, Frobert E, Bouscambert-Duchamp M, Sabatier M, Grog I, Valette M et al. Detection of human influenza A (H1N1) and B strains with reduced sensitivity to neuraminidase inhibitors. *J Clin Virol* 2008; **41**: 25-28.
17. WHO. Influenza A (H1N1) virus resistance to oseltamivir-Last quarter 2007 to 2 June 2008. 2008 Haziran. Erişim 11.07.2010, <http://www.who.int/csr/disease/influenza/ResistanceTable200806013.pdf>.
18. Kilbourne ED. Influenza pandemics of the 20th century. *Emerg Infect Dis* 2006; **12**: 9-14.
19. Taubenberger JK, Morens DM. 1918 Influenza: the mother of all pandemics. *Emerg Infect Dis* 2006; **12**: 15-22.
20. Webster RG, Peiris M, Chen H, Guan Y. H5N1 outbreaks and enzootic influenza. *Emerg Infect Dis* 2006; **12**: 3-8.
21. WHO. *World now at the start of 2009 influenza pandemic*. 2009, 11 Haziran. Erişim 10.11.2010, http://who.int/mediacentre/news/statements/2009/h1n1_pandemic_phase6_20090611/en/index.html.
22. Wilschut JC, McElhaney JE, Palache MA. Introduction. İçinde Wilschut JC, McElhaney JE, Palache MA, editörler. *Influenza*. PA, USA: Mosby-Elsevier; 2006. pp. 11-23

23. Lattanzi M. Non-recent history of influenza pandemics, vaccines, and adjuvants. İçinde Rino Rappuoli, Guiseppe Del Giudice editörler. *Influenza vaccines for the future*. Basel: Birkhauser Verlag; 2008. pp. 245-260
24. Potter CW. Chronicle of influenza pandemics. İçinde Nicholson KG, Webster RG, Hay AJ, editörler. *Textbook of Influenza*. Oxford: Blackwell Science; 1998. pp. 3-18
25. Tyrrel D. Discovery of Influenza Viruses. İçinde Nicholson KG WR, Hay AJ, editörler. *Textbook of Influenza*. Oxford: Blackwell Science, 1998. pp. 19-26.
26. Shope RE. Swine Influenza : I. Experimental Transmission and Pathology. *J Exp Med* 1931; **54**: 349-59.
27. Smith W, Andrewes CH, Laidlaw PP. A virus obtained from influenza patients. *Lancet* 1933; **2**: 66-68.
28. Andrewes CH, Laidlaw PP, Smith W. The susceptibility of mice to the viruses of human and swine influenza. *Lancet* 1934; **224**: 859-862.
29. Smith W, Stuart-Harris CH. Influenza infection of man from the ferret. *Lancet* 1936; **228**: 121-123.
30. Rappuoli R, Del Giudice G. Waiting for a pandemic. İçinde Rappuoli R, Del Giudice G, editörler. *Influenza Vaccines for the Future*. Basel: Birkhauser Verlag; 2008. pp. 1-8
31. Taubenberger JK, Kash JC. Influenza virus evolution, host adaptation, and pandemic formation. *Cell Host Microbe* 2010; **7**: 440-451.
32. WHO. *WHO Global Influenza Surveillance Network*. Erişim 09.09.2010, <http://www.who.int/csr/disease/influenza/surveillance/en/>
33. Palese P, Shaw ML. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. İçinde Knipe DM, Howley PM, editörler. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. pp. 1647–1689
34. Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, Bestebroer TM, Herfst S, Smith D, et al. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol* 2005; **79**: 2814-2822.

35. Rossman JS, Jing X, Leser GP, Balannik V, Pinto LH, Lamb RA. Influenza virus m2 ion channel protein is necessary for filamentous virion formation. *J Virol* 2010; **84** : 5078-5088.
36. Lamb RA, Krug RM. Orthomyxoviridae. The Viruses and Their Replication. İçinde Fields BN, Knipe DM, Howley PM et al., editörler. *Fundamental Virology*. Philadelphia: Lippincott- Raven; 1996. pp. 605-647
37. Bouvier NM, Palese P. The biology of influenza viruses. *Vaccine* 2008; 26 Suppl 4: D49-53.
38. Elto D, Digard P, Tiley L, Ortin J. Structure and function of the influenza virus RNP. İçinde Kawaoka Y editör. *Influenza Virology Current Topics*. Norfolk: Caister Academic Press; 2006. pp. 1-36
39. Hutchinson EC, von Kirchbach JC, Gog JR, Digard P. Genome packaging in influenza A virus. *J Gen Virol* 2010; **91**: 313-28.
40. Varki A. Glycan-based interactions involving vertebrate sialic-acid-recognizing proteins. *Nature* 2007; **446**: 1023-29.
41. Virology Blog. *Influenza Virus Attachment to Cells*. Erişim 10.10.2010, <http://www.virology.ws/2009/05/04/influenza-virus-attachment-to-cells>
42. Wright P. F, Neumann G, Kawaoka Y. Orthomyxoviruses. İçinde Knipe DM, Howley PM, editörler. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. pp. 1691–1740
43. Shinya K, Ebina M, Yamada S, Ono M, Kasai N, Kawaoka Y. Avian flu: influenza virus receptors in the human airway. *Nature* 2006; **440**: 435-6.
44. Claas EC, Osterhaus AD, van Beek R, De Jong JC, Rimmelzwaan GF, Senne DA, et al. Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. *Lancet* 1998; **351**: 472-477.
45. Matrosovich M, Tuzikov A, Bovin N, Gambaryan A, Klimov A, Castrucci MR, et al. Early alterations of the receptor-binding properties of H1, H2, and H3 avian influenza virus hemagglutinins after their introduction into mammals. *J Virol* 2000; **74**: 8502-8512.

46. ViralZone. *Cap Snatching*. Erişim 11.10.2010, http://expasy.org/viralzone/all_by_protein/839.html.
47. Whittaker GR. Intracellular trafficking of influenza virus: clinical implications for molecular medicine. *Expert Rev Mol Med* 2001; **2001**: 1-13.
48. Barman S, Ali A, Hui EK, Adhikary L, Nayak DP. Transport of viral proteins to the apical membranes and interaction of matrix protein with glycoproteins in the assembly of influenza viruses. *Virus Res* 2001; **77**: 61-69.
49. Barman S, Adhikary L, Kawaoka Y, Nayak DP. Influenza A virus hemagglutinin containing basolateral localization signal does not alter the apical budding of a recombinant influenza A virus in polarized MDCK cells. *Virology* 2003; **305**: 138-152.
50. Hirst GK. The Agglutination of Red Cells by Allantoic Fluid of Chick Embryos Infected with Influenza Virus. *Science* 1941; **94**: 22-23.
51. Porter AG, Barber C, Carey NH, Hallewell RA, Threlfall G, Emtage JS. Complete nucleotide sequence of an influenza virus haemagglutinin gene from cloned DNA. *Nature* 1979; **282**: 471-477.
52. Gamblin SJ, Skehel JJ. Influenza hemagglutinin and neuraminidase membrane glycoproteins. *J Biol Chem* 2010; **285**: 28403-28409.
53. Wilson IA, Skehel JJ, Wiley DC. Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution. *Nature* 1981; **289**: 366-373.
54. Colman PM. Influenza virus neuraminidase: structure, antibodies, and inhibitors. *Protein Sci* 1994; **3**: 1687-1696.
55. Connor RJ, Kawaoka Y, Webster RG, Paulson JC. Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates. *Virology* 1994; **205**: 17-23.
56. Kobasa D, Takada A, Shinya K, Hatta M, Halfmann P, Theriault S, et al. Enhanced virulence of influenza A viruses with the haemagglutinin of the 1918 pandemic virus. *Nature* 2004; **431**: 703-707.
57. Gambaryan AS, Marinina VP, Tuzikov AB, Bovin NV, Rudneva IA, Sinitsyn BV, et al. Effects of host-dependent glycosylation of hemagglutinin on receptor-binding properties on H1N1 human influenza A virus grown in MDCK cells and in embryonated eggs. *Virology* 1998; **247**: 170-177.

58. Ohuchi M, Ohuchi R, Feldmann A, Klenk HD. Regulation of receptor binding affinity of influenza virus hemagglutinin by its carbohydrate moiety. *J Virol* 1997; **71**: 8377-8384.
59. Webster RG, Laver WG. Determination of the number of nonoverlapping antigenic areas on Hong Kong (H3N2) influenza virus hemagglutinin with monoclonal antibodies and the selection of variants with potential epidemiological significance. *Virology* 1980; **104**: 139-148.
60. Gerhard W, Yewdell J, Frankel ME, Webster R. Antigenic structure of influenza virus haemagglutinin defined by hybridoma antibodies. *Nature* 1981; **290**: 713-717.
61. Sun X, Tse LV, Ferguson AD, Whittaker GR. Modifications to the hemagglutinin cleavage site control the virulence of a neurotropic H1N1 influenza virus. *J Virol*; **84**: 8683-8690.
62. Steinhauer DA. Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. *Virology* 1999; **258**: 1-20.
63. Zambon MC. Epidemiology and pathogenesis of influenza. *J Antimicrob Chemother* 1999; **44** Suppl B: 3-9.
64. Zhirnov OP, Ikizler MR, Wright PF. Cleavage of influenza a virus hemagglutinin in human respiratory epithelium is cell associated and sensitive to exogenous antiproteases. *J Virol* 2002; **76**: 8682-8689.
65. Chen J, Lee KH, Steinhauer DA, Stevens DJ, Skehel JJ, Wiley DC. Structure of the hemagglutinin precursor cleavage site, a determinant of influenza pathogenicity and the origin of the labile conformation. *Cell* 1998; **95**: 409-417.
66. Klenk HD, Garten W, Rott R. Inhibition of proteolytic cleavage of the hemagglutinin of influenza virus by the calcium-specific ionophore A23187. *EMBO J* 1984; **3**: 2911-2915.
67. Lin T, Wang G, Li A, Zhang Q, Wu C, Zhang R, et al. The hemagglutinin structure of an avian H1N1 influenza A virus. *Virology* 2009; **392**: 73-81.
68. Das SR, Puigbo P, Hensley SE, Hurt DE, Bennink JR, Yewdell JW. Glycosylation focuses sequence variation in the influenza A virus H1 hemagglutinin globular domain. *PLoS Pathog* 2010; **6**(11): e1001211.

69. Wagner R, Herwig A, Azzouz N, Klenk HD. Acylation-mediated membrane anchoring of avian influenza virus hemagglutinin is essential for fusion pore formation and virus infectivity. *J Virol* 2005; **79**: 6449-6458.
70. Varghese JN, Laver WG, Colman PM. Structure of the influenza virus glycoprotein antigen neuraminidase at 2.9 Å resolution. *Nature* 1983; **303**: 35-40.
71. Colman PM, Hoyne PA, Lawrence MC. Sequence and structure alignment of paramyxovirus hemagglutinin-neuraminidase with influenza virus neuraminidase. *J Virol* 1993; **67**: 2972-2980.
72. Russell RJ, Haire LF, Stevens DJ, Collins PJ, Lin YP, Blackburn GM, et al. The structure of H5N1 avian influenza neuraminidase suggests new opportunities for drug design. *Nature* 2006; **443**: 45-49.
73. Colman PM, Varghese JN, Laver WG. Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase. *Nature* 1983; **303**: 41-44.
74. Liu C, Eichelberger MC, Compans RW, Air GM. Influenza type A virus neuraminidase does not play a role in viral entry, replication, assembly, or budding. *J Virol* 1995; **69**: 1099-1106.
75. Kobasa D, Wells K, Kawaoka Y. Amino acids responsible for the absolute sialidase activity of the influenza A virus neuraminidase: relationship to growth in the duck intestine. *J Virol* 2001; **75**: 11773-11780.
76. Hay AJ, Functional Properties of the Virus Ion Channels. İçinde Nicholson KG, Webster RG, Hay AJ, editörler. *Textbook of Influenza*. Oxford: Blackwell Science; 1998. pp. 75-81
77. Hay AJ, Wolstenholme AJ, Skehel JJ, Smith MH. The molecular basis of the specific anti-influenza action of amantadine. *EMBO J* 1985; **4**: 3021-4.
78. Zhang M, Zharikova D, Mozdzanowska K, Otvos L, Gerhard W. Fine specificity and sequence of antibodies directed against the ectodomain of matrix protein 2 of influenza A virus. *Mol Immunol* 2006; **43**: 2195-2206.
79. Barr JN, Fearn R. How RNA viruses maintain their genome integrity. *J Gen Virol* 2010; **91**: 1373-1387

80. Braam J, Ulmanen I, Krug RM. Molecular model of a eucaryotic transcription complex: functions and movements of influenza P proteins during capped RNA-primed transcription. *Cell* 1983; **34**: 609-618.
81. Subbarao EK, London W, Murphy BR. A single amino acid in the PB2 gene of influenza A virus is a determinant of host range. *J Virol* 1993; **67**: 1761-1764.
82. Kuzuhara T, Kise D, Yoshida H, Horita T, Murazaki Y, Nishimura A, et al. Structural basis of the influenza A virus RNA polymerase PB2 RNA-binding domain containing the pathogenicity-determinant lysine 627 residue. *J Biol Chem* 2009; **284**: 6855-6860.
83. Geiss GK, Salvatore M, Tumpey TM, Carter VS, Wang X, Basler CF, et al. Cellular transcriptional profiling in influenza A virus-infected lung epithelial cells: the role of the nonstructural NS1 protein in the evasion of the host innate defense and its potential contribution to pandemic influenza. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; **99**: 10736-10741.
84. Bruno L. An Infection That will Never be Out of Date: Influenza. *ESCMID Post Graduate Education Course* 2010: September 2-4, Istanbul, Turkey.
85. Nobusawa E, Sato K. Comparison of the mutation rates of human influenza A and B viruses. *J Virol* 2006; **80**: 3675-3678.
86. Drake JW. Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; **90**: 4171-4175.
87. Garten RJ, Davis CT, Russell CA, Shu B, Lindstrom S, Balish A, et al. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science* 2009; **325**: 197-201.
88. Furuse Y, Suzuki A, Kishi M, Nukiwa N, Shimizu M, Sawayama R, et al. Occurrence of mixed populations of influenza A viruses that can be maintained through transmission in a single host and potential for reassortment. *J Clin Microbiol* 2010; **48**: 369-74.
89. Carrat F, Flahault A. Influenza vaccine: the challenge of antigenic drift. *Vaccine* 2007; **25**: 6852-6862.
90. Wiley DC, Skehel JJ. The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus. *Ann Rev Biochem* 1987; **56**: 365-94.

91. Paniker CK. Serological relationships between the neuraminidases in influenza viruses. *J Gen Virol* 1968; **2**: 385-394.
92. Air GM, Laver WG. The neuraminidase of influenza virus. *Proteins* 1989; **6**: 341-356.
93. Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev* 1992; **56**: 152-179.
94. Reid AH, Fanning TG, Janczewski TA, Taubenberger JK. Characterization of the 1918 "Spanish" influenza virus neuraminidase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; **97**: 6785-90.
95. Osterhaus AD, Rimmelzwaan GF, Martina BE, Bestebroer TM, Fouchier RA. Influenza B virus in seals. *Science* 2000; **288**: 1051-1053.
96. Hay AJ, Gregory V, Douglas AR, Lin YP. The evolution of human influenza viruses. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2001; **356**: 1861-1870.
97. Matsuzaki Y, Katsushima N, Nagai Y, Shoji M, Itagaki T, Sakamoto M, et al. Clinical features of influenza C virus infection in children. *J Infect Dis* 2006; **193**: 1229-1235.
98. Wilschut JC, McElhaney JE, Palache MA. Influenza Epidemics and Pandemics. İçinde Wilschut JC, McElhaney JE, Palache MA, editörler. *Influenza*. PA, USA: Mosby-Elsevier; 2006. pp. 49-73
99. Russell CA, Jones TC, Barr IG, Cox NJ, Garten RJ, Gregory V, et al. Influenza vaccine strain selection and recent studies on the global migration of seasonal influenza viruses. *Vaccine* 2008; 26 Suppl 4: D31-4.
100. Önal A, Aslan S, Bozkaya E, Badur S. Türkiye’de 2003-2004 ve 2004-2005 Yıllarında Grip Sürveyansı ve İzole Edilen İnfluenzavirus Suşlarının Tiplendirimi. *Klimik Dergisi* 2006; **19**: 3-9.
101. Ciblak MA, Aslan S, Bozkaya E, Badur S. Ülkemizde 2005-2006, 2006-2007 ve 2007-2008 Yıllarında Grip Sürveyansı ve İzole Edilen İnfluenza Virusu Suşlarının Tiplendirimi. *Klimik Dergisi* 2008; **21**: 87-92.
102. Thompson WW, Shay DK, Weintraub E, Brammer L, Bridges CB, Cox NJ, et al. Influenza-associated hospitalizations in the United States. *JAMA* 2004; **292**: 1333-1340.

103. Thompson WW, Shay DK, Weintraub E, Brammer L, Cox N, Anderson LJ, et al. Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States. *JAMA* 2003; **289**: 179-186.
104. Paget J, Marquet R, Meijer A, van der Velden K. Influenza activity in Europe during eight seasons (1999-2007): an evaluation of the indicators used to measure activity and an assessment of the timing, length and course of peak activity (spread) across Europe. *BMC Infect Dis* 2007; **7**: 141.
105. Nicholson KG. Human Influenza. İçinde Nicholson KG, Webster RG, Hay AJ, editörler. *Textbook of Influenza*. Oxford: Blackwell Science; 1998. pp. 3-18
106. Dwyer DE, Smith DW, Catton MG, Barr IG. Laboratory diagnosis of human seasonal and pandemic influenza virus infection. *Med J Aust* 2006; **185**(10 Suppl): S48-53.
107. Tkacova M, Vareckova E, Baker IC, Love JM, Ziegler T. Evaluation of monoclonal antibodies for subtyping of currently circulating human type A influenza viruses. *J Clin Microbiol* 1997; **35**: 1196-1198.
108. Schweiger B, Zadow I, Heckler R, Timm H, Pauli G. Application of a fluorogenic PCR assay for typing and subtyping of influenza viruses in respiratory samples. *J Clin Microbiol* 2000; **38**: 1552-8.
109. Wright KE, Wilson GA, Novosad D, Dimock C, Tan D, Weber JM. Typing and subtyping of influenza viruses in clinical samples by PCR. *J Clin Microbiol* 1995; **33**: 1180-1184.
110. WHO. Global Alert and Response. CDC Protocol of Real-time RT-PCR for Influenza A (H1N1). 2009, Ekim. Erişim 01.12.2010, <http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/realtimeptpcr/en/index.html>
111. Playford EG, Dwyer DE. Laboratory diagnosis of influenza virus infection. *Pathology* 2002; **34**: 115-25.
112. Ciblak MA, Kanturvardar M, Asar S, Bozkaya E, Yenen OS, Badur S. Sensitivity of rapid influenza antigen tests in the diagnosis of pandemic (H1N1)2009 compared with the standard rRT-PCR technique during the 2009 pandemic in Turkey. *Scand J Infect Dis* 2010; **42**: 902-5.

113. Sintchenko V, Gilbert GL, Coiera E, Dwyer D. Treat or test first? Decision analysis of empirical antiviral treatment of influenza virus infection versus treatment based on rapid test results. *J Clin Virol* 2002; **25**: 15-21.
114. WHO. *WHO information for laboratory diagnosis of pandemic (H1N1) 2009 virus in humans-revised*. 2009 Kasım. Erişim 10.03.2010, http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/WHO_Diagnostic_RecommendationsH1N1_20090521.pdf.
115. Gerdil C. The annual production cycle for influenza vaccine. *Vaccine* 2003; **21**: 1776-1779.
116. Minor PD. Vaccines against seasonal and pandemic influenza and the implications of changes in substrates for virus production. *Clin Infect Dis* 2010; **50**: 560-5.
117. Fiore AE, Bridges CB, Cox NJ. Seasonal Influenza Vaccines. İçinde Richard WC, Walter AO, editörler. *Vaccines for Pandemic Influenza*. Heidelberg: Springer Verlag; 2009. pp. 43-82
118. Maassab HF. Adaptation and growth characteristics of influenza virus at 25 degrees c. *Nature* 1967; **213**: 612-614.
119. Maassab HF. Biologic and immunologic characteristics of cold-adapted influenza virus. *J Immunol* 1969; **102**: 728-32.
120. Maassab HF, Kendal AP, Abrams GD, Monto AS. Evaluation of a cold-recombinant influenza virus vaccine in ferrets. *J Infect Dis* 1982; **146**: 780-90.
121. Belshe RB, Gruber WC, Mendelman PM, Cho I, Reisinger K, Block SL, et al. Efficacy of vaccination with live attenuated, cold-adapted, trivalent, intranasal influenza virus vaccine against a variant (A/Sydney) not contained in the vaccine. *J Pediatr* 2000; **136**: 168-175.
122. Tosh PK, Poland GA. Emerging vaccines for influenza. *Expert Opin Emerg Drugs* 2008; **13**: 21-40.
123. Suguitan AL, Jr., McAuliffe J, Mills KL, Jin H, Duke G, Lu B, et al. Live, attenuated influenza A H5N1 candidate vaccines provide broad cross-protection in mice and ferrets. *PLoS Med* 2006; **3**(9): e360.

124. WHO. *Use of Cell Lines for the Production of Influenza Virus Vaccines*. An Appraisal of Technical, Manufacturing and Regulatory Considerations, 2007. Erişim 09.09.2010, http://www.who.int/vaccine_research/diseases/influenza/WHO_Flu_Cell_Substrate_Version_3.pdf.
125. WHO. *WHO guidance on development of influenza vaccine viruses by reverse genetics*. 2005, Erişim, 10.06.2010, http://whqlibdoc.who.int/hq/2005/WHO_CDS_CSR_GIP_2005.6.pdf.
126. Aoki FY. Amantadine and Rimantadine. İçinde Nicholson KG, Webster RG, Hay AJ, editörler. *Text Book of Influenza*. Oxford: Blackwell Science; 1998. pp. 457-476
127. Jackson GG, Muldoon RL, Akers LW. Serological Evidence for Prevention of Influenzal Infection in Volunteers by an Anti-Influenzal Drug Adamantanamine Hydrochloride. *Antimicrob Agents Chemother (Bethesda)* 1963; **161**: 703-707.
128. Davies WL, Grunert RR, Haff RF, McGahen JW, Neumayer EM, Paulshock M, et al. Antiviral Activity of 1-Adamantanamine (Amantadine). *Science* 1964; 144: 862-863.
129. Maugh TH, 2nd. Panel urges wide use of antiviral drug. *Science* 1979; **206**: 1058-1060.
130. Cochran KW, Masaab HF, Tsunoda A, Berlin BS. Studies on the antiviral activity of amantadine hydrochloride. *Ann NY Acad Sci* 1965; **130**: 432-439.
131. Grunert RR, McGahen JW, Davies WL. The in Vivo Antiviral Activity of 1-Adamantanamine (Amantadine). I. Prophylactic and Therapeutic Activity against Influenza Viruses. *Virology* 1965; **26**: 262-269.
132. Oxford JS, Logan IS, Potter CW. In vivo selection of an influenza A2 strain resistant to amantadine. *Nature* 1970; **226**: 82-83.
133. Heider H, Adamczyk B, Presber HW, Schroeder C, Feldblum R, Indulen MK. Occurrence of amantadine- and rimantadine-resistant influenza A virus strains during the 1980 epidemic. *Acta Virol* 1981; **25**: 395-400.
134. Hay AJ, Zambon MC, Wolstenholme AJ, Skehel JJ, Smith MH. Molecular basis of resistance of influenza A viruses to amantadine. *J Antimicrob Chemother* 1986; **18** Suppl B: 19-29.

135. Belshe RB, Burk B, Newman F, Cerruti RL, Sim IS. Resistance of influenza A virus to amantadine and rimantadine: results of one decade of surveillance. *J Infect Dis* 1989; **159**: 430-5.
136. Laplante JM, Marshall SA, Shudt M, Van TT, Reisdorf ES, Mingle LA, et al. Influenza antiviral resistance testing in new york and wisconsin, 2006 to 2008: methodology and surveillance data. *J Clin Microbiol* 2009; **47**: 1372-8.
137. Varghese JN. Development of Neuraminidase Inhibitors as Anti-Influenza Virus Drugs. *Drug Development Research* 1999; **46**: 176-96.
138. Elliott M. Zanamivir: from drug design to the clinic. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2001; **356**: 1885-1893.
139. Mendel DB, Tai CY, Escarpe PA, Li W, Sidwell RW, Huffman JH, et al. Oral administration of a prodrug of the influenza virus neuraminidase inhibitor GS 4071 protects mice and ferrets against influenza infection. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; **42**: 640-646.
140. Moscona A. Oseltamivir resistance--disabling our influenza defenses. *N Engl J Med* 2005; **353**: 2633-2636.
141. Woods JM, Bethell RC, Coates JA, Healy N, Hiscox SA, Pearson BA, et al. 4-Guanidino-2,4-dideoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminic acid is a highly effective inhibitor both of the sialidase (neuraminidase) and of growth of a wide range of influenza A and B viruses in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; **37**: 1473-1779.
142. Kim CU, Lew W, Williams MA, Liu H, Zhang L, Swaminathan S, et al. Influenza neuraminidase inhibitors possessing a novel hydrophobic interaction in the enzyme active site: design, synthesis, and structural analysis of carbocyclic sialic acid analogues with potent anti-influenza activity. *J Am Chem Soc* 1997; **119**: 681-690.
143. Das K, Aramini JM, Ma LC, Krug RM, Arnold E. Structures of influenza A proteins and insights into antiviral drug targets. *Nat Struct Mol Biol* 2010; **17**: 530-538.
144. Moscona A. Neuraminidase inhibitors for influenza. *N Engl J Med* 2005; **353**: 1363-1373.
145. Mendel DB, Sidwell RW. Influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors. *Drug Resist Updat* 1998; **1**: 184-189.

146. Oakley AJ, Barrett S, Peat TS, Newman J, Streltsov VA, Waddington L, et al. Structural and functional basis of resistance to neuraminidase inhibitors of influenza B viruses. *J Med Chem* 2010; **53**: 6421-6431.
147. Roberts NA. Treatment of influenza with neuraminidase inhibitors: virological implications. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2001; **356**: 1895-1897.
148. Gubareva LV, Matrosovich MN, Brenner MK, Bethell RC, Webster RG. Evidence for zanamivir resistance in an immunocompromised child infected with influenza B virus. *J Infect Dis* 1998; **178**: 1257-1262.
149. Herlocher ML, Carr J, Ives J, Elias S, Truscon R, Roberts N, et al. Influenza virus carrying an R292K mutation in the neuraminidase gene is not transmitted in ferrets. *Antiviral Res* 2002; **54**: 99-111.
150. Gubareva LV. Molecular mechanisms of influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors. *Virus Res* 2004; **103**: 199-203.
151. Hurt AC, Holien JK, Parker M, Kelso A, Barr IG. Zanamivir-resistant influenza viruses with a novel neuraminidase mutation. *J Virol* 2009; **83**: 10366-10373.
152. Tai CY, Escarpe PA, Sidwell RW, Williams MA, Lew W, Wu H, et al. Characterization of human influenza virus variants selected in vitro in the presence of the neuraminidase inhibitor GS 4071. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; **42**: 3234-3241.
153. Belshe RB, Smith MH, Hall CB, Betts R, Hay AJ. Genetic basis of resistance to rimantadine emerging during treatment of influenza virus infection. *J Virol* 1988; **62**: 1508-1512.
154. Appleyard G. Amantadine-resistance as a genetic marker for influenza viruses. *J Gen Virol* 1977; **36**: 249-255.
155. Gubareva LV, Webster RG, Hayden FG. Detection of influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors by an enzyme inhibition assay. *Antiviral Res* 2002; **53**: 47-61.
156. Buxton RC, Edwards B, Juo RR, Voyta JC, Tisdale M, Bethell RC. Development of a sensitive chemiluminescent neuraminidase assay for the determination of influenza virus susceptibility to zanamivir. *Anal Biochem* 2000; **280**: 291-300.

157. Ziegler T, Hemphill ML, Ziegler ML, Perez-Oronoz G, Klimov AI, Hampson AW, et al. Low incidence of rimantadine resistance in field isolates of influenza A viruses. *J Infect Dis* 1999; **180**: 935-939.
158. TC Sağlık Bakanlığı, Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü. Pandemik İnfluenza Ulusal Faaliyet Planı. Ankara, Nisan 2006; Sayfa: 92-97
159. CDC. *High Levels of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses and interim guidelines for use of antiviral agents-United States, 2005-2006 Influenza Season*, 2006 Erişim 10.11.2010, <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5502a7.htm>.
160. Moscona A. Medical management of influenza infection. *Annu Rev Med* 2008; **59**: 397-413.
161. Lackenby A, Hungnes O, Dudman SG, Meijer A, Paget WJ, Hay AJ, Zambon MC. Emergence of resistance to oseltamivir among influenza A(H1N1) viruses in Europe. *Euro Surveill*. 2008; **13**(5). pii: 8026
162. Sheu TG, Deyde VM, Okomo-Adhiambo M, Garten RJ, Xu X, Bright RA, et al. Surveillance for neuraminidase inhibitor resistance among human influenza A and B viruses circulating worldwide from 2004 to 2008. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**: 3284-3292.
163. Melidou A, Kyriazopoulou V, Diza E, Alexiou S, Pierroutsakos Y. Antiviral resistance of influenza A (H3N2) strains isolated in northern Greece between 2004 and 2007. *Euro Surveill*. 2009; **14**(4). pii: 19104
164. Masuda H, Suzuki H, Oshitani H, Saito R, Kawasaki S, Nishikawa M, et al. Incidence of amantadine-resistant influenza A viruses in sentinel surveillance sites and nursing homes in Niigata, Japan. *Microbiol Immunol* 2000; **44**: 833-839.
165. Valette M, Allard JP, Aymard M, Millet V. Susceptibilities to rimantadine of influenza A/H1N1 and A/H3N2 viruses isolated during the epidemics of 1988 to 1989 and 1989 to 1990. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; **37**: 2239-2240.
166. Deyde VM, Xu X, Bright RA, Shaw M, Smith CB, Zhang Y, et al. Surveillance of resistance to adamantanes among influenza A(H3N2) and A(H1N1) viruses isolated worldwide. *J Infect Dis* 2007; **196**: 249-257.

167. Barr IG, Deng YM, Iannello P, Hurt AC, Komadina N. Adamantane resistance in influenza A(H1) viruses increased in 2007 in South East Asia but decreased in Australia and some other countries. *Antiviral Res* 2008; **80**: 200-205.
168. Pabbaraju K, Ho KC, Wong S, Shokoples S, Pang XL, Fonseca K, et al. Adamantane resistance in circulating human influenza A viruses from Alberta, Canada (1970-2007). *Antiviral Res* 2008; **79**: 81-86.
169. Ciblak MA, Hasoksuz M, Escuret V, Valette M, Gul F, Yilmaz H, et al. Surveillance and oseltamivir resistance of human influenza a virus in Turkey during the 2007-2008 season. *J Med Virol* 2009; **81**: 1645-1651.
170. WHO. *Global Alert and Response, Preliminary Summary Reports from Countries, Areas or Territories*. Erişim 12.08.2010, http://www.who.int/csr/disease/influenza/summary_country/en/index.html.
171. WHO. *Influenza A/H1N1 virus resistance to oseltamivir-2008 season, southern hemisphere, 2008*. Erişim 26.11.2010, <http://www.who.int/csr/disease/influenza/H1N1200801013.pdf>.
172. WHO. *Seasonal influenza A(H1N1) viruses resistant to oseltamivir-last quarter 2008 to 31 March 2009*. Erişim 10.04.2010, <http://www.who.int/csr/disease/influenza/2008-9NHemiResistanceTable2.pdf>.
173. Garcia J, Sovero M, Torres AL, Gomez J, Douce R, Barrantes M, et al. Antiviral resistance in influenza viruses circulating in Central and South America based on the detection of established genetic markers. *Influenza Other Respi Viruses* 2009; **3**: 69-74.
174. Weinstock DM, Zuccotti G. Adamantane resistance in influenza A. *JAMA* 2006; **295**: 934-6.
175. Herlocher ML, Truscon R, Elias S, Yen HL, Roberts NA, Ohmit SE, et al. Influenza viruses resistant to the antiviral drug oseltamivir: transmission studies in ferrets. *J Infect Dis* 2004; **190**: 1627-30.
176. Ives JA, Carr JA, Mendel DB, Tai CY, Lambkin R, Kelly L, et al. The H274Y mutation in the influenza A/H1N1 neuraminidase active site following oseltamivir phosphate treatment leave virus severely compromised both in vitro and in vivo. *Antiviral Res* 2002; **55**: 307-17.

177. Rameix-Welti MA, Enouf V, Cuvelier F, Jeannin P, van der Werf S. Enzymatic properties of the neuraminidase of seasonal H1N1 influenza viruses provide insights for the emergence of natural resistance to oseltamivir. *PLoS Pathog* 2008; **4**(7): e1000103.
178. Kramarz P, Monnet D, Nicoll A, Yilmaz C, Ciancio B. Use of oseltamivir in 12 European countries between 2002 and 2007--lack of association with the appearance of oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) viruses. *Euro Surveill*. 2009; **14**(5). pii: 19112
179. Ciancio BC, Meerhoff TJ, Kramarz P, Bonmarin I, Borgen K, Boucher CA, et al. Oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) viruses detected in Europe during season 2007-8 had epidemiologic and clinical characteristics similar to co-circulating susceptible A(H1N1) viruses. *Euro Surveill* 2009; **14**(46).
179. Ciancio BC, Meerhoff TJ, Kramarz P, Bonmarin I, Borgen K, Boucher CA, et al. Oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) viruses detected in Europe during season 2007-8 had epidemiologic and clinical characteristics similar to co-circulating susceptible A(H1N1) viruses. *Euro Surveill*. 2009; **14**(46). pii: 19412
180. El Bakkouri K, Descamps F, De Filette M, Smet A, Festjens E, Birkett A, et al. Universal Vaccine Based on Ectodomain of Matrix Protein 2 of Influenza A: Fc Receptors and Alveolar Macrophages Mediate Protection. *J Immunol* 2010: DOI jimmunol.0902147 [pii] 10.4049/jimmunol.47.
181. Boltz DA, Aldridge JR, Jr., Webster RG, Govorkova EA. Drugs in development for influenza. *Drugs* 2010; **70**: 1349-1362.

ETİK KURUL KARARI

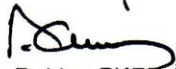
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ YEREL ETİK KURUL TUTANAĞI

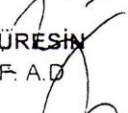
Toplantı Tarihi : 21/01/2009

Toplantı Yeri : Behçet Kütüphanesi Etik Kurul Toplantı Salonu

Toplantı Sayısı : 1

Sorumlu araştırmacılığını Fakültemiz Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr. Selim BADUR'un üstlendiği ve Doktora Öğrencisi Araştırma Gör. Meral A. ÇIPLAK'ın yürüteceği 2008/3009 protokol numaralı "Türkiye'de influenza A (H1N1, H3N2) virüs izolatlarında antiviral direnç mutasyonlarının araştırılması" başlıklı deneysel doktora tez çalışması kurulumuzda incelendi etik yönden bir sakınca taşımadığı görüldü, uygulamaya konulabileceğine karar verildi.


Prof.Dr. Rukiye EKER ÖMEROĞLU
Etik Kurul Başkan Vekili (Dekan Yardımcısı)


Prof.Dr. A.Yağız ÜRESİN
Farmakoloji ve Kli.F. A.D.


Prof.Dr. Ahmet GÜL
İç Hast. A.D. Romatoloji Bilim Dalı


Prof.Dr. Berrin UMMAN
Kardiyoloji A.D.

— **Prof.Dr. Kamil PEMBEÇİ (T. Katılmadı)**
Anesteziyoloji A.D.


Prof.Dr. Sevinç EMRE
Çocuk Sağ. Ve Hast. A.D.

— **Prof.Dr. Nuran YILDIRIM**
Deontoloji ve Tıp Tarihi A.D.


Prof.Dr. Oğuzhan ÇOBAN
Nöroloji A.D.


Prof.Dr. Ümit TÜRKOĞLU
Biokimya A.D.


Prof.Dr. Pınar SAİP
İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü

— **Prof.Dr. İlgin ÖZDEN (T. Katılmadı)**
Genel Cerrahi A.D.

— **Prof.Dr. Neşe ÇOLAK (T. Katılmadı)**
İç Hast.A.D. End. Ve Metabolizma Hast. B.D.


Prof.Dr. Nurhan ENGİNAR
Farmakoloji ve Kli.F. A.D.

— **Fatma Ceyda DÖNMEZER**
Sivil Toplum Örgütü Üyesi

— **Av. Dilek TEMİZ ÖZBEK**
Hukukçu

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Meral	Soyadı	Akçay Çıplak (Ciblak)
Doğ.Yeri	Anzevik	Doğ.Tar.	01.03.1967
Uyruğu	T.C	TC Kim No	24079900078
Email	ciblakm@yahoo.com	Tel	05379567545

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi	
Yük.Lis.	Georgia State University, Faculty of Sciences, USA	1998
Lisans	Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi	1991
Lise	Kırşehir	1985

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Öğretim Görevlisi	Yeditepe Üniversitesi	(2004-2006)
2.	Emory University, School of Medicine, USA	Araştırma Uzmanı	(2002-2004)
3.	Centers for Disease Control, USA	Araştırma Uzmanı	(1998-2002)

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi	98	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı		62	
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	Çok iyi
Fotoshop	İyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri:

1- Eğitimde Mükemmeliyet Ödülü

Department of Biology, Georgia State University, Atlanta, GA. 1997.

Uluslararası Yayınlar

1. **Ciblak MA**, Kanturvardar M, Asar S, Bozkaya E, Yenen OS, Badur S. Sensitivity of rapid influenza antigen tests in the diagnosis of pandemic (H1N1)2009 compared with the standard rRT-PCR technique during the 2009 pandemic in Turkey. *Scand J Infect Dis.* 2010 Dec;42(11-12):902-5
2. Torun SH, Somer A, Salman N, **Ciblak M**, Demirkol D, Kanturvardar M, Badur S, Devecioglu O. Clinical and Epidemiological Characteristics of Pandemic Influenza A/(H1N1) in Hospitalized Pediatric Patients at a University Hospital, Istanbul, Turkey. *J Trop Pediatr.* 2010 Sep 5. [Epub ahead of print]
3. **Ciblak MA**, Albayrak N, Odabas Y, Basak Altas A, Kanturvardar M, Hasoksuz M, Sucakli B, Korukluoglu G, Bal E, Ertek M, Badur S. Cases of Influenza A(H1N1)v reported in Turkey, May-July 2009. *Euro Surveill* 2009 Aug 13; 14 (32). Pii:19304.
4. **Ciblak MA**, Hasoksuz M, Escuret V, Valette M, Gul F, Yilmaz H, Turan N, Bozkaya E, Badur S. Surveillance and Oseltamivir Resistance of Human Influenza A Virus in Turkey during the 2007-2008 Season. *J. Med. Virol.* 2009 Sep; 81(9): 1645-51
5. Altiok E, Taylan F, Yenen OS, DEmirkeser G, Bozaci M, Onel D, Akcadag B, Iyisan AS, **Ciblak M**, Mozkaya E, Yuksel S, Badur S. Mutations in influenza A virus (H5N1) and possible limited spread, Turkey, 2006. *Emerg Infect Dis.* 2008 14(3): 491-2
6. Park BJ, Arthington-Skaggs BA, Hajjeh RA, Iqbal N, **Ciblak MA**, Lee-Yang W, Hairston MD, Phelan M, Plikaytis BD, Sofair AN, Harrison LH, Fridkin SK, Warnock DW. Evaluation of amphotericin B interpretive breakpoints for *Candida* bloodstream isolates by correlation with therapeutic outcome. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006 Apr;50(4):1287-92.
7. Hajjeh RA, Sofair AN, Harrison LH, Lyon GM, Arthington-Skaggs BA, Mirza SA, Phelan M, Morgan J, Lee-Yang W, **Ciblak MA**, Benjamin LE, Sanza LT, Huie S, Yeo SF, Brandt ME, Warnock DW. Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and in vitro susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. *J Clin Microbiol.* 2004 Apr;42(4):1519-27.
8. Cuenca-Estrella, M., Lee-Yang, W., **Ciblak, M.A.**, Arthington-Skaggs, B.A., Mellado, E., Warnock, D.W., Rodriguez-Tudela, J.L. 2002. Comparative Evaluation of NCCLS M27-A and EUCAST Broth Microdilution Procedures for Antifungal Susceptibility Testing of *Candida* Species. *J. Antimicrob. Chemother.* 46:3644-3647

9. Arthington-Skaggs, B.A., Lee, W., **Ciblak, M. A.**, Frade, J.P., Brandt, M.E., Hajjeh, R.A., Harrison, L.H., Sofair, A., Warnock, D.W. 2002. Comparison of Visual and Spectrophotometric Methods of Broth Microdilution MIC End Point Determination and Evaluation of a Sterol Quantitation Method for In Vitro Susceptibility Testing of Fluconazole and Itraconazole Against Trailing and Nontrailing Candida Isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 46:2477-2481
10. **Ciblak, M. A.**, Lee, W., Arthington-Skaggs, B.A., Sofair, A., Harrison, L.H., Hajjeh, R.A., Warnock, D.W. 2000. Antifungal Drug Susceptibility of Candida spp. Bloodstream Isolates: A U.S. Population-Based Study. American Society for Microbiology, 40th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy.
11. Lyon, G.M., Ponce-de-Leon, G., Sofair, A., Brandt, M.E., **Ciblak, M.A.**, Arthington-Skaggs, B.A., Thomson, L., Huie, S., Yeo, L., Pass, P., Harrison, L., Warnock, D.W., Hajjeh, R.A. 2000. Population-based Surveillance for Candida Bloodstream Infections: Incidence of Disease and Azole Resistance. American Society for Microbiology, 40th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy.
12. Li, R. K., **Ciblak, M. A.**, Nordoff, N., Pasarell, L., Warnock, D. W., and McGinnis, M. R. 2000. In Vitro Activities of Voriconazole, Itraconazole, and Amphotericin B Against Blastomyces dermatitidis, Coccidioides immitis, and Histoplasma capsulatum. *J. Antimicrob. Chemother.* 44:1734-1736.
13. Li, R. K., Elie, C. M., Clayton, G. E., and **Ciblak, M. A.** 2000. Comparison of a New Colorimetric Assay with the NCCLS Broth Microdilution Method (M-27A) for Antifungal Drug MIC Determination. *J. Clin. Microbiol.* 38:2334-2338.
14. R. K. Li, **M. A. Ciblak**, C. J. Morrison. 1999. Development of a Fluconazole susceptibility Index (DSI) Using the Interaction of Host Cells and Candida albicans Isolates. American Society for Microbiology, Conference on Candida and Candidiasis.

Ulusal Yayınlar

1. Melis Kanturvardar, **Meral Akcay-Ciblak**, Serkan Asar, Emel Bozkaya, O. Şadi Yenen, Selim BadurPandemik A/H1N1 İnfeksiyonlarının Tanısında Hızlı Test “Sorunu”Klimik Dergisi 2009; 22(3): 79-81
2. Selda Hançerli, Ayper Somer, Nuran Salman, Hüssam Elshana, Demet Demirkol, Melis Kanturvardar, **Meral Ciblak**, Selim Badur, Ömer Devecioğlu. Pandemik Influenza; İstanbul’da Bir ÜniversiteHastanesine Yatan Çocuk Vakaların Klinik veEpidemiyolojik Değerlendirmesi. Çocuk Enf Derg 2010; 4: 104-9

3. **Meral Akçay Ciblak**, Selim Badur. Türkiye’de ve Dünyada Kuş Gribi, Review. Klinik Aktüel Tıp. 2007. 12 (6): 1-13
4. Selim Badur, **Meral Akçay Ciblak**. Adjuvanlar: Önemi ve Kullanım Alanları, Review Klinik Aktüel Tıp. 2007. 12 (8): 65-68
5. **Meral Akçay Ciblak**. İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi İnfluenza Laboratuvarı 2007-2008 Sezonu Grip Sürveyans Bulguları. Aşı ve Yaşam dergisi. 2008. 1: 11-15
6. **Meral Akçay Ciblak**. **Mevsimsel Grip: Aşılar**, Review. Clinic Medicine. 2007. 4:33-38

Bazı Sözlü Sunumlar

- 1- Meral Akçay Ciblak, Invited Speaker,.Pandemic Influenza: Situation Update. The Annual Congress of the Lebanese Pediatric Society, October 2009.
- 2- **Meral Ciblak** and Selim Badur. Overview of HBV Infections and the vaccination policy in Turkey. Viral Hepatitis Prevention Board Meeting: Prevention and control of perinatal hepatitis B virus (HBV) transmission in the WHO European Region. CDC - UNICEF - VHPB – WHO. Istanbul, Turkey, March 15-17, 2006.
- 3- **Meral Akçay Ciblak**, Selim Badur. HAV Epidemiology in Turkey. Global Hepatitis A Meeting. December 2007, Miami, Fl, USA

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Dünya Müziği, Etnik Müzik ve Etnik Kùltürler, Yan Flüt