

**T.C.  
YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI**

***INFLUENZA A 2009 (H1N1) VİRÜSÜNDE  
H275Y MUTASYONUNUN REAL-TİME RT  
PCR YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI***

**(YÜKSEK LİSANS TEZİ)**

**BURCU ÖKSÜZ**

**DANIŞMAN  
PROF. DR. GÜLDEN ÇELİK**

**İSTANBUL-2017**

## TEZ ONAYI FORMU

Kurum : Yeditepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Program : Moleküler Tıp Anabilim Dalı

Tez Başlığı : İNFLUENZA A 2009 H1N1 VIRÜSÜNDE H275Y MUTASYONUNUN  
REAL-TİME RT PCR YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI

Tez Sahibi : Burcu ÖKSÜZ

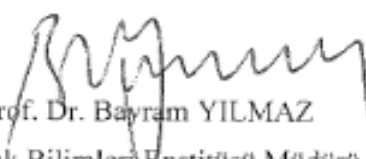
Sınav Tarihi : 4 Mayıs 2017

Bu çalışma jürimiz tarafından kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı, Adı-Soyadı (Kurumu)	İmza
Jüri Başkanı	Prof. Dr. Turgay İsbir Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji A.D /Sağlık Bilimleri Enstitüsü /Moleküler Tıp A.D	
Üye:	Prof. Dr. Gülden Çelik Doğu Akdeniz Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji A.D.	
Üye:	Doç. Dr. Yeşim GÜROL Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji A.D.	

### ONAY

Bu tez Yeditepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun .05/05/2017 tarih ve 2017/08-12.....sayılı kararı ile onaylanmıştır.

  
Prof. Dr. Bayram YILMAZ  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## 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.

BURCU ÖKSÜZ



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

## TEŞEKKÜR

Uzun yıllar boyunca birlikte çalışma fırsatı bulduğum, yüksek lisans eğitimim boyunca her türlü desteğiyle yanımda olan, bilgi ve tecrübelerinden birlikte çalıştığımız yıllar boyunca her alanda faydalandığım, bize her zaman bir aile ortamı yaratan, benim için manevi olarak da çok ayrı bir yeri olan çok değerli hocam Sayın Prof. Dr. Gülден Çelik'e,

Yüksek Lisans eğitimim boyunca her türlü imkanı sağlayan Multidisipliner Moleküler Tıp Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Turgay İsbir'e,

Desteklerini esirgemeyen ve uzun yıllar deneyimlerinden faydalandığım Sayın Doç. Dr. Yeşim Gürol'a,

Her ihtiyacım olduğunda bilgisinden ve tecrübesinden faydalandığım çok değerli arkadaşım Sayın Yrd. Doç. Dr. İskender Karaltı'ya

Birlik olmayı öğrendiğim, ekip ruhunu her zaman hissettiğim, diğer ailem dediğim tüm çalışma arkadaşlarıma, özellikle her zaman yanımda olduğunu bildiğim, yardımlarını ve desteğini esirgemeyen canım arkadaşım Bil. Uzm. Biyo. Yasemin Öztürk'e, manevi desteğini ve tecrübesini esirgemeyen değerli arkadaşım Dr. Zehra Kipritçi'ye, ve yüksek lisans eğitimi yol arkadaşım Biyo. Şahap Aksaçlı'ya,

Tez sürecinin son dönemlerinde bana her türlü kolaylığı sağlayan Medical Park Göztepe Hastanesi, Genetik Tanı Merkezi uzmanları Sayın Yrd. Doç. Dr. Murat Büyükdoğan, Sayın Doç. Dr. Veysel Sabri Hançer ve çalışma arkadaşlarıma,

Tez çalışmalarımda tüm teknik desteği sağlayarak laboratuvarlarının kapısını bana açan Elips Sağlık Ürünleri'ne,

Hayatımın her döneminde, her zaman bana destek olan aramızdaki mesafelere rağmen hep yanımda hissettiğim canım annem, babam ve kardeşime, gösterdikleri her türlü sabır, anlayış ve destek için hayattaki en büyük şanslarım olan çok sevgili eşim Tuncer Öksüz ve canım kızım Zeynep Öksüz'e ve her türlü destekleri için ailemin tüm fertlerine TEŞEKKÜR ederim.

## İÇİNDEKİLER

<u>Tez Onayı</u> .....	II
<u>Beyan</u> .....	III
<u>İthaf</u> .....	IV
<u>Teşekkür</u> .....	V
<u>İçindekiler</u> .....	VI
<u>Tablolar listesi</u> .....	VIII
<u>Şekiller listesi</u> .....	IX
<u>Semboller / Kısaltmalar Listesi</u> .....	X
<u>Özet</u> .....	XII
<u>Abstract</u> .....	XIII
<u>1. GİRİŞ VE AMAÇ</u> .....	1
<u>2. GENEL BİLGİLER</u> .....	3
<u>2.1.Tarihçe</u> .....	3
<u>2.2.Influenza Viruslerinin Sınıflandırılması ve İsimlendirme</u> .....	4
<u>2.3.Influenza Viruslerinin Yapısal Özellikleri</u> .....	5
<u>2.4. Influenza Viruslerinin Genom Yapısı</u> .....	6
<u>2.4.1. Hemoglobinin Proteini (HA)</u> .....	8
<u>2.4.2. Nöraminidaz Proteini (NA)</u> .....	11
<u>2.5. Influenza Viruslerinin Replikasyonu</u> .....	13
<u>2.5.1. Virusün Hücreye Tutunması</u> .....	13
<u>2.5.2. Virusün Hücreye Girişi</u> .....	15
<u>2.5.3. Viral RNA ve Proteinlerin Sentezi</u> .....	15
<u>2.5.4. Viral RNA'nın Paketlenmesi</u> .....	16
<u>2.5.5. Tomurcuklanma ve Hücreden Ayrılma</u> .....	16
<u>2.6. Influenza Viruslerinde Evrim</u> .....	18
<u>2.6.1. Nokta Mutasyonlar</u> .....	18
<u>2.6.2. Harmanlama (Reassortment)</u> .....	18
<u>2.6.3. Rekombinasyon</u> .....	19
<u>2.6.4. Antijenik Drift (Antijenik Sürüklenme)</u> .....	19

2.6.5. Antijenik Shift (Antijenik Kayma).....	20
2.6.6. Pandemik Influenza A 2009 (H1N1) Virusünün Genetik Orjini .....	21
2.7. Influenza Viruslerinin Epidemiyolojisi.....	24
2.7.1. Pandemik Influenza A 2009 (H1N1) Virus Epidemiyolojisi.....	25
2.8. Klinik Belirti ve Bulgular.....	27
2.9. Tanı .....	28
2.9.1. Tanı İçin Örnek Alınması .....	28
2.9.2. Tanı Yöntemleri.....	28
2.9.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	29
2.9.3.1. Real-Time PCR.....	31
2.9.3.2. Tagman Prop.....	32
2.9.3.3. Reverse-Transkriptaz PCR (RT-PCR).....	32
2.10. Tedavi.....	33
2.10.1. Nöraminidaz İnhibitörleri (Zanavimir ve Oseltamivir).....	34
2.10.2. Nöraminidaz İnhibitörlerinde Direnç.....	35
2.10.3. Antiviral Direncin Saptanması.....	37
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	38
3.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Örnekler.....	38
3.2. Kullanılan Reaktif ve Ticari Kitler .....	38
3.3. Kullanılan Ekipmanlar .....	38
3.4. Kullanılan Kimyasallar.....	39
3.5. Kullanılan Yöntemler.....	39
3.5.1. Primer ve Propların Konfirmasyonu.....	39
3.5.2. Primer ve Propların Hazırlanması.....	40
3.5.1. Real Time RT-PCR Aşaması.....	41
4. BULGULAR.....	44
4.1. Birinci PCR Aşaması (Oseltamivir Duyarlı Örneklerin Saptanması).....	44
4.2. İkinci PCR Aşaması (Oseltamivir Dirençli Örneklerin Saptanması).....	45
5. TARTIŞMA.....	46
Kaynaklar.....	52
Özgeçmiş.....	64

## TABLULAR LİSTESİ

<b>Tablo 1.</b> Tarihte Influenza salgınları.....	4
<b>Tablo 2.</b> Influenza A virüslerinin gen segmentleri ve kodladıkları proteinler.....	7
<b>Tablo 3.</b> Real time RT PCR çalışmasında kullanılan primer ve prop dizileri.....	39
<b>Tablo 4.</b> Real time RT PCR miks bileşenleri. ....	42
<b>Tablo 5.</b> Real time RT PCR protokolü.....	43
<b>Tablo 6.</b> Oseltamivir duyarlı <i>Influenza A 2009 (H1N1)</i> suşlarının amplifikasyon ct değerleri.....	44





## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Influenza virüslerin elektron mikroskopisi görüntüsü.....	6
Şekil 2. Influenza virüslerin yapısı.....	6
Şekil 3. Hemaglütinin proteininin alt tiplerinin yapısı.....	9
Şekil 4. H1, H2, H3 moleküllerinin kristal yapısı.....	9
Şekil 5. HA molekülünün primer yapısı.....	10
Şekil 6. Nöraminidaz alt tiplerinin filogenetik gruplandırılması.....	12
Şekil 7. Nöraminidaz molekülünün tetramer yapısı.....	12
Şekil 8. Influenza virüslerin siyalik asit konfirügasyonuna göre konak özgülüğü....	14
Şekil 9. Influenza virüslerin replikasyon döngüsü.....	17
Şekil 10. Influenza A virüsünde antijenik drift ve antijenik shift.....	20
Şekil 11. <i>Influenza A 2009 (H1N1)</i> virüsünün genetik orjini.....	23
Şekil 12. Pandemi zaman çizelgesi.....	26
Şekil 13. Polimeraz zincir reaksiyonunun aşamaları.....	30
Şekil 14. Tagman Prop çalışma prensibi.....	32
Şekil 15. Oseltamivir direnç mekanizması.....	35
Şekil 16. NCBI veri tabanı kullanılarak referans virüsün NA gen bölgesinin bulunması.....	40
Şekil 17. Influenza A virüs ( <i>A/Denmark/528/2009 (H1N1)</i> ) segment 6 (NA) sekans dizisi.....	40
Şekil 18. Oseltamivire duyarlı saptanan <i>Influenza A 2009 (H1N1)</i> suşlarının Real time PCR görüntüsü.....	44

## SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

<b>ABD</b>	Amerika Birleşik Devletleri
<b>BM2</b>	İyon kanalı proteini (Influenza B)
<b>C</b>	Sitozin nükleotidi
<b>CDC</b>	Centers for Disease Control and Prevention
<b>CDNA</b>	Komplementer deoksiribonükleik asit
<b>CM2</b>	Minör zarf proteini (İnfluenza C)
<b>CRNA</b>	Complate ribonükleik asti
<b>DANA</b>	2,3- dehidro-N-asetilnöromik asit
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik asit
<b>dNTP</b>	Deoksiribonükleotit Trifosfat Karışımı
<b>DSÖ</b>	Dünya Sağlık Örgütü
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>FRET</b>	Fluorescence Resonance Energy Transfer
<b>GISN</b>	Global Influenza Surveillance Network
<b>GSP</b>	Gen spesifik primer
<b>HA</b>	Hemaglutinin
<b>HEF</b>	Hemaglutinin esteraz füzyon
<b>KOAH</b>	Kronik obstrüktif akciğer hastalığı
<b>M1</b>	Matriks protein
<b>M2</b>	İyon kanalı proteini
<b>MGB</b>	Minör groove binding
<b>mRNA</b>	Messenger ribonükleik asit

<b>NA</b>	Nöraminidaz
<b>NAI</b>	Nöraminidaz inhibitörü
<b>NAT</b>	Nükleik asit tanı teknikleri
<b>NB</b>	İyon kanalı proteini (Influenza B)
<b>NEP</b>	Nükleer eksport protein
<b>NISN</b>	Nöraminidaz İnhibitörleri Duyarlılık Ağı
<b>NS1</b>	Yapısal olmayan protein
<b>NP</b>	Nükleoprotein
<b>PA</b>	Polimeraz asidik
<b>PB1</b>	Polimeraz bazik 1
<b>PB2</b>	Polimeraz bazik 2
<b>PCR</b>	Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>RNA</b>	Ribonükleik asir
<b>RNP</b>	Ribonükleoprotein
<b>RbRP</b>	RNA polimeraz kompleksi
<b>RRT PCR</b>	Real time reverse transkriptase transkriptaz
<b>SSS</b>	Santral sinir sistemi
<b>T</b>	Timin nükleotidi
<b>Tm</b>	Melting temperature
<b>vRNA</b>	Viral RNA
<b>VRNP</b>	Viral riboükleoprotein

## ÖZET

Öksüz B. *Influenza A 2009 (H1N1)* virüsünde H275Y Mutasyonunun Real-Time RT PCR Yöntemi ile Araştırılması. Yeditepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul, 2017

Influenza virüsleri, solunum yolu hastalıklarının sebep olduğu morbidite ve mortalitenin başlıca etkenidir. Tarih boyunca birçok Influenza epidemisi ve pandemisi görülmüştür.

21. yüzyılın ilk pandemisi olan 2009 pandemisinde etken, *Influenza A 2009 (H1N1)* virüsüdür. Yapılan araştırmalar 2009 pandemisine neden olan etkenin H1N1 virüsünün yeni bir suşu olduğunu göstermiştir. Yeni virüs, dört farklı kaynaktan genetik materyal olarak meydana gelmiştir. *Influenza A 2009 (H1N1)* tedavisinde Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) bir nöraminidaz inhibitörü olan oseltamivir kullanılmasını önermektedir. Pandemi döneminde dünya genelinde oseltamivir dirençli vakaların bildirilmeye başlanmasıyla DSÖ, oseltamivir direnç durumunun dikkatli bir şekilde izlenmesini tavsiye etmiştir. Oseltamivir direncine, nöraminidaz gen bölgesinde meydana gelen H275Y mutasyonu neden olmaktadır.

Bu tez çalışmasında Yeditepe Üniversitesi Hastanesi'ne başvuran hastaların Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen klinik örneklerinden pandemik *Influenza A 2009 (H1N1)* olduğu saptanan 131 suş oseltamivir duyarlılığı ve direnci açısından MGB tagman propları kullanılarak, hızlı ve duyarlılığı yüksek bir teknik olması nedeniyle Real-Time Revers Transkriptaz PCR yöntemi ile incelenmiştir. Çalışma sonucunda 58 suş oseltamivir direnci açısından duyarlı saptanırken 73 suş'tan düşük RNA kalitesi nedeni ile sonuç alınamamıştır.

Aktif antiviral direnç gözlemi yeni tedavi yöntemlerinin ve sürveyans ağlarının oluşturulması açısından önem taşımaktadır.

**Anahtar kelimeler:** *Influenza A 2009 (H1N1)*, pandemi, , H275Y mutasyonu, sürveyans

## ABSTRACT

Oksuz B. Investigation of H275Y mutation at *Influenza A 2009 (H1N1)* virus by Real-Time RT PCR method. Yeditepe University, Institute of Health Science, Molecular Medicine Department. MD Thesis. İstanbul. 2017

Influenza viruses are the main cause of morbidity and mortality caused by respiratory diseases. Throughout history there have been many influenza epidemics and pandemics. The 2009 pandemic, which is the first pandemic of the 21st century is the *Influenza A 2009 (H1N1)* virus. The investigations have shown that the cause of the 2009 pandemic is a new strain of the H1N1 virus. Genetic material of the new virus has been occurred from four different sources. WHO (World Health Organization) recommends the use of oseltamivir which is a neuraminidase inhibitor, in the treatment of pandemic *Influenza A 2009 (H1N1)* virus. WHO has suggested that the oseltamivir resistance state be monitored carefully when begun to report oseltamivir-resistant cases worldwide during the pandemic period. H275Y mutation that occurs in the gene region of the neuraminidase is caused oseltamivir resistance.

In this study, 131 virus strains that detected pandemic *Influenza 2009 (H1N1)* which obtained from the clinical samples from the Medical Microbiology Laboratory of Yeditepe University Hospital were investigated by the Real time Reverse Transkriptase PCR method with MGB tagman probes because of being fast and sensitive technique.

As a result of the study, 58 strains were susceptible to oseltamivir and 73 strains did not result in low RNA quality.

Active antiviral resistance monitoring is important for establishing new treatment modalities and surveillance networks.

**Key words:** *Influenza A 2009 (H1N1)*, pandemiC, , H275Y mutation, surveillance

## 1.GİRİŞ VE AMAÇ

Viral solunum yolu enfeksiyonları toplumda hızlı yayılım göstermeleri açısından önemli bir halk sağlığı sorunu oluşturmaktadırlar (1). Doktora başvuru ve hastaneye yatışlarda artışın yanı sıra, iş gücü kaybına ve sonuçta ekonomik kayba neden olmaları açısından toplumsal öneme sahiptirler (2).

Ortomyxoviridae (Influenza virüsleri) solunum yolu hastalıklarının sebep olduğu morbidite ve mortalitenin başlıca etkenidir (1). Influenza ateş, öksürük, baş ağrısı, halsizlik ve miyalji ile seyreden akut viral bir enfeksiyon hastalığıdır. Epidemi ve pandemiler oluşturabilmesi ve pulmoner komplikasyonlar sonucu ölümlere neden olabilmesi, Influenza virüsleri diğer akut solunum yolu sistemi viral enfeksiyonlarından ayıran iki önemli özelliğidir (3).

Tarihin eski çağlarından itibaren Influenza epidemileri ve pandemileri tanımlanmıştır. En bilinen Influenza pandemisi (tüm dünyaya yayılmış olan) İspanyol gribi 1918 (Influenza A (H1N1)) tüm dünyada 20-40 milyon kişinin ölümüne yol açmıştır. Bu dönemde Influenza enfeksiyonlarına bağlı olarak meydana gelen ölümler, birinci Dünya Savaşı döneminde meydana gelen ölümlerden daha fazla olmuştur. Bu tarihten sonra da yeni Influenza virüsleri ile dönem dönem birçok Influenza epidemi ve pandemisi meydana gelmiştir (4). Son olarak, CDC (Centers for Disease Control and Prevention), domuz kaynaklı pandemik *Influenza A 2009 (H1N1)* virüsünü belirledikten sonra hastalığın hızlıca yayılım gösterdiği anlaşılmış ve DSÖ (Dünya Sağlık Örgütü) Haziran 2009'da Influenza A 2009 (H1N1) virüsü için 6. pandemi evresine ulaştığını açıklamıştır (5,6).

Influenza'nın hava yolu ile yayılımının sınırlandırılması hemen hemen mümkün değildir. Virüsü kontrolün en iyi yolu bağışıklanmadır (4). İnaktif virüs aşılı, Amerika Birleşik Devletleri'nde Influenza korunmasında birincil olarak kullanılan yoldur. Fakat Influenza virüslerin bazı özellikleri (antijenik sürüklenme ve kayma) sebebiyle hastalığın bağışıklanma ile kontrolü de yetersiz hale gelmektedir. Bu nedenle DSÖ yeni suşların ortaya çıkışını ve yayılımını hemen saptayabilmek amacı ile sürekli olarak sürveyans programları ile dünyada dolaşan Influenza alt tiplerini takip etmektedir (7).

Influenza enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan ruhsatlı dört adet antiviral ilaç mevcuttur. Bunlardan amantadin ve rimantadin sadece Influenza A'nın tedavisinde kullanılabilen M2 iyon kanal inhibitörleridir. Oseltamivir ve zanamivir ise hem Influenza A hem de Influenza B nin tedavisinde kullanılabilen ve 1999'dan itibaren kullanıma giren nöraminidaz inhibitörleridir (8). Amantadin ve analogu olan rimantadine karşı, Amerika Birleşik Devletleri'nde, 2005 yılı Influenza sezonu sonunda, Influenza A virüslerinin %92'si dirençli bulunmuştur (7). 1999 yılında nöraminidaz inhibitörlerine karşı oluşan direnç gelişimini dünya genelinde takip edebilmek amacıyla Nöraminidaz İnhibitörleri Duyarlık Ağı (Neuraminidase Inhibitors Susceptibility Network; NISN) kurulmuştur. Bu grup antivirallere karşı dirence neden olan birçok mutasyon saptanmıştır. Bunlardan biri de N1 geninde saptanan H275Y mutasyonudur (9,10). 2007 yılının başlarında Norveçte H1N1 virüsünde oseltamivire karşı yüksek oranda H275Y direnci saptanması DSÖ'nü endişelendirmiş ve tüm dünyada direnç takibinin önemine vurgu yapılmıştır (11).

Bu çalışmada Yeditepe Üniversitesi Hastanesi'ne başvuran hastaların *Influenza A 2009 (H1N1)* pozitifliği saptanan örneklerinde, Influenza A tedavisinde sıklıkla kullanımına başvurulmuş bir antiviral olan oseltamivir etken maddesine karşı direnç nedeni H275Y mutasyonunun hızlı bir yöntem olan Real-Time Revers Transkriptaz PCR yöntemi ile araştırılması hedeflenmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlardan hastanemize başvuran hastalardan *Influenza A 2009 (H1N1)* virüsünün oseltamivir etkenli ilaçlara direncinin görülme sıklığı hakkında bir fikir elde edilebilecektir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Tarihçe

Influenza sözcüğü, 1300'lü yıllarda İtalyanca bir kelime olan "Influentia" sözcüğünden türemiştir ve "astrolojik etkiler" olarak ifade edilmektedir (12). Influenza virüslerin hastalıkla ilişkisi ilk olarak M.Ö 412 yılında Hipokrat tarafından kayıtlara geçirilmiştir (13). İlk Influenza pandemisine ait kayıtlar 1580 yılına aittir (3). Salgımlarla ilgili ayrıntılı ilk veriler ise 1889-1892 yılında yaşanan pandeminin ardından kaydedilmiştir. 1918-1919, 1957-1958 ve 1968-1969 yıllarında meydana gelen pandemilerde tutulan düzgün kayıtlarla birlikte Influenza virüslerin epidemiyolojisi hakkında büyük dersler çıkarılmıştır (14). 1933 yılında Wilson Smith isimli bir araştırmacı Londra'da yaşanmış bir epidemi sonrasında, epideminin etkenini saptayabilmek amacıyla araştırmalar yapmış ve etken tam olarak saptanamasa da salgının sebebinin bir virüs olduğu anlaşılmıştır. Bu çalışma *Lanset* dergisinde 1933 yılında Smith Wilson ve arkadaşları tarafından "A virus obtained from influenza patients" başlığı altında yayınlanmıştır (15,16). 1941 yılında Hirst, virüsün hemaglutinasyon özelliğini tanımlamış ve hastalığı geçirenlerde gelişen hemaglutinasyon inhibe edici antikorların ölçümüne olanak sağlayan ucuz ve basit testlerin geliştirilmesinde öncü olmuştur. Böylece bu yöntemle serolojik arkeoloji olarak tanımlanan, eski pandemilere sebep olan Influenza tiplerini aydınlatmak mümkün olabilmıştır (3).

Influenza virüslerinin tanımlanmasının ardından yapılan geriye dönük çalışmalar tüm pandemilerin temeli olarak tarihe geçen ve 40 milyona yakın can kaybına sebep olduğu düşünülen 1918 pandemisinin etkeninin *Influenza A (H1N1)* virüsü olduğunu göstermiştir (17). Virüsün hızlı yayılması ve sık sık antijenik değişikliğe uğraması sebebiyle tüm dünyada Influenza virüs sirkülasyonunu ve yeni antijenik yapıya sahip virüs izolasyonlarını araştırmak, ilgili laboratuvarlara duyurmak ve gelecek Influenza mevsiminde üretime girecek aşı kompozisyonunu önerebilmek için 1948 yılından başlayarak uluslararası iş birliği çerçevesinde Influenza sörveyans ağı çalışmalarına başlanmıştır (18,19).

Son olarak ise 15 ve 17 Nisan 2009'da CDC, DSÖ'ye iki çocuk hastada domuz kaynaklı *Influenza A (H1N1)* virüsü saptadığını bildirmiştir (5). Kısa süre içinde izole edilen etkenin, üç farklı canlının (insan, kanatlı ve domuz) Influenza virüslerine ait gen



bölgelerine sahip olduğu bildirilmiştir (20). Yeni başlayan domuz kaynaklı bu Influenza A virüsü, sınırlı bir viral enfeksiyondan ciddi hastalığa kadar değişen ateşli solunum yolu enfeksiyonu patlamasının nedeni olarak tespit edilerek 21. yüzyılın ilk pandemisine neden olmuştur (5). Bu tarihler arasında meydana tüm epidemiler ve pandemiler Tablo 1’de özetlenmiştir.

**Tablo 1.** Tarihte Influenza Salgınları (+ Epidemiler, ++ Olası Pandemi, +++ Pandemi)  
(21)

Yıl	Epidemik Özelliği	Etki Gösterdiği Bölgeler	Ortaya Çıktığı Mevsim	Kaynak Bölge
1510	++	Avrupa, Afrika	Bilinmiyor	Afrika
1580	+++	Avrupa, Afrika, Kuzey Amerika	Yaz	Asya
1729-1733	+++	Avrupa, Kuzey-Güney Amerika, Rusya	Bahar	Rusya
1781-1782	+++	Avrupa, Çin, Hindistan, Kuzey Amerika, Rusya	Sonbahar	Rusya, Çin
1799-1802	++	Avrupa, Çin, Brezilya, Rusya	Sonbahar	Rusya, Çin
1830-1833	+++	Avrupa, Kuzey Amerika, Rusya, Hindistan, Çin	Kış	Çin
1847-1848	++	Avrupa, Rusya, Kuzey Amerika(?)	Bahar	Asya, Rusya
1889-1891	+++	Bütün Ülkeler Etkilendi	Bahar	Rusya
1900	+++	Avrupa, Kuzey-Güney Amerika, Avustralya	Bilinmiyor	Bilinmiyor
1918-1920	+++	Bütün Ülkeler Etkilendi	Bahar	ABD, Çin
1957-1958	+++	Bütün Ülkeler Etkilendi	Kış/Bahar	Çin
1968-1969	+++	Bütün Ülkeler Etkilendi	Yaz	Çin
1977-1078	+++	Bütün Ülkeler Etkilendi		Çin, Rusya
2009-2010	+++	Bütün Ülkeler Etkilendi	Bahar	Meksika

## 2.2. Influenza Virüslerin Sınıflandırılması ve İsimlendirme

Influenza virüsler Ortomyxoviridae ailesinde yer alırlar (13). Virüsün iç yapısal proteinleri olan nükleokapsid (NP) ve matriks (M) proteinlerine ait antijenik farklılıklar

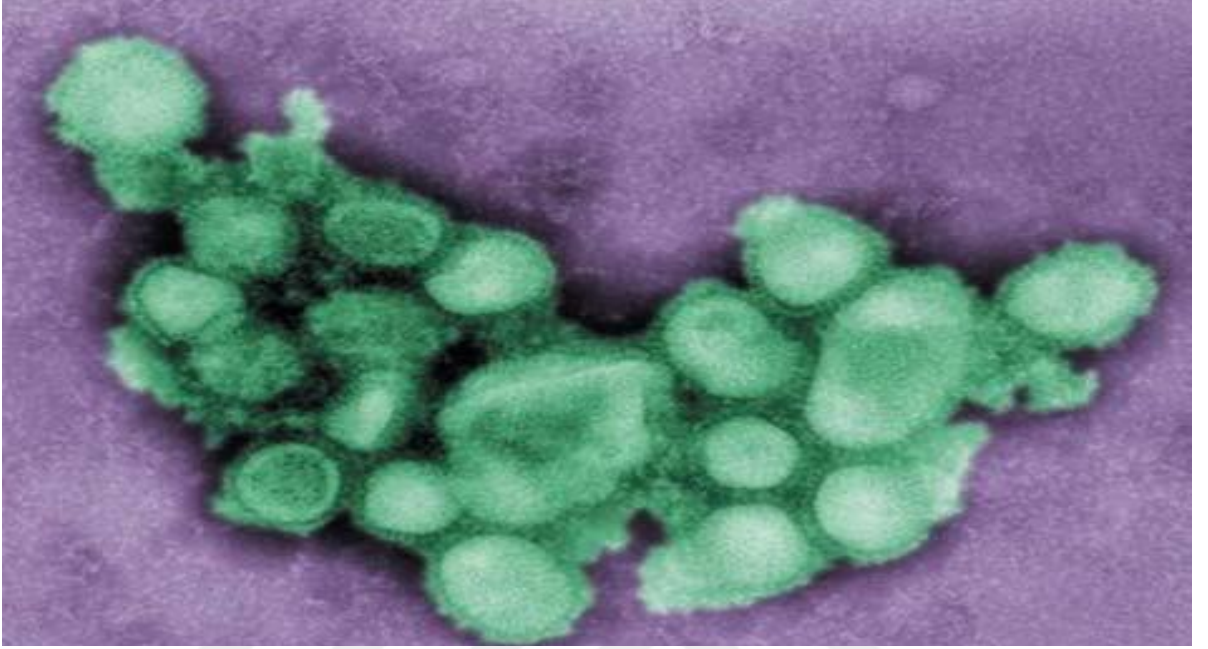
Influenza virüslerini A, B ve C tiplerine ayırır. Bu üç tipe ait proteinler arasında çapraz reaksiyon yoktur. Yüzey glikoproteinleri olan heamaglutinin (HA) ve nöraminidaz (NA) antijenik farklılıkları virüslerin alt tiplerini belirlemek için kullanılır. Sadece A tipinin alt tipleri belirlenebilir (7). Bilinen 16 adet HA (H1-H16), 9 adet ise NA (N1-N9) tipi mevcuttur. Influenza virüslerin alt tip çeşitliliği sebebiyle isimlendirilmeleri DSÖ tarafından önerilen formülasyona göre yapılmaktadır (22). Influenza A virüslerinin isimlendirilmesinde sırasıyla virüsün tipi, izole edildiği canlı türü (insandan izole edilmişse belirtilmez), ilk izolasyon yeri, suş numarası, ilk izolasyon yılı ve HA, NA alt tipleri parantez içinde olmak üzere ifade edilir. Influenza B ve C virüsleri de aynı şekilde adlandırılır fakat HA ve NA alt tipleri olmadığı için belirtilmez. Örnek: 1994 yılında Johannesburg'da insandan izole edilen, suş numarası 33 ve alt tipi H3N2 olan Influenza A virüsü: *A/Johannesburg/33/94 (H3N2)* olarak adlandırılır (7). 1930 yılında, Iowa eyaletinde, domuzdan izole edilen, suş numarası 15 ve alt tipi H1N1 olan Influenza A virüsü ise: *A/swine/Iowa/15/30 (H1N1)* olarak adlandırılır (13).

### 2.3. Influenza Virüslerin Yapısal Özellikleri

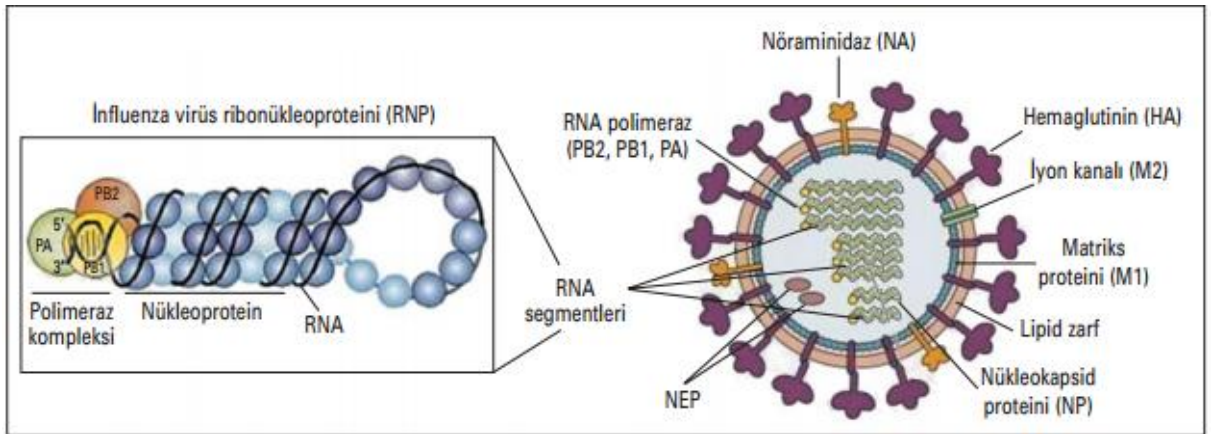
Influenza virüsleri, 80-120 nm büyüklüğünde, heliksel nükleokapsidli, zarflı, ribonükleik asit (RNA) virüsleridir. Elektron mikroskopunda sferik veya pleomorfik bir görünüm sergilerler (Şekil 1) (23). Konak hücreden türetilmiş lipit kılıf virüs partiküllerini sarar. Glikoprotein yapıdaki hemaglutinin (HA) ve nöraminidaz (NA) kılıfın içine doğru girinti yapmıştır ve 10 nm'lik çıkıntılar şeklinde yüzeyde bulunurlar. HA, virüs proteininin yaklaşık %25'ini; NA ise yaklaşık %5'ini meydana getirir (7). Zarf üzerinden çıkıntı yapan üçüncü yapı ise bir integral protein olan M2, iyon kanalı proteini'dir. Viral zarfın hemen altında ise virüsün kor bölgesini saran M1, matriks proteini bulunur ve virionun yaklaşık %40'ını meydana getirir. Virion içindeki her bir negatif tek iplikli RNA parçası, nükleoprotein (NP) ve üç alt üniteden (PB2, PB1, PA) oluşan RNA polimeraz ile ilişkidir. Bu yapı virüsün RNP (ribonükleoprotein) yapısını oluşturur (Şekil 2) (23).

Influenza B virüslerinin yapısal özellikleri, Influenza A virüsleriyle benzer özellikler göstermektedir. Fakat; Influenza B virüslerinde HA, NA, NB (iyon kanalı proteini) ve BM2 (iyon kanalı proteini) yüzey proteinleri bulunur; Influenza A virüsündeki M2 proteininin yerini NB ve BM2 proteinleri alır. Influenza C virüslerinde ise HEF (hemaglutinin-esteraz-füzyon) adı verilen sadece bir adet yüzey glikoproteini

ve minör zarf proteini CM2 bulunur. HEF yüzey proteini Influenza A ve B virüslerindeki HA ve NA moleküllerinin görevini görür. Influenza C virüslerinde M2, NB ve BM2 moleküllerine benzer yapıda bir molekül bulunmamıştır (24).



Şekil 1. Influenza virüslerin elektron mikroskobu görüntüsü (23).



Şekil 2. Influenza virüsünün yapısı (23).

#### 2.4. Influenza Virüslerin Genom Yapısı

Influenza A ve B virüslerinin genomları her biri NP ile ilişkili olan ve negatif polariteli RNA içeren sekiz farklı helikal nükleokapsid segmentinden ve transkriptazdan (RNA polimeraz elemanları: PB1, PB2 ve PA) oluşur. Influenza C ise yedi segmentli bir genom yapısına sahiptir. Influenza A virüsündeki genetik segmentler 890 ile 2340

baz çifti arasında uzunluğa sahiptir (4). Influenza A virüslerinin gen segmentleri ve kodladıkları proteinler Tablo 2’de gösterildiği gibidir.

**Tablo 2.** Influenza A virüslerinin gen segmentleri ve kodladıkları proteinler (23).

<b>Tablo 1.</b> Influenza tip A virüslerinin gen segmentleri ve kodladıkları proteinler				
<b>RNA segmenti</b>	<b>Boyut (nükleotid)</b>	<b>Protein</b>		<b>Fonksiyon</b>
		<b>Simge</b>	<b>Açık adı</b>	
1	2341	PB2	Polimeraz bazik 2	RNA transkriptaz; "cap" bağlama
2	2341	PB1	Polimeraz bazik 1	RNA transkriptaz; elongasyon
3	2233	PA	Polimeraz asidik	RNA transkriptaz; proteaz aktivitesi
4	1778	HA	Hemaglutinin	Sialik aside tutunma; viral zarf-endozom membranı füzyonu
5	1565	NP	Nükleoprotein	Genomun yapısal bileşeni, viral RNA'nın nüklear/sitoplazmik transportu
6	1413	NA	Nöraminidaz (sialidaz)	Sialik asidin parçalanması, virüsün hücreden salınımı
7	1027	M1	Matriks proteini	Virionun majör bileşeni; viral morfogenez
		M2		İyon kanalı proteini; virüsün soyulması; paketlenme
8	890	NS1	Yapısal olmayan protein	RNA transportu, "splicing", translasyon; interferon sentezinin baskılanması
		NEP (NS2)	Nüklear eksport protein	Progeni nükleokapsidlerin sitoplazmaya taşınması

Sekiz parçalı RNA, dokuz yapısal (PB2, PB1, PA, NP, M1, M2, HA, NA, NEP(NS2)) ve bir yapısal olmayan proteini (NS1) kodlamaktadır (23). Üç büyük RNA segmenti PB1, PB2 ve PA polimeraz proteinleri, RNA'nın replikasyonu ve transkripsiyonunda görev alırlar ve 700'den fazla aminoasit içeren büyük proteinlerdir. Diğer segmentlerden biri nükleoproteini, diğerleri hemaglutinin ve nöraminidaz glikoproteinlerini kodlamaktadır. Yedinci segmentten M1 ve M2 olarak adlandırılan matriks proteinleri kodlanır ve bu proteinler virüse şeklini verirler. Matriks proteinleri diğer görevi RNA molekülüne bağlanarak RNA'yı korumaktır. M2 proteini, virüsün zarfından ayrılarak, viral kapsidin açılması ve genetik maddenin ortaya çıkmasında rol alırken aynı zamanda virüsün içerisine hidrojen iyonlarının girişini sağlayan bir iyon giriş kanalı oluşturur (25). M1, M2 ve NP proteinleri tip spesifiktir ve bu sebeple Influenza A'yı Influenza B ve influenza C virüslerinden ayırt etmek için kullanılır.

Influenza A'nın M2 proteini antiviral ilaçlar olan amantidin ve rimantidin için hedef bölgedir (4).

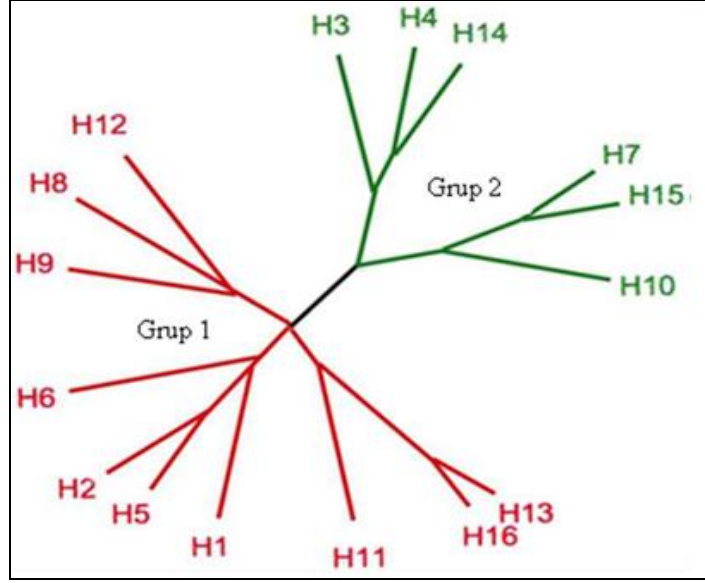
Influenza virüslerinde yapısal olmayan NS1 ve NS2 diye adlandırılan iki protein son segmentte kodlanırlar. Yapısal olmayan dimerik NS1 proteini, konağın mRNA translasyonunu inhibe etmekte; viral pre mRNA'ların "splicing" olayını, mRNA'ların translasyonunu ve viral polimeraz aktivitesini düzenlemekte ve hücrenin antiviral yanıtı olan interferon indüksiyonunu baskılamaktadır (23).

Hemaglütinin ve nöraminidaz proteinlerine, gerek bağışıklıkta rol oynamaları gerekse de antiviral ilaç kullanımında hedef bölge olmaları nedeniyle ayrıntılı olarak değinilecektir.

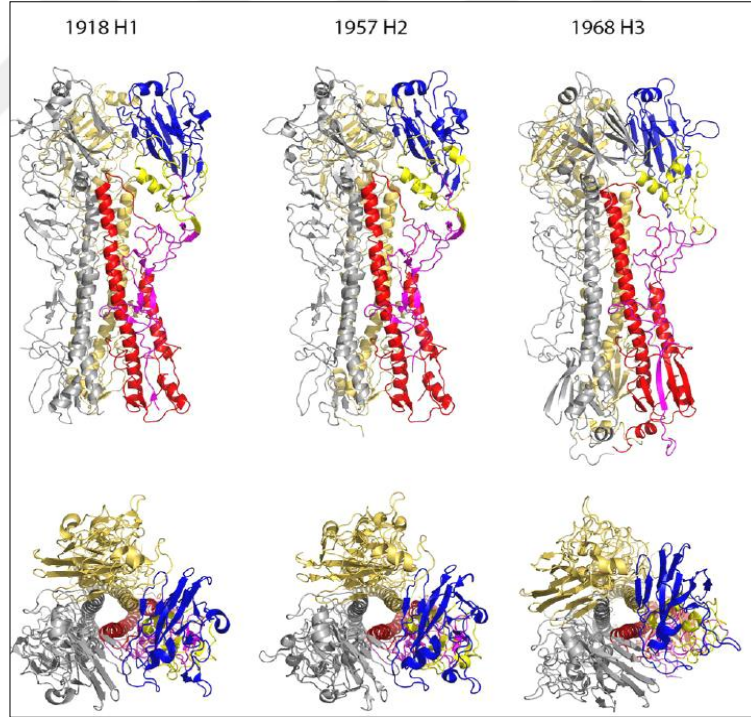
#### **2.4.1. Hemaglütinin Proteini (HA)**

Eritrositleri belirli koşullar altında aglütine edebilme yeteneğinden dolayı bu ismi almıştır (7). Influenza A virüsünün 4 numaralı segmenti tarafından kodlanır (26). Günümüzde bilinen 16 adet HA alt tipi vardır. Bunlardan sadece üçü (H1,H2,H3) insanlara adapte olmuşken tüm HA alt tipleri yabancı kanatlılarda saptanmıştır (27). Günümüzde Influenza A virüsünün HA molekülünün alt tiplerinin birçoğunun yapısı belirlenmiş ve retrospektif çalışmalarla 1918 pandemisine neden olan H1N1 virüsünün HA yapısı da tamamen açıklanmıştır (14). Filogenetik olarak bu HA alt tipleri iki grupta toplanmıştır. Birinci grup H1, H2, H5, H6, H8, H9, H11, H12, H13 alt tiplerini; ikinci grup ise H3, H4, H7, H10, H14 ve H15 alt tiplerini içerir (Şekil 3) (28).

H1, H2, H3 moleküllerinin kristal yapısı, X ışını kristallografisi ile üç boyutlu olarak gösterilmiştir. Bu nedenle HA molekülünün yapı ve işlevselliğini ilişkilendirmek mümkündür. Trimer olan yapının iki monomeri gri ve altın sarı olarak renklendirilmiş; diğer monomer ise fonksiyonel elemanlarına göre üç farklı şekilde renklendirilmiştir. Bunlardan mavi renkli; respötör bağlanma bölgesi, sarı; vestigial esteraz domeni, eflatun ve kırmızı ise füzyon peptidi domenidir (Şekil 4) (28).



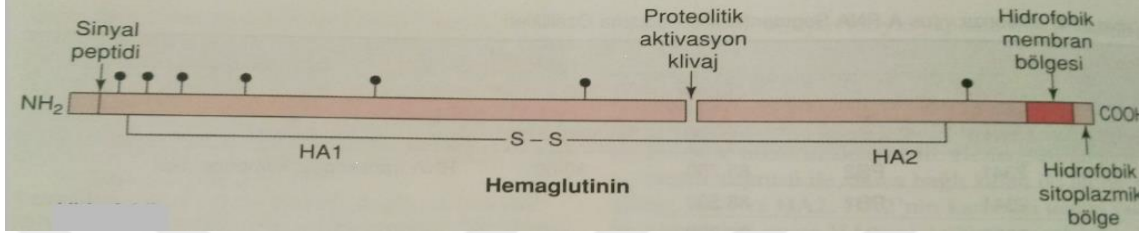
**Şekil 3.** Hemaglütinin proteini alt tiplerinin filogenisi (28).



**Şekil 4.** H1, H2, H3 moleküllerinin kristal yapısı (28).

HA'nın primer dizisinde 566 tane amino asit mevcuttur. Amino ucundaki kısa sinyal dizisi polipeptidi endoplazmik retikulum içerisine sokar ve sinyal dizisi uzaklaştırılır. Hemaglütinin proteini disülfid bağı ile sıkıca bağlı kalan iki alt birime

ayrılır; HA1 ve HA2. HA2'nin karboksi ucuna yakın hidrofobik parça HA molekülünü membrana sıkıca bağlar, kısa hidrofilik kuyruk ise stoplazmaya uzanır. Virüsün enfeksiyöz olabilmesi için HA'nın HA1 ve HA2'ye kesilmesi gerekir. HA1 ve HA2 disülfid (S-S) bağı ile birbirine bağlı kalır. Viral membranda proteinleri içeri gömen hidrofobik amino asitler HA'nın karboksi ucuna yakın yerleşmiştir (Şekil 5) (7).



**Şekil 5.** HA molekülünün primer yapısı (7).

HA proteinini HA1 ve HA2 alt ünitelerine kesim işlemi (klivaj) virüs partikülünün enfeksiyöz olabilmesi için gereklidir. Bu işlem hücrel proteazlar tarafından yapılır. İnfluenza virüs'lerin solunum yollarında yaygın olmaları, HA molekülünü kesen proteaz enzimlerinin sadece bu bölgelerde yaygın olmalarıyla ilişkilidir. Kesilme sonrası ortaya çıkan HA2 molekülünün amino ucu (füzyon peptidi), füzyon aktivitesini sağlar, bu da virüs enfeksiyonunda temel bir basamak olan virüs kılıfının hücre membranı ile birleşmesi için gereklidir. Düşük PH bu birleşmeyi aktive edecek yapısal değişikliği tetikler (7).

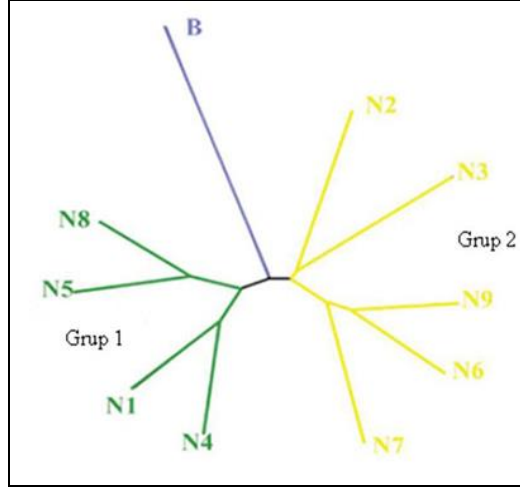
Hemaglütinin molekülü karmaşık bir yapı şeklinde katlanır. HA1 ve HA2 molekülü büyük bir kürecik (globül) ile kaplı uzun bir sap şeklini alır. Sapın en alt kısmı membranın içine sıkıca bağlanır (7). Molekülün küresel bölgesinde reseptör bağlanma bölgesine ilave olarak antijenik bölge de mevcuttur (29) . HA molekülünün beş antijenik bölgesinde çok fazla mutasyonlar meydana gelebilir. Bu beş bölge yüzeyde bulunur ve molekülün dayanıklılığı için gerekli değildir. HA molekülünün diğer bölgeleri molekülün işlevi ve yapısı için gerekli olmalarından dolayı tüm izolatlarda korunmuştur (7).

Yukarıdaki bilgilerden de faydalanarak kısaca özetlemek gerekirse: HA molekülünün üç temel görevi bulunmaktadır. Birinci temel görevi konak hücre yüzeyindeki siyalik asit reseptörlerine bağlanmaktır ve bu bağlantı HA molekülünün küresel baş kısmındaki reseptör bağlama bölgeleriyle gerçekleşir, bunu takiben virüs endozomal yol ile konak hücre içine alınır. HA molekülünün diğer önemli görevi ise füzyon peptidi aracılığı ile viral membranla endozomal membranın füzyonunu sağlamak suretiyle vRNP'lerin (viral RNP) sırasıyla sitoplazmaya ve çekirdeğe geçişini sağlayıp enfeksiyonu başlatmaktır. Son önemli görevi de NA ve M2 membran proteinleri ile biraraya gelerek konak hücrenin apikal bölgesinde viral tomurcuklanmayı sağlamaktır (13).

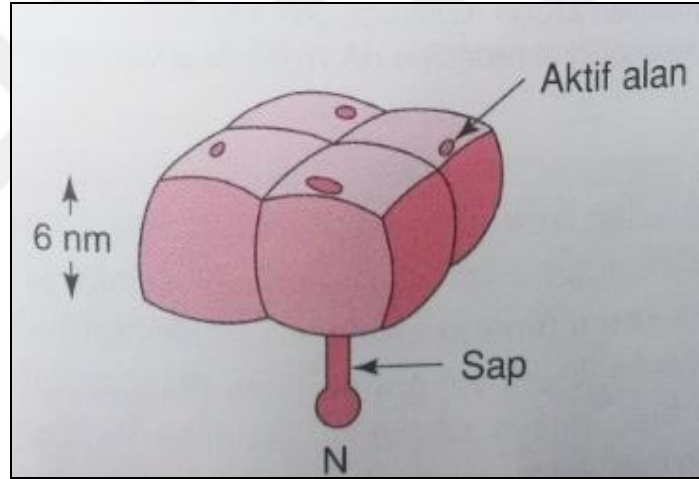
#### **2.4.2 Nöraminidaz Proteini (NA)**

Influenza virüs partikülünün yüzeyinde bulunan diğer glikoprotein nöraminidazdır (1). NA molekülü Influenza virüsünün 6.segmenti tarafından kodlanır ve 413 aminoasit sentezleyen 1413 nükleotit uzunluğunda bir moleküldür (29). Influenza A virüsünde NA molekülünün 9 alt tipi (N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8, N9) saptanmış olup bunların sadece ikisine (N1, N2) insanlarda rastlanmıştır. Filogenetik olarak tüm nöraminidaz alt tipleri iki grupta toplanır. Birinci filogenetik grup N1, N4, N5 ve N8 alt tiplerini, ikinci grup ise N2, N3, N6, N7 alttiplerini içerir (Şekil 6). Her iki filogenetik grupta bulunan moleküller enzimin aktif bölge yapısına göre birbirinden ayrılırlar (28). Varghese ve ark. 1957 ve 1967 yıllarına ait iki Influenza A virüsünün N2 molekülünü kristalize ederek üç boyutlu yapılarını ortaya çıkarmışlardır. NA molekülünün gövdesi pronaz enzimi kullanılarak baş kısmından ayrılmış ve üç boyutlu yapısı X-ışını kristallografi yöntemi ile ortaya konmuştur (30). Nöraminidaz molekülü tetramer yapıdadır ve birbirinin aynı dört monomerden oluşur. Kutu şeklindeki baş ince bir sap üzerinde bulunur. Her başın üzerinde de katalitik bir bölge mevcuttur. Bu da her NA çıkıntısının dört aktif bölge bulundurduğu anlamına gelmektedir (Şekil 7) (7). NA molekülü N terminal bölgesinde bulunan 29 amino asitlik tek bir hidrofobik bölge ile viral membrana gömülüdür. Her bir NA molekülünde karbonhidratların bağlanabileceği potansiyel beş glikozilasyon bölgesi mevcuttur (31).





**Şekil 6.** Nöraminidaz alt tiplerinin filogenetik gruplandırması (28).



**Şekil 7.** Nöraminidaz molekülünün tetramer yapısı: Her nöraminidaz molekülünün üst yüzeyinde aktif bölgesi mevcuttur (7).

HA ve NA moleküllerinin her ikisi de hücre yüzeyindeki polisakkaritlerin terminal ucundaki siyalik asidi tanır fakat bu tanıma şekli iki molekülde de farklı şekildedir. HA molekülü polisakkaritlerin terminal ucundaki siyalik asidin konfigürasyonunu tanır, NA molekülü ise siyalik asit ile bitişiğindeki şeker molekülleri (çoğunlukla galaktoz) arasındaki  $\alpha$ -ketosidik bağı tanır (29).

NA molekülünün enzimatik ve antijenik olmak üzere iki fonksiyonu vardır. Enzimatik fonksiyonuyla hücre yüzeylerindeki polisakkaritlerin terminal ucundaki

siyalik asit ile bitişindeki şeker (çoğunlukla galaktoz) arasındaki  $\alpha$ -ketosidik bağı ayırır ve tomurcuklanma sırasında HA molekülünün siyalik aside bağlanarak hücre yüzeyine yapışıp kümelenmesini engellemiş olur. Böylece virüs partikülünün serbest kalarak komşu hücreleri enfekte etmesine sağlanmış olur. Yani ortamda fonksiyonel NA molekülünün varlığında virüs hücreden tomurcuklanarak serbest olarak ayrılır fakat NA molekülünün yokluğunda hücre yüzeyine yapışarak kümeler oluşurmaktadır ve bu durumda virüsün komşu hücreleri enfekte edebilmesi imkansız hale gelmektedir (13). NA molekülünün diğer enzimatik fonksiyonu virüsün hücreden serbestleşmesinden sonra da solunum yolu mukozasında bulunan siyalik asit moleküllerinin parçalanmasına yol aarak virüsün epiteli kaplayan mukopolisakkaridlerin içinden geçişini sağlamaktadır. Özetle, NA molekülünün enzimatik rolü virüsün enfekte hücreden sorunsuz bir şekilde yeni hedef hücrelere yönelmesini sağlamaktır (23). NA molekülünün antijenik özelliği nedeniyle moleküle karşı oluşan antikorlar enfeksiyonu tam olarak nötralize edemez fakat enfeksiyonun şiddetini azaltmada önemli derecede etkilidir.

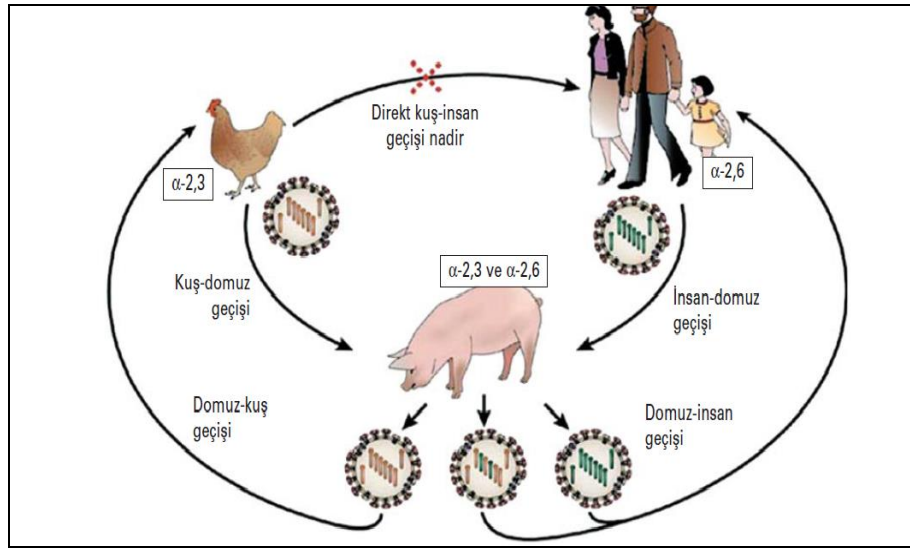
NA aktivitesi Influenza enfeksiyonu aasından önemli bir faktördür. Bu nedenle NA molekülünün yapısının bilinmesi, yeni antivirallerin geliştirilmesi aasından da büyük öneme sahiptir (32).

## **2.5 Influenza Virüsünün Replikasyonu**

### **2.5.1 Virüsün Hücreye Tutunması**

Tutunma, viral HA molekülünün büyük küreciğinin tepesindeki reseptör bağlanma bölgesi ile konak hücre üzerindeki siyalik aside (N-acetyl neuraminic acid) bağlanmasıyla gerçekteşir (1,24) . Siyalik asit, bir çok membran glikoproteininin ve glikolipidlerin yapısında bulunan karbonhidrat yan zincirlerinin, terminal ucunda yer alan dokuz karbonlu bir monosakkarittir. Siyalik asit galaktoza iki şekilde bağlanabilir. Ya, siyalik asidin 2. karbonu galaktozun 3. karbonu ile  $\alpha$ -2,3 formunda, (SA $\alpha$  2,3Gal) ya da siyalik asidin 2. karbonu galaktozun 6.karbonu ile  $\alpha$ -2,3 formunda (SA $\alpha$  2,6Gal) bağlantı kurar. Bu iki farklı bağlanma şekli siyalik asidin farklı konfigürasyon oluşturmasını sağlar. Böylece HA molekülünün konak seçme özgülüğü bu bağlanma şekillerine bağlı olarak meydana gelir (24).

Influenza A virüslerinin SA $\alpha$ 2,6Gal ya da SA $\alpha$ 2,3Gal siyalik asit konfigürasyonunu tercih etmeleri HA molekülünün sözkonusu reseptör bağlanma bölgesindeki amino asitlerin yapısına bağlıdır. İnsan üst solunum yolu epitel hücrelerinde çoğunlukla SA $\alpha$  2,6Gal bağı baskın iken , alt solunum yolu epitel hücreleri ise SA $\alpha$  2,3Gal bağı içermektedir (29). 1997 yılından bu yana H5N1 avian Influenza A virüsü insanda enfeksiyon oluşturabilmesine rağmen SA $\alpha$ 2,3Gal bağına tercih etmesi ve bu bağı üst solunum yollarında yoğun olarak bulunmaması sebebiyle insandan insana kolayca bulaşabilme özelliği kazanamamıştır (33). Domuzların trakeal epitel hücrelerinde ise, hem SA $\alpha$ 2,6Gal hem de SA $\alpha$ 2,3Gal molekülleri bulunmaktadır. İşte bu sebeple domuz hücre reseptörleri, hem insan hem de kuş orijinli virüslerin tutunmasına olanak sağlamış olur (27,22). 1918, 1957 ve 1968 yıllarında meydana gelen pandemilerden sorumlu olan Influenza A virüslerinin ise insanlarda üst solunum yollarında yoğunlaşan SA $\alpha$ 2,6Gal oligosakkaritlerini tercih ettikleri ve bundan dolayı insandan insana hızla bulaşma özelliği gösterdikleri kabul görmektedir (34).



**Şekil 8.** Influenza virüslerin sialik asit konfirügasyonuna göre konak özgüllüğü (23).

### 2.5.2 Virüsün Hücreye Girişi

Viral HA'nın konak hücre yüzeyindeki siyalik aside tutunmasının ardından virüs reseptöre bağlı endositozla hücre içine alınır (23). Endozomal yapının asiditesi virüs kılıfı için iki açıdan önemlidir. Birincisi; düşük PH, HA molekülünün yapısında değişikliğe sebep olur ve HA2 bölgesindeki füzyon peptidinin açığa çıkmasını sağlar. Böylece aktifleşen füzyon peptidi endozomal membran ile viral zarfın füzyonunu sağlar. İkincisi; virionun iç kısmındaki asidite artışı protein-protein (NP ve M1) iletişimini bozar ve vRNP'lerin matris proteininden serbest kalmasına neden olur. Böylece vRNP'ler füzyon ile açılan gözeneklerden önce sitoplazmayageçer (24).

### 2.5.3 Viral RNA ve Proteinlerin Sentezi

Viral RNA sentezi çekirdekte gerçekleşir. Viriondan serbest kalan viral RNP'lerin hücre çekirdeğine taşınması, sahip oldukları özel nükleer translokasyon dizileri sayesinde olur. Viral RNP, negatif polariteli vRNA'yı şablon olarak kullanarak iki tür RNA sentezler. Birincisi; viral proteinlerin translasyonunda kullanılacak olan mRNA, ikincisi; ara ürün complete RNA (cRNA) ve cRNA kullanılarak sentezlenen genomik vRNA'dır (24).

Influenza virüslerin transkripsiyon mekanizması diğer RNA virüslerinden farklıdır ve transkripsiyonda konak hücre fonksiyonları önemli rol oynar. Diğer RNA virüsleri viral RNA sentezinde hücrel transkriptazları kullanmazlar (1).

Çekirdeğe giren gen segmentlerinin transkripsiyonu, RNA polimeraz kompleksi (PB2, PB1, PA (RbRP) ) tarafından yapılır. Fakat öncelikle bu kompleksin, hücrel RNA polimeraz II enzimi tarafından metillenerek aktive edilmesi ve konak hücre mRNA'sının 5' ucundaki "cap" bölgesini primer olarak kullanması gereklidir. İşte bu nedenle Influenza virüsleri, viral mRNA transkripsiyonu yapabilmek için çekirdeğe bağımlılık göstermektedir (27). Influenza virüslerinde transkripsiyon, 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 (29). Negatif polariteli vRNA'nın 5' ucundaki kodlanmayan bölgesinde 5-7 adet urasil molekülünde PolyA kuyruğu bulunur. Viral RNA polimeraz bunu pozitif polariteli mRNA'ya transkribe ederken urasil moleküllerini adenin molekülleri ile eşler ve polyA kuyruğu şekillenmiş olur. Böylece viral mRNA'nın poly A kuyruğu (poliadenillenme)

ve “cap” ekleme işlemi tamamlanmış olur, viral mRNA çekirdekten sitoplazmaya taşınır ve ribozomlarda translasyonu gerçekleştirilir (23,24). Viral mRNA'nın zarf proteinleri olan HA, NA ve M2 ribozomlarda sentezlenerek endoplazmik retikulumda katlanır ve post-translasyonel modifikasyon için golgi cisimciğine taşınırlar. Bu üç zarf proteini modifikasyon sonrası özel sinyaller aracılığı ile montaj için hücre membranına yönelirler (13).

Diğer taraftan PA, PB1, PB2 ve NP proteinleri çekirdeğe geri dönerek cRNA'lardan genomik vRNA ipliklerinin transkripsiyonunu gerçekleştirir. Yeni sentezlenen negatif ipliklerin çoğu vRNA'yı oluştururken, bazıları da tekrar mRNA sentezine katılır (29). Genomik vRNA replikasyonu viral mRNA transkripsiyonundan farklı olarak poly A ya da “cap” ekleme işlemi gerektirmez, tüm genom transkribe edilir. Genomik vRNA'nın çekirdekten taşınması NEP ve M1 proteinleri tarafından regüle edilir. M1 hem viral RNA 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 ve bu iletişim M1-RNP kompleksinin nükleoporin aracılığı ile sitoplazmaya geçişini sağlar (24). M1 proteini sitoplazmada sentezlendikten sonra çekirdeğe geri döner ve RNP-NEP kompleksini hücre zarına yönlendirir ve HA, NA ve M2 proteinleriyle bir araya getirmek suretiyle virüsün paketlenme işlemini başlatır (13).

#### **2.5.4 Viral RNA'nın Paketlenmesi**

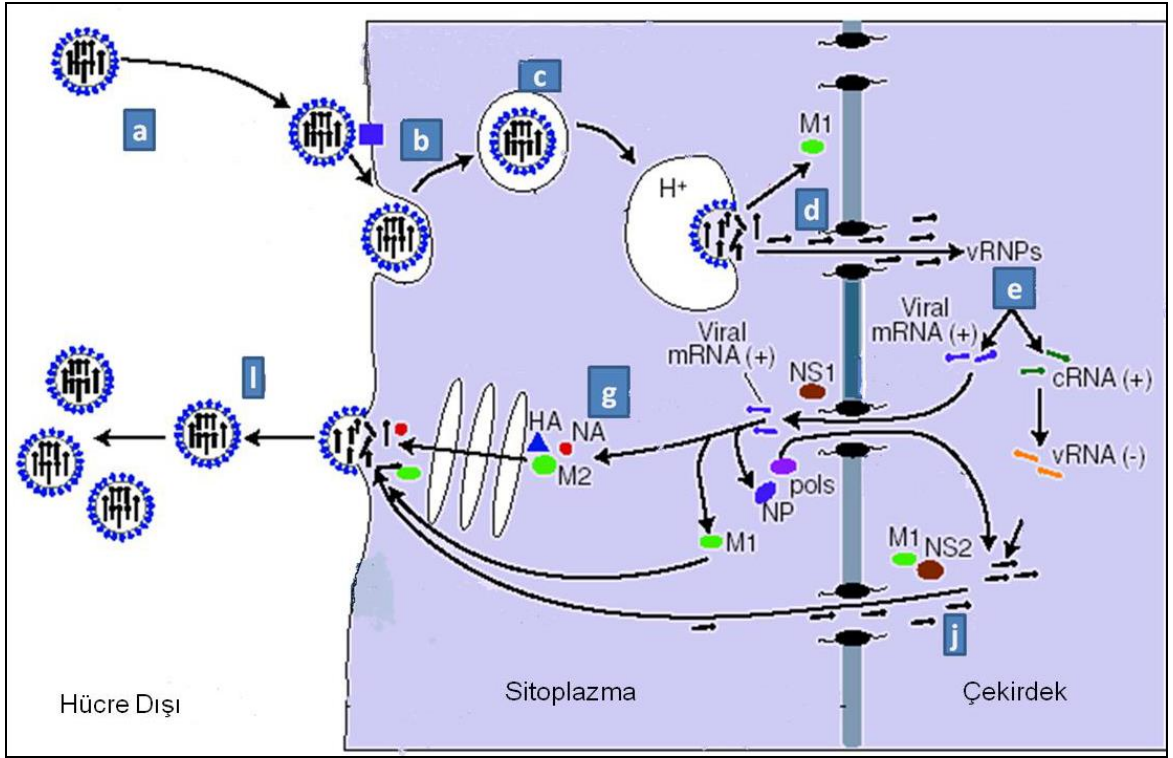
Influenza virüsler, virion tüm gen segmentlerini yapısında bulunduramadığı sürece tam olarak enfeksiyöz özellik gösteremez. Önceleri vRNA segmentlerinin virion içerisinde rastlantısal bir şekilde paketlendiği düşünülüyordu fakat daha sonra segmentlerin virion içine seçilerek yerleştirildiği, seçimde vRNA'nın kodlama yapmayan 3' ve 5' bölgelerindeki “cis-acting” sinyallerinin rol oynadığı ve böylece oluşan yeni virionların tüm segmentleri içerenlerinin enfeksiyöz olabildiği fikirleri ileri sürülmüştür (23,35,36).

#### **2.5.5 Tomurcuklanma ve Hücreden Ayrılma**

Oluşan yeni virionlar enfekte hücrelerin polarize apikal bölgesinden tomurcuklanarak ayrılmakta, lateral ya da bazal bölgelerde tomurcuklanma işlevi gerçekleşmemektedir. Tomurcuklanma, M1 matriks proteininin konak hücre sitoplazmik membranının altında birikmesiyle başlar. Tomurcuklanma işlevi

tamamlandığında HA çıkıntıları virionların hücre yüzeyindeki sialik asitlere bağlanmasına sebep olmaktadır (29). Bu aşamada NA, hücre membranındaki sialik asit yapılarını parçalamakta ve HA'nın sialik aside yapışmasını önleyerek virus salınımını kolaylaştırmaktadır. Virüsün hücreden serbest kalmasından sonra da NA'nın fonksiyonu devam etmektedir. NA, solunum yolu mukozasında bulunan sialik asit moleküllerini parçalayarak virusun epiteli kaplayan mukopolisakkaridlerin içinden geçişini sağlamaktadır (37).

Influenza virüslerin replikasyon döngüsü Şekil 9. da özetlenmiştir.



**Şekil 9.** Influenza virüslerinin replikasyon döngüsü.

Virüs ilk olarak HA molekülü aracılığı ile konak hücre sialik asit reseptörüne bağlanır (a), endositoz yoluyla hücre içine alınır (b). M2 iyon kanalı aracılığı ile sitoplazmadan endozomun içine H iyonları pompalanır ve ortam asiditesi artar. (c). HA molekülü “cleavage bölgesinden” ikiye ayrılır ve füzyon peptitleri aktive olarak füzyonu gerçekleştirir, serbest kalan vRNP’ler nükleer porlardan geçerek çekirdeğe ulaşır (d). Replikasyon çekirdekte RbRP ile gerçekleştirilir ve sonuçta hem mRNA hem de cRNA sentezlenir; cRNA’dan da genomik vRNA sentezlenir (e). Çekirdekte sentezlenen mRNA’lar sitoplazmaya geçer ve ribozomlarda proteinlere dönüştürülür.

Sitoplazmada sentezlenen M1, NP, NS2 (NEP) proteinleri ve RNA polimeraz çekirdeğe geri dönerek genomik vRNA ile biraraya gelir ve “kor” kompleksi oluşturur. HA, NA ve M2 proteinleri de konak hücre membranına doğru yönelirler (g). Çekirdekte biraraya gelen kor tekrar sitoplazmaya geçer ve HA ve NA'nın gittiği yöne doğru giderek virüs partikülünü oluşturur ve tomurcuklanma yolu ile hücreden dışarı çıkarlar (j). Son olarak NA oluşan bu tomurcuğun siyalik asitlerle bağlantısını keserek yeni virüs partikülünün serbest hale gelmesini ve konak hücreden ayrılmasını sağlar (I). (29)

## **2.6 Influenza Virüslerinde Evrim**

Influenza virüslerinde genetik çeşitliliği sağlayan üç temel mekanizma bulunmaktadır. Bunlar; nokta mutasyonlar, harmanlanma ve rekombinasyon dur (38).

### **2.6.1 Nokta Mutasyonlar**

Influenza virüsleri negatif iplikli RNA içermeleri nedeniyle konak hücrede mRNA'larını sentezleyebilmek için virion yapısında RNA'ya bağımlı RNA polimeraz enzimi taşımaktadırlar. Viral RNA polimeraz enziminin ise hata oranı oldukça yüksektir ve bundan dolayı transkripsiyon sırasında tüm fragmentlerde nokta mutasyonları meydana gelebilmektedir (23). Bu nedenle, Influenza virüslerinin her replikasyon siklusunda genoma hatalı eklenen nükleotidler (örneğin A yerine T eklenmesi gibi) nokta mutasyonların oluşmasına sebep olur ve hata oranları Influenza virüslerinde her baz çifti başına  $7,3 \times 10^{-5}$ , replikasyon başına ise (genom başına)  $\approx 1$  olarak saptanmıştır (29).

### **2.6.2 Harmanlanma (Reassortment)**

Harmanlanma; aynı hücreyi enfekte eden iki ya da daha fazla farklı Influenza virüsünün genleri arasında gerçekleşen gen alışverişi ile meydana gelmektedir ve ancak aynı tip virüsler arasında gerçekleşebilir. Örneğin, Influenza A virüsleri ancak yine Influenza A virüs'leriyle harmanlanabilirler (39). Bir hücreyi aynı anda enfekte eden iki farklı Influenza A virüs alt tipinin gen segmentlerinde karışımın olması ve projeni virionlar içine karışmış gen parçalarının paketlenmesi genomun parçalı olması nedeniyle kaçınılmazdır. Sekiz segment içeren iki farklı virüs tipinin aynı hücreyi enfekte etmesi sonunda rastlantısal olarak 256 gen kombinasyonu olasılığı vardır. Bu olay “genetik karışım (genetic reassortment)” olarak bilinir ve viral antijenlerin tamamen değişimiyle sonuçlanır. Oluşan yeni tipler pandemilere yol açar (27).

### 2.6.3 Rekombinasyon

Influenza virüsünün gen segmentlerinden birinin, diğer gen segmentlerinden bölümler içermesi rekombinasyon olarak ifade edilir ve böylece meydana gelen rekombine genin biyolojik özellikleri de değişir. Örneğin, rekombinasyon sonucu HA gen segmentine NP gen segmentinden bir bölüm aktarıldığında HA molekülünün klivajının kolaylaştığı gözlenmiştir (29). RNA rekombinasyonu geçmişte düşünüldüğünün aksine günümüzde daha sık rastlanan bir olgudur. Rekombinasyon sonucunda düşük patojeniteye sahip virüsler yüksek patojenite özelliği kazanabilirler (38).

Influenza virüslerde meydana gelen bu genetik değişkenlikler epidemiyolojik olarak önemli iki duruma neden olurlar. Bunlar; antijenik drift ve antijenik shift'tir (4).

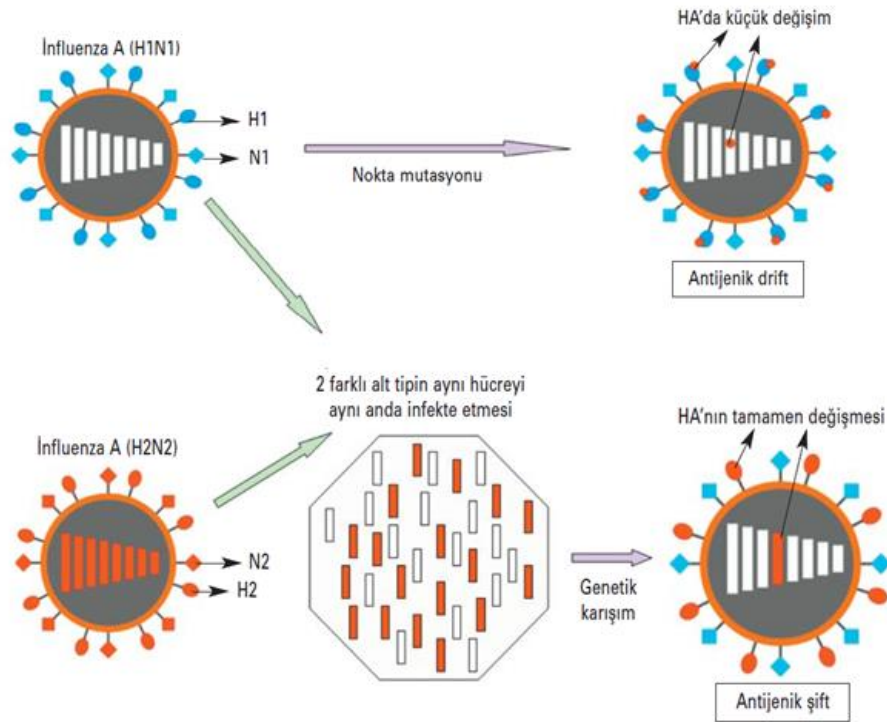
### 2.6.4 Antijenik Drift (Antijenik Sürüklenme)

HA ve NA genlerindeki nokta mutasyonlar sonucu gelişen minör antijenik değişimlere antijenik drift denir. Antijenik sürüklenme gösteren suşlarda, HA'da bir veya daha fazla antijenik bölge mutasyonları görülebilir. Antijenik sürüklenme olayı, her üç tip Influenza virüsü ( A,B ve C) için de geçerlidir ve epidemiyolojik olarak öneme sahiptir (4,23). H1 molekülünde Ca1, Ca2, Cb, Sa ve Sb olmak üzere yine 5 antijenik domain, H3 molekülünde ise A, B, C, D ve E olmak üzere 5 tane antijenik domain saptanmıştır. Bu antijenik bölgelerdeki tek bir mutasyon bile antijenik varyasyona neden olabilmektedir (29). Görülen nokta mutasyonların büyük çoğunluğu nötral olup proteinlerin konfürmasyonunu etkilemezken bazı mutasyonlar, konak antikorlarının bağlanmalarını etkileyecek biçimde virüs proteinlerinde değişikliklere sebep olurlar. Böylece, daha önceki dolaşan suşlara karşı gelişmiş veya aşılamayla uyarılmış antikorlar artık, antijenik sürüklenmeyle değişime uğramış yeni enfeksiyon etkeni virüslere karşı koruma sağlayamazlar. HA ve NA genlerinin aminoasit dizilerindeki mutasyon görülme sıklığının bir yıl içinde % 1'den az olduğu hesaplanmaktadır . Oluşan antijenik farklılıkların serolojik testlerle saptanabilmesi ise 2-5 yıllık bir süreyi almaktadır. Influenza virüslerindeki bu antijenik değişimlerin mevsimsel Influenza aşıları içerisinde bulundurulacak virüslerin belirlenebilmesi açısından sürekli izlenmelerini gerektirmektedir (40).



### 2.6.5 Antijenik Shift (Antijenik Kayma)

Influenza virüslerinin parçalı genom içermesi parçalar arasında rekombinasyon ve harmanlanma (reassortment) olaylarının gerçekleşmesine neden olmaktadır. Genetik karışım ya da rekombinasyon ile HA ve NA'yı kodlayan yeni gen segmentlerinin kazanılmasıyla meydana gelen majör değişiklik antijenik shift (antijenik kayma) olarak ifade edilir ve sadece Influenza A virüslerinde görülür (4,27). Antijenik shift, HA ve NA'da ayrı ayrı veya her iki yüzey glikoproteininde birden olabilir. Yeni oluşan alt tipte eski suşa göre % 20-50 oranında farklı bir aminoasit dizilimi mevcuttur. Yeni oluşan virüse karşı toplumda bağışıklık olmadığından hastalık hızla yayılım gösterir ve pandemiler meydana gelir (41). Örneğin 1947 yılında Influenza A virüsünün H1N1 alt tipi yaygın olarak görülmekteydi. 1957 de her iki antijende meydana gelen shift sonucu, H2N2 subtipi ortaya çıkmıştır. 1968 yılında ise H3N2 subtipi görülmüş ve 1977 yılında H1N1 tekrar ortaya çıkmıştır. H1N1 in tekrar ortaya çıkması ile daha önceden virüsle karşılaşan ve antikor cevabı geliştiren 30 yaşından büyük popülasyon üyeleri korunmuştur fakat 30 yaşından daha genç popülasyon için risk oluşmuştur (4). 21. yüzyılın ilk pandemisine neden olan *Influenza A 2009 (H1N1)* virüsü de antijenik shift sonucunda kanatlı, insan ve domuz İnfluenza virüs'lerinin gen segmentlerinin harmanlanmasıyla ortaya çıkmıştır (42).



Şekil 10. Influenza A virüsünde Antijenik drift ve Antijenik shift (23).

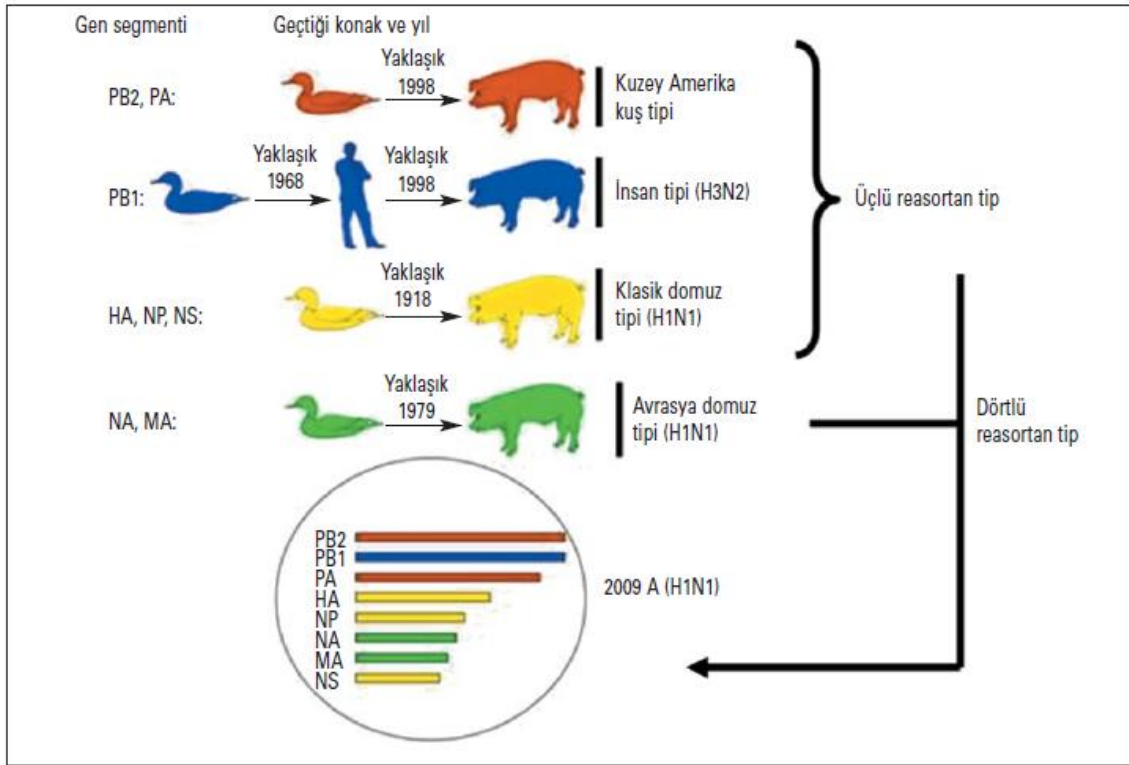
### 2.6.6 Pandemik *Influenza A 2009 (H1N1)* Virüsünün Genetik Orjini

*Influenza A 2009 (H1N1)* virüslerinin bilinen tarihi kökeni 1918 yılına dayanmaktadır. Kuş orijinli olduğu bilinen bu virüs, türler arası geçiş için karmaşık engelleri aşarak insanları enfekte etme özelliği kazanmış ve 20. yüzyılın ilk ve en büyük pandemisine neden olan 1918 pandemisine yol açmıştır (37). İlk kez, 1930 yılında domuzlardan izole edilen *Influenza A (H1N1)* virüsünün antijenik yapısının 1918 insan *Influenza A (H1N1)* virüsü ile çok büyük benzerlik gösterdiği ve aynı ortak atadan köken aldığı ifade edilmiştir. 1930 yılından 1990 yıllarının sonuna dek domuz Influenza A virüsleri “klasik domuz Influenza virüsü” olarak tanımlanmışlar ve bu virüsler uzun zaman antijenik yapılarını korumuşlardır. 1998 yılında klasik domuz Influenza virüsü, insan *Influenza A (H3N2)* ve Kuzey Amerika kuş Influenza (alt tipi bilinmiyor) virüslerinin genetik yapıları karışıma uğramış ve üçlü reasortan *Influenza A (H3N2)* domuz virüsü ortaya çıkmıştır. Aynı yıl Kuzey Amerika’da domuz popülasyonu arasında dolaşan üçlü reasortan H3N2 alt tipi, klasik domuz Influenza virüsü ile tekrar karışıma uğramış, iki yeni domuz alt tipi (H1N1 ve H1N2) oluşmuş ve Asya’da domuz popülasyonu arasında dolaşıma girmiştir. Her ne kadar insan ve domuz H1N1 virüslerinin hepsi kuş kaynaklı ise de bunların evrimi farklı konak türlerinde gerçekleşmiştir (23). Domuz gribi virüsü de diğer Influenza virüsleri gibi sürekli değişikliğe uğrama özelliğine sahiptir. Domuzlar aynı zamanda kuş Influenza virüsleri ve insan Influenza virüsleriyle de enfekte olabilirler ve bu, domuzları, virüsün diğer Influenza virüsleriyle gen değiştirmesini kolaylaştıran bir konakçı haline getirir. Böylece birçok değişik Influenza alt tipi domuzlarda enzoonotik hale gelmiştir. (43,44).

21. yüzyılın ilk pandemisi olan 2009 pandemisinde etken olan virüs ile benzer antijenik yapıya sahip 1918 pandemisi etkeni arasında, benzerliklerin yanı sıra farklılıklar da saptanmıştır. Örneğin her iki pandemide de etken olan virüslerin yüzey glikoproteinleri olan HA’ları, özellikle mevsimsel grip etkeni olan H1N1 virüslerinden farklı olarak düşük glikozilasyon oranına sahiptir (45). Virolojik açıdan incelendiğinde ise, 1918 suşunun tüm gen segmentlerinin kanatlı kökenli olduğu; büyük olasılıkla bilinmeyen bir konakta, paralel olarak ve birlikte evrimsel gelişim geçirdikleri kabul edilmektedir. Böylece İspanyol gribinin, kanatlılarda var olan bir suşun insana adaptasyonu sonucunda ortaya çıktığı konusunda fikir birliğine varılmıştır. 1957 yılında Asya gribinin etkeni olan H2N2 alt tipi ile, 1968 yılında Hong-Kong gribinin etkeni olan H3N2 alt tipinin ise, 1918 insan virüsü ile dolaşımdaki kanatlı virüslerinin

harmanlanması sonucunda ortaya çıktığı kabul edilmektedir. Fakat 2009 pandemisinden sorumlu *Influenza A 2009 (H1N1)* virusünün evrimi tamamen farklı bir şekilde meydana gelmiştir (46). Yapılan araştırmalar sonucu 2009 pandemisine neden olan etkenin H1N1 virüsünün yeni bir suşu olduğunu göstermiştir. Yeni virüs, Kuzey Amerika domuz gribi virüsü, Kuzey Amerika kuş gribi virüsü, insan Influenza virüsü ve Avrasya (Asya-Avrupa) domuz gribi virüsleri olmak üzere dört farklı kaynaktan genetik materyal olarak oluşmuştur. Yeni virüsün bilimsel olarak tam adı domuz orijinli *Influenza A/California/04/2009 (H1N1)* virüsüdür (47). Sonuç olarak yeni etken; Kuzey Amerika kanatlı virüslerinin PB2 ve PA gen bölgelerini, insan H3N2 viruslerinin PB1 gen bölgesini, klasik domuz gribi viruslerinin H, NP, NS gen bölgelerini ve Asya-Avrupa domuz gribi virüslerinin N ve M gen bölgelerini içermektedir (48).

Pandemik *Influenza A 2009 (H1N1)* virüsü ve mevsimsel grip etkeni *Influenza A (H1N1)*, hedef aldığı yaş grubu ve etkilediği hasta profili açısından farklılık göstermektedir. Mevsimsel grip için risk grupları olarak bilinen 65 yaş üzeri bireyler ya da süregelen hastalığı olan kesimin pandemik H1N1 için söz konusu olmadığı, tüm yaş gruplarının ve sağlık sorunu olmayanların da bu salgında hedef oldukları bilinmektedir (49). Çocuk ve genç erişkinlerin pandemik H1N1 virüslerine karşı çapraz reaksiyon veren antikorlara sahip olmadığı, 60 yaşın üzerindeki bireylerin ise %30-40'ında çapraz reaksiyon veren antikorlara sahip olduğu tespit edilmiştir. 1950'li yıllardan önce insanlar arasında dolaşımda olan H1N1 virüsleri, antijenik olarak klasik domuz H1N1 virüslerine dolayısıyla da pandemik H1N1 virüslerine günümüz mevsimsel H1N1 serotiplerinden çok daha fazla benzerlik gösterirler. Dolayısıyla da pandemik H1N1 virüsüne karşı çapraz koruma sağlayan antikorlara sahiptirler (23).



**Şekil 11.** *Influenza A 2009 (H1N1)* virüsünün genetik orjini (23)

## 2.7 Influenza Virüslerin Epidemiyolojisi

Influenza virüsleri antijenik driftler sonucu toplumda epidemiler şeklinde enfeksiyon oluşturur (41). Influenza virüsleri tüm dünyada yaygın olarak bulunmakta ve değişen yoğunlukta yıllık salgınlara neden olmaktadır. Yıllık epidemilerin dünyada 3-5 milyon ağır vakaya ve 250.000-500.000 ölümlerle sonuçlanan vakaya neden olduğu tahmin edilmektedir (4.) Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) 1976-2007 yılları arasında erişkin yaş grubunda yıllık yaklaşık 23.483 Influenza ilişkili ölüm saptanmıştır. Bu sayı tüm yaş gruplarındaki ölümlerin %99.5'ini oluşturmaktadır. 65 yaş ve üzeri ölümlerin çoğu gelişmiş ülkelerde görülmekle beraber gelişmekte olan ülkelerde de ise çocuk ölümlerinin daha yüksek oranda olduğu tahmin edilmektedir (50). Epidemiler güney yarımkürede Mayıs - Eylül aylarında, kuzey yarımkürede ise Ekim - Nisan aylarında meydana gelir. Tropikal bölgelerde ise tüm yıl boyunca görülebilir (41). Influenza epidemileri tüm dünyaya hızla yayılarak hastane ve diğer sağlık harcamaları ve üretim gücü kaybı (okul ve iş gücü kaybı) ile önemli bir ekonomik kayba neden olmaktadır. ABD'de yıllık 17-167 milyon civarında bir ekonomik kayıptan bahsedilmektedir (50).

Tarihte İspanyol gribi veya domuz gribi (H1N1) olarak bilinen 1918-19 pandemi sinin ardından 1957 de Asya gribi (H2N2), 1968 de Hong-Kong gribi (H3N2), 1977’de (H1N1) ve 2009 (H1N1) pandemileri farklı boyutlarda görülmüştür. 1977’den sonra *Influenza A (H1N1)*, *Influenza A (H3N2)* alt tipleri ve Influenza B virüsleri dolaşımda yaygın bir şekilde bulunmaktadır. 2009 Mart’ta Kuzey Amerika’da yeni bir insan-domuz-kuş reassortant H1N1 virüsü meydana çıkmış ve pandemiye neden olmuştur. 2009 Temmuz’da domuz kökenli *Influenza A (H3N2)* ile pandemik *Influenza A 2009 (H1N1)* virüsünün etkileşimi sonucu, H3N2 varyant Influenza enfeksiyonu bildirilmiş fakat insandan insana geçişi henüz bilinmemektedir. 2013 bahar aylarında ise Çin’de yeni bir avian *Influenza A (H7N9)* virüsünün insan vakaları bildirilmiştir (50).

Epidemilerin meydana gelmesine neden olan etmenler şu şekilde sıralanabilir; Toplumdaki bağışıklık düzeyi, kronik hastalıkların varlığı, immün sistemin baskılanmasının etkisi, enfekte olanların yaşları, sigara içme alışkanlığı, gebeliğin duyarlılığa etkisi (41).

Influenza virüsleri ile ilgili epidemiyolojik verilerin eldesi sürveyans ağları ile sağlanmaktadır. DSÖ, Influenza virüslerinin takibi için 1952 yılında Küresel Influenza Sürveyans Ağı GISN’yi (Global Influenza Surveillance Network) kurmuştur. Ülkemizin de dahil olduğu 104 ülkeyi ve 134 Ulusal Influenza Referans Laboratuvarı’nı içeren GISN, her yıl dolaşımdaki Influenza virüs tipleri belirleyerek antijenik karakterleri incelemekte ve genetik değişimleri saptamaktadır. Böylece Influenza virüslerinin evrimi ve epidemiyolojisi hakkında dünya genelinde veriler elde edilerek bir sonraki yıl dolaşımda bulunma olasılığı en yüksek olan virüsler tespit edilir ve aşı çalışmaları yapılır (29).

### **2.7.1 Pandemik *Influenza A (2009 H1N1)* Virüs Epidemiyolojisi**

Yeni bir Influenza virüsünün, o virüse karşı bağışıklık geliştirmemiş olan çok sayıdaki insan topluluğunu etkilemesi “Influenza pandemisi” olarak adlandırılır. Influenza pandemileri dünya çapında birçok noktada aynı anda epidemilerin görülmesine ve çok sayıda insanda hastalıklara, aynı zamanda ölümlere neden olmaktadır. Yeni bir Influenza virüsünün yol açtığı epidemi küresel ulaşımdaki rahatlığın da etkisiyle tüm dünyayı hızla etkileyebilmektedir. 20. yüzyıl Influenza pandemileri (1918, 1957, 1968 pandemileri) çok sayıda ölüme ve büyük ekonomik

kayıplara neden olmuştur. Etken, genellikle hayvan kaynaklı bir Influenza virüsünün insan Influenza virüsü genleri ile kombinasyonu sonucu oluşmaktadır (41).

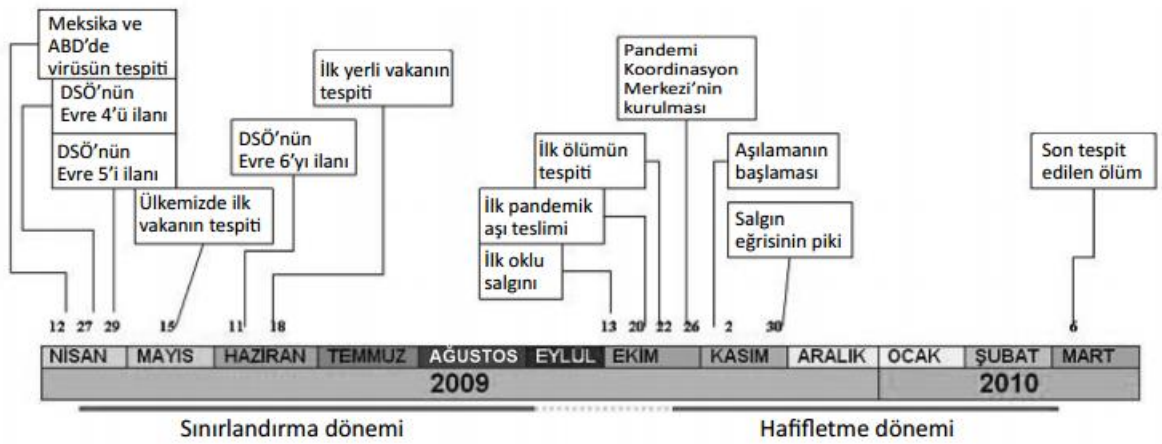
Pandeminin karakteristik özellikleri: çok hızlı yayılım göstermesi, aynı zamanlarda farklı bölgelerde salgınlar gerçekleştirmesi, yaz ayları dahil olmak üzere olağan grip mevsimi dışında da görülmesi, tüm yaş gruplarında yüksek atak hızları ile seyretmesi, özellikle sağlıklı genç erişkinlerde yüksek mortalite oranları ve hastalığın salgından hemen önce ve sonra çoklu olgu dalgaları şeklinde görülmesidir (51)

Nisan 2009 tarihinde, CDC iki olgudan alınmış örneklerde yeni bir *Influenza A (H1N1)* virüsü saptamış ve yeni belirlenen bu virüsün Meksika'da Mart 2009 tarihinden itibaren grip benzeri hastalık olgularında artışa yol açtığını belirlemiştir. Bu yeni virüsün domuzlarda, kanatlılarda ve insanlarda hastalık yapan grip virüslerindeki bazı segmentlerden oluştuğu belirlenmiştir. DSÖ 25 Nisan 2009 tarihinde dünyada pandeminin 4. düzeyde, 30 Nisan 2009 tarihinde ise 5. düzeyde olduğunu bildirmiş ve salgın hızla yayılmaya başlamıştır (52). DSÖ 11 Haziran 2009 tarihinde Influenza pandemi alarm düzeyini 6'ya yükseltmiştir (53). Pandemi alarm düzeyinin 6'ya yükseltilmesi, salgının artık her ülkede başlayabileceği anlamına gelmektedir (41). Pandemi, ilan edildiği tarihten sonra dünya üzerinde çok hızlı bir şekilde yayılmıştır. Ağustos 2009 tarihi sonu itibarıyla, hem kuzey hem de güney yarım kürede görülen Influenza vakalarının neredeyse tamamının etkeni *Influenza A 2009 (H1N1)* virüsü olduğu ortaya çıkmıştır. Pandemi 2009 yılı sonbahar aylarında kuzey yarım kürede, batıdan doğuya doğru hızla yayılım göstermiştir (46). Pandemi tüm dünyada 212'den fazla ülkede milyonlarca grip vakasına ve resmi rakamlara göre 15921 ölüme neden olmuştur (51).

Ülkemizde ilk pandemik grip vakası 17 Mayıs 2009 tarihinde kayıtlara geçmiştir. İlk yerli olgu ise 18 Haziran 2009 tarihinde bildirilmiştir. İlk, okul salgını ekim ayında gözlenmiştir. Bu olaydan on gün sonra bir sağlık çalışanında ilk ölüm vakası görülmüştür. Aralık ayından itibaren hafifleme dönemine giren pandemide son ölüm bildirimini 6 Mart 2010 tarihinde yapılmıştır (54). Türkiye genelinde yaklaşık 6.5 milyon kişi enfekte olmuş, 13.111 vaka hastanelere yatırılmış, 2721 vaka yoğun bakımda takip edilmiş, 1161 vaka ventilatöre bağlanmış ve 656 vaka ise hayatını kaybetmiştir. Hayatını kaybedenlerin %59.1'ini kronik hastalığı bulunanlar, %6.1'ini

gebeler veya lohusalar oluşturmuştur (51). Pandemi ve mevsimsel Influenza dönemlerinde hastaneye yatırılan ve kaybedilen vakaların yaş grupları incelendiğinde pandemi ve mevsimsel Influenza'nın farklı seyir gösterdiği anlaşılmaktadır. Örneğin mevsimsel Influenza enfeksiyonlarında hastaneye yatırılan vakaların %60'ı, kaybedilen vakaların ise %90'ı 65 yaş üzeri iken, pandemi süresince hastaneye yatırılan vakaların %90'ı, kaybedilenlerin ise %87'si 65 yaş altındadır (55).

DSÖ, 10 Ağustos 2010 tarihi itibarıyla pandeminin sona erdiğini ve dünya genelinde "post-pandemik dönem"e girildiği ilan etmiştir (56). Daha önceki H1N1 pandemilerinde yaşanan korku ve kaygılar ileri iletişim teknolojisi ve sağlık altyapısının etkileri ile aşılmış ve 2009 pandemisi bir buçuk yıl içinde bilinen mevsimsel grip seyrine geri dönmüştür (51).



Şekil 12. Pandemi dönemi zaman çizelgesi, 2009-2010 (54)

## 2.8. Klinik Belirti ve Bulgular

Virüsün yayılımı damlacık yoluyla olmaktadır. Hapşırık, öksürük yoluyla havaya dağılan damlacıklar genellikle havada uzun süre asılı kalmaz, aşağı iner ve üzerinde buldukları yüzeyleri kontamine eder. Virüs, bu yüzeylerde 8-12 saat boyunca canlı kalarak temasta bulunan kişilere bulaşabilmektedir. Ayrıca aerosol yoluyla bulaşın da olabileceği düşünülmektedir. Bulaştırıcılık hastanın semptomları ortaya çıkmadan 24 saat önce başlar ve ortalama yedi gün kadar sürer. Çocukların ve immün yetmezliği

olan kişilerin bulaştırıcılıkları 10 günden daha uzun sürebilir. Hastalığın inkübasyon süresi ise bir ila dört gün arasında değişmektedir (50).

Mevsimsel Influenza ateş, öksürük, boğaz ağrısı, burun akıntısı, baş ağrısı, miyalji, halsizlik ve titreme semptomları ile tanımlanabilir. Karın ağrısı, bulantı, kusma ve ishal nadiren görülen durumlardır.

Pandemik Influenza'nın semptom ve bulguları mevsimsel Influenza'nın semptom ve bulgularıyla benzer özellikler taşımaktadır. (53). Tipik klinik tablo ani başlayan ateş, baş ağrısı, kas ağrısı ve yorgunluk ile ifade edilir. Hemen ardından boğaz ağrısı, kuru öksürük ve burun akıntısı eşlik edebilir. Ancak klinik tablo ateşsiz, soğuk algınlığı benzeri bir solunum yolu enfeksiyonundan solunumsal belirtilerin görülmediği sistemik bir hastalık tablosuna kadar değişkenlik gösterebilir. Özellikle yaşlılarda tipik solunumsal belirtiler olmadan halsizlik, yorgunluk, iştahsızlık, baş dönmesi gibi genel belirtiler eşliğinde enfeksiyon görülebilir. Ateş genellikle 38-40°C arasında seyredir. Özellikle çocuklarda kusma ve ishal İnfluenza enfeksiyonu sırasında sık görülebilir. Komplike olmayan Influenza olgularında klinik 2-5 gün içinde düzelir. Fakat bazı durumlarda bir haftayı aşabilir veya haftalarca halsizlik, çabuk yorulma durumları görülebilir. Pnömoni en sık görülen İnfluenza komplikasyonudur. Bununla birlikte kas, santral sinir sistemi (SSS) ve kardiyak tutulumlar da görülebilir (50). İkincil enfeksiyon olarak bakteriyel pnömoni ve 2-16 yaş arası aspirin kullanımı olan çocuklarda reye sendromu görülebilir (7).

## **2.9 Tanı**

### **2.9.1 Tanı için Örnek Alınması**

Tanı için tercih edilen örnekler nazofarenks veya orofarenks sürüntüsü, nazal aspirat veya hem nazofarenks hem de orofarenks sürüntüsüdür. Entübe hastalardan endotrakeal aspirasyon veya bronkoalveoler lavaj ile elde edilecek örneklerin test edilmesi önerilmektedir (22). En iyi verim hastalığın başlangıcından itibaren 2-3 gün içerisinde, solunum yollarında viral atılımın en yüksek olduğu dönemde alınan örneklerle elde edilir. Örnek alımı antiviral tedavi başlangıcından önce yapılmalıdır (57). Sürüntü örnekleri fırçamsı uçlu dakron veya polyester eküvyonlarla alınabileceği gibi alüminyum ya da plastik tüpler içinde hazırlanan sentetik uçlu eküvyonlarla alınabileceği de önerilmektedir . Pamuk uçlu veya kalsiyum aljinat içeren eküvyonlar



kesinlikle önerilmemektedir (23). Laboratuvar tanısı için en doğru örnek, enfekte hücrelerle en iyi şekilde temas eden ve viral titresi en yüksek olandır. Toplanan klinik örnekler uygun transport mediumlar ile mümkün olan en kısa sürede laboratuvara ulaştırılmalıdır. Uygun transport içindeki örnekler 4°C’de 4 gün boyunca saklanabilir. Daha uzun süre saklanacak örnekler -70 °C’de muhafaza edilmelidir (58).

### 2.9.2 Tanı Yöntemleri

Solunum yolu viral enfeksiyonlarının klinik belirtileri bir çok farklı virüste ortak benzerlikler gösterebilir (59). Influenza virüs enfeksiyonlarının patognomik belirtileri olmadığından, sadece klinik özelliklere bakılarak kesin tanı koymak mümkün değildir (57). Bu nedenle klinik laboratuvar tanısı, doğru ve erken teşhis için zorunludur. İnfluenza virüs’lerin tespitinde kullanılabilen farklı duyarlılık ve özgüllüğe sahip testler mevcuttur. Yüksek duyarlılık ve özgüllükte testlerin kullanılması, uygun ilaçların ve antiviral tedavinin uygulanması ve komplikasyonların etkisinin azaltılması açısından önemlidir (59). Influenza virüslerin laboratuvar tanısı için kullanılan yöntemler; virüs izolasyonu, nükleik asit testleri , hızlı antijen saptama yöntemleri ve serolojik yöntemler olarak sıralanabilir.

Kullanılan bu laboratuvar tanı yöntemlerinin her birinin, kendine özgü avantaj ve dezavantajları vardır. Yaygın olarak kullanılan yöntem hücre kültürü tekniği ile “virüs izolasyonu” yöntemidir fakat; donanımlı laboratuvar ve deneyimli personel gerektirmesi, uzun zaman alması ve virüs izolasyon başarısın örnek alımı ile transport koşullarına bağlı olması dezavantajlarıdır (60). “Hızlı antijen saptama” yöntemi ile ise çok kısa sürede Influenza A ya da B tespiti yapılabilmektedir fakat; Influenza A’nın pozitif olması pandemik *Influenza 2009 (H1N1)*, mevsimsel Influenza ya da hayvan kaynaklı Influenza hakkında kesin sonuca ulaştırmaz (22). Her ne kadar “hızlı antijen saptama” yöntemiyle Influenza A alt tipi belirlenemezse de, pandemi döneminde dolaşımda olan Influenza A alt tipinin %99 oranında *Influenza A 2009 (H1N1)* lehine yorumlanması mümkündür (23). “Serolojik yöntemler” de Influenza virüs enfeksiyonlarının saptanması ve virüs tiplendirilmesinde kullanılan yöntemlerdir fakat; hastanın hem akut hem de iyileşme dönmindeki her iki serumuna da ihtiyaç olduğundan daha çok retrospektif çalışmalar için kullanılır (61). “Direkt immunfloresan” yöntemleri Influenza virüslerini yüksek duyarlılıklarda tespit edebilmektedir fakat; iyi floresan mikroskopu kullanımı ayrıca bir teknik uzmanlık gerektirmektedir (62). Klinik tanının

kısa sürede, hızlı ve güvenilir şekilde doğrulanması amacıyla, daha çok polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) temelli olan çeşitli “nükleik asit tanı teknikleri (NAT)” geliştirilmiştir. Bu tekniklerin yüksek duyarlığa sahip olmaları, hızlı sonuç vermeleri ve canlı virüse ihtiyaç olmaması kullanımlarının yaygınlaşmasında etkili olmuştur. Çeşitli NAT yöntemleri ile virüs tespitinin yanı sıra, tip ve alt tip ayrımı da yapılabilmektedir (60).

### 2.9.3 Polimerize Zincir Reaksiyonu (PCR)

Enfeksiyon hastalıklarının teşhisi ve epidemiyolojik çalışmaları, PCR tabanlı tekniklerin uygulanmaya başlamasıyla günümüzde büyük bir hız kazanmıştır. PCR, nükleik asitlerin tespitinde ve nükleik asitlerle ilgili çalışmalarda kullanılan oldukça duyarlı ve özgül bir moleküler yöntem olup spesifik DNA ve RNA bölgelerinin tespiti, DNA sekanslanma, kültürü yapılamayan mikroorganizmaların teşhisi ve mutasyonların tespiti gibi birçok amaçla kullanılmaktadır.

PCR, Deoksiribonükleik asit (DNA) veya ribo-nükleik asit (RNA) dizilerinin sayısal olarak çoğaltılması temeline dayanır (63). Bir PCR reaksiyonunda olması gereken bileşenler;

- Kalıp DNA
- Polimeraz enzimi,
- Kalıp DNA ile eşleşebilen iki oligonükleotit primeri
- Deoksiribonükleotit Trifosfat Karışımı (dNTP): dATP, dCTP, dGTP, dTTP
- MgCl<sub>2</sub>

DNA'nın PCR ile çoğaltılması; zaman, sıcaklık ve döngü sayısı düzenlenerek birbirini izleyen üç aşamada gerçekleşir. Bunlar; denatürasyon, bağlanma (annealing) ve uzama (extension) aşamalarıdır.

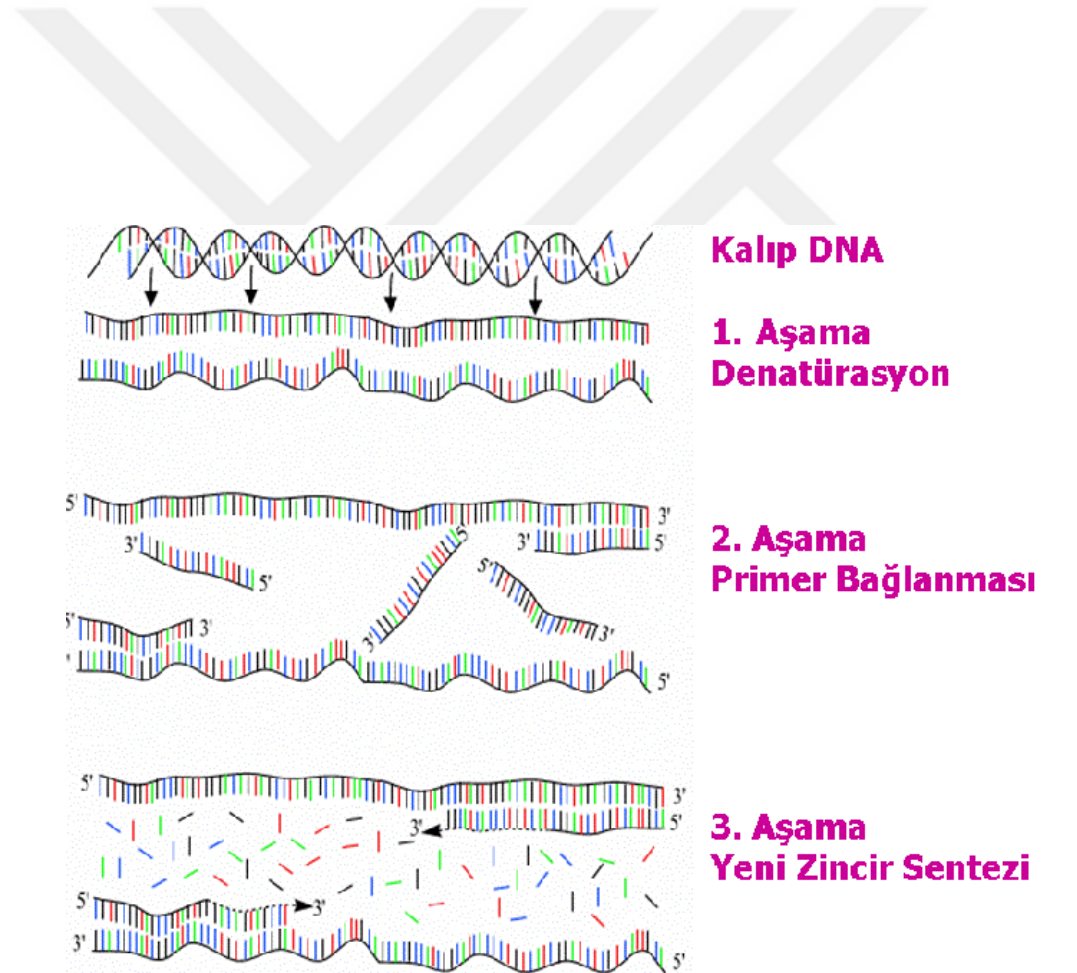
**Denatürasyon**, çift iplikli DNA'nın birkaç saniyede 94-96°C'de ısı ile tek zincirli DNA haline dönmesidir. .

**Bağlanma**, uygun sıcaklıkta, tek iplikli hale gelen DNA dizilimlerinin her birinin 3' uçlarındaki nükleotitlere primer bağlanmasıdır.

**Uzama** polimeraz enzimi yardımıyla tek zincirli DNA kalıplarına bağlanan primerlerin 5'→3' yönünde uzatılması ve çift iplikli DNA oluşturulmasıdır.

Bu üç aşama bir PCR döngüsünü oluşturur (Şekil 13) ve bir PCR döngüsü ortalama 30-45 döngü arasında olmaktadır. PCR, thermal cycler adı verilen ve örneğin programlanan ısı derecelerinde, istenen sürelerde tutmaya yarayan cihazlarda gerçekleşir (64,65).

CDC'nin tanımına göre, kanıtlanmış *Influenza A 2009 (H1N1)* virüsü enfeksiyonu, Influenza benzeri hastalığı olan bir kişide real-time revers transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu (RRT-PCR) veya virüs kültürü ile *Influenza A 2009 (H1N1)* virüsünün saptanması şeklinde ifade edilir (53). Real Time PCR ve RRT-PCR yöntemleri Influenza A virüslerin tanı, tespit ve sürvelansında, yüksek duyarlılıkları nedeniyle yükselen bir artışla kullanılan testlerdir (61).



Şekil 13. Polimeraz zincir reaksiyonunun aşamaları (64)

### 2.9.3.1 Real-Time PCR

PCR artışını görünür hale getiren ve monitorize edebilen floresan işaretli prop ve boyaların kullanıldığı, floresanın olusan DNA ile doğru orantılı olarak arttığı, yani sonuçların çalışma anında görülebildiği bir yöntemdir (64,66). Real time PCR'da ürünlerin analizi reaksiyon sırasında yapılabildiği için agaroz jel elektroforezi, DNA bantlarının mor ötesi ışık altında görüntülenmesi gibi işlemlerin uygulanmasına da ihtiyaç kalmamaktadır. Real time PCR ürünlerinin analizinde, diziye özgün olmayan floresan boyalardan, (Syber Green, Etidyum Bromür) ya da diziye özgün proplardan (Scorpion primerleri, Hybridizasyon propları, FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), Tagman Prop) yararlanılmaktadır. Real time PCR sayesinde DNA ve RNA örnekleri kalitatif ve kantitatif olarak kısa sürede analiz edilebilmekte, çok sayıda örnekle son derece düşük kontaminasyon riskiyle güvenle çalışılabilmektedir. Çok hızlı olmasının yanı sıra duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek bir yöntemdir. Özellikle tagman propları gibi diziye özgül olan proplar kullanıldığında duyarlılık ve özgüllük de artmaktadır (64).

Influenza virüslerin tanısında ve sürveyansında PCR ürünlerinin integral bölgesini hibridize etmek üzere dizayn edilmiş ve bu nedenle PCR reaksiyonunun yüksek duyarlılık ve özgüllükte olmasını sağlayan tagman prop temelli bir çok test kullanılmaktadır (61).

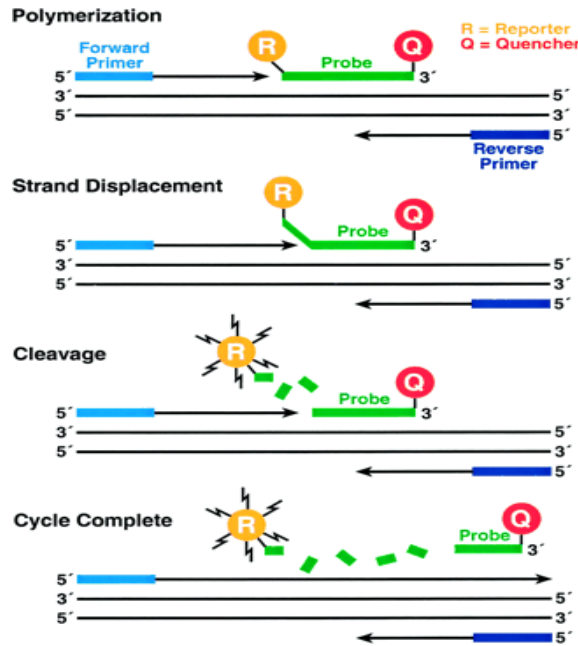
### 2.9.3.2 Tagman Prop

5' ve 3' uçlarından florokrom maddelerle işaretli tagman propları (dual labelled probe) kullanılan sistemde probun 5' ucunda raportör florokrom, 3' ucunda ise baskılayıcı florokrom bulunur. Prop, tek sarmal hale getirilen hedef bölge üzerinde, primerlerin bağlanma bölgesinin arasında kalan yere bağlanır ve prop ile hedef bölge arasındaki hibridizasyon devam ettiği sürece 5'ucundaki raportör florokrom maddenin sinyal oluşturması, 3' ucundaki baskılayıcı florokrom madde tarafından engellenir. Primerlerin hedef nükleik asite bağlanmasının ardından başlatılan primer uzaması probun bağlandığı noktaya geldiğinde, sentezin devam edebilmesi için taq DNA polimeraz enzimi 5'-3' ekzonükleaz aktivitesini kullanarak probu 5' ucundan itibaren yıkmaya başlar ve raportör florokrom serbest hale geçer, böylece sinyal oluşturur. Her döngüde çoğaltma sonucu ürün arttıkça, floresan miktarında da artış meydana gelir. Bu yöntemde ışımaya, probun DNA'ya bağlanmasıyla değil, probun kırılarak ayrılmasını

sağlayan 5'-3' ekzonükleaz aktivitesi ile oluşur. Bundan dolayı bu tür proplara hidroliz propları adı verilir (Şekil 14) (67).

### 2.9.3.3 Reverse-Transkriptaz PCR (RT-PCR)

Revers-Transkriptaz PCR teknikleri ile, spesifik viral RNA genom nükleik asit dizileri duyarlı bir şekilde tespit edilip İnfluenza virüs enfeksiyonu tanısı hızlı ve doğru bir şekilde konulabilmektedir. 2009 pandemisinin gündeme gelmesiyle birlikte real-time PCR metotları tanının hızlı bir şekilde konulabilmesi için primer test yöntemi haline gelmiştir. CDC salgınla birlikte yeni *İnfluenza A 2009 (H1N1)* virüs'ünün matriks genini hedefleyen ve başarılı bir şekilde tespit edebilen tek basamaklı bir RRT-PCR protokolü dizayn etmiştir (61). RRT-PCR ile RNA moleküllerinden, revers transkriptaz enzimi yardımıyla komplementer DNA (cDNA) sentezi gerçekleştirilir. cDNA sentez reaksiyonlarında random-hegzamer primerler, oligo (dT) primerler veya gen spesifik primerler (GSP) ve sentez için Retrovirüs'lerden elde revers transkriptaz enzimleri kullanılır (68). RRT PCR tek basamaklı ya da iki basamaklı olarak dizayn edilebilir. Tek basamaklı RRT PCR reaksiyonunda revers transkripsiyon ve PCR aynı koşullar altında, PCR primerleri, oligo (DT) veya random primerleri birlikte kombine edilir. İki aşamalı RRT PCR reaksiyonunda ise önce reverse transkripsiyon aşaması gerçekleştirilir. Bunu, arkasından PCR aşaması takip eder (61).



Şekil 14. Tagman Prop çalışma prensibi

## 2.10 Tedavi

Influenza tedavisinde nöraminidaz inhibitörleri (zanamivir, oseltamivir ve peramivir) ve M2 blokörleri amantanlar (amantadin ve rimantadin) olmak üzere iki grup antiviral mevcuttur. Nöraminidaz inhibitörleri hem Influenza A hem de Influenza B'ye, amantanlar ise sadece Influenza A'ya karşı etkilidirler. Hastaneye yatış gerektiren hastalık, ilerleyici, ağır veya komplike hastalık varlığında veya komplikasyon gelişme riski yüksek olan kişilerde 48 saat içinde tedavinin başlanması önerilir (69). Ancak 65 yaş altında yüksek risk grubunda olmayan kişilerde özellikle de hastalığın başlamasının üzerinden 48 saatten fazla geçtiyse test veya tedavi başlanması önerilmemektedir. İlk 48 saat içinde başvurdularsa tablonun süresini kısaltmak için tedavi başlanabilir. Antiviral tedavi için ilk tercih nöraminidaz inhibitörleridir (oseltamivir veya zanamivir). Eğer hasta oseltamivir veya zanamiviri tolere edemiyorsa intravenöz peramivir kullanılması önerilir ancak henüz ülkemizde bulunmamaktadır (70).

Amantadin ve Rimantadin İnfluenza A virüs'lerinin M2 proteininin fonksiyonunu bozarak antiviral etki gösterirler. Bu antiviraller Influenza A virüslerinin M2 kanalına bağlanarak iyon kanalını oluşturan bölgenin yapısını, dolayısıyla işlevini bozarlar (71). Amantadin ve rimantadin 1966'da FDA (Food and Drug Administration) 'dan onay almış olmasına rağmen sadece Influenza A virüslerine karşı etkin olmaları, hızla direnç gelişimi göstermeleri ve istenmeyen yan etkilerinden dolayı geniş kullanım alanı bulamamışlardır. 2005-2006 yıllarında CDC'nin yaptığı bir çalışmayla ABD'de dolaşımdaki İnfluenza A virüs'lerinin %91'inin amantadin ve rimantadine dirençli olduğu saptanmış ve 2005-2006 sezonunda bu antivirallerin profilaksi ya da tedavi amaçla kullanılmasının önerilmediğini bildirmiştir (72).

Pandemik *Influenza A 2009 (H1N1)* tedavisinde M2 inhibitörleri kullanılmamaktadır. Aralarında DSÖ ve CDC'nin de bulunduğu otoriteler, pandemik *Influenza A 2009 (H1N1)* tedavisinde nöraminidaz inhibitörleri olan oseltamivir ya da zanamivir kullanılmasını önermektedir (53).

### 2.10.1 Nöraminidaz İnhibitörleri (Zanamivir ve Oseltamivir)

Birçok Influenza antiviral ajanının geliştirilmesinde NA hedef molekül olmuştur. İlaç dizayn çalışmalarında Grup 2 NA'ların kararlı enzim aktif bölgeleri

mükemmel bir hedeftir. İlk bilinen inhibitör, bir geçiş durumu analogu olan 2-deoksi-2,3-dehidro-N-asetilnöromik asittir (DANA). 1970'lerde yapılan invitro çalışmalarda DANA'nın trifluoroasetil türevinin potansiyel bir nöraminidaz inhibitörü olduğu düşünülmüş, hücre kültürlerinde başarı sağlansa da hayvan modellerine uygulamada aynı başarı sağlanamamıştır. Sonraki çalışmalarda sialik asitin aktif bölgeye nasıl konumlandığının bilinmesi ile DANA'ya 4-guanidino grubu eklenmiş, molekülün bağlanma özelliği geliştirilmiş ve siyalik asit analogu olan bu bileşiğe zanamivir adı verilmiştir (37) .

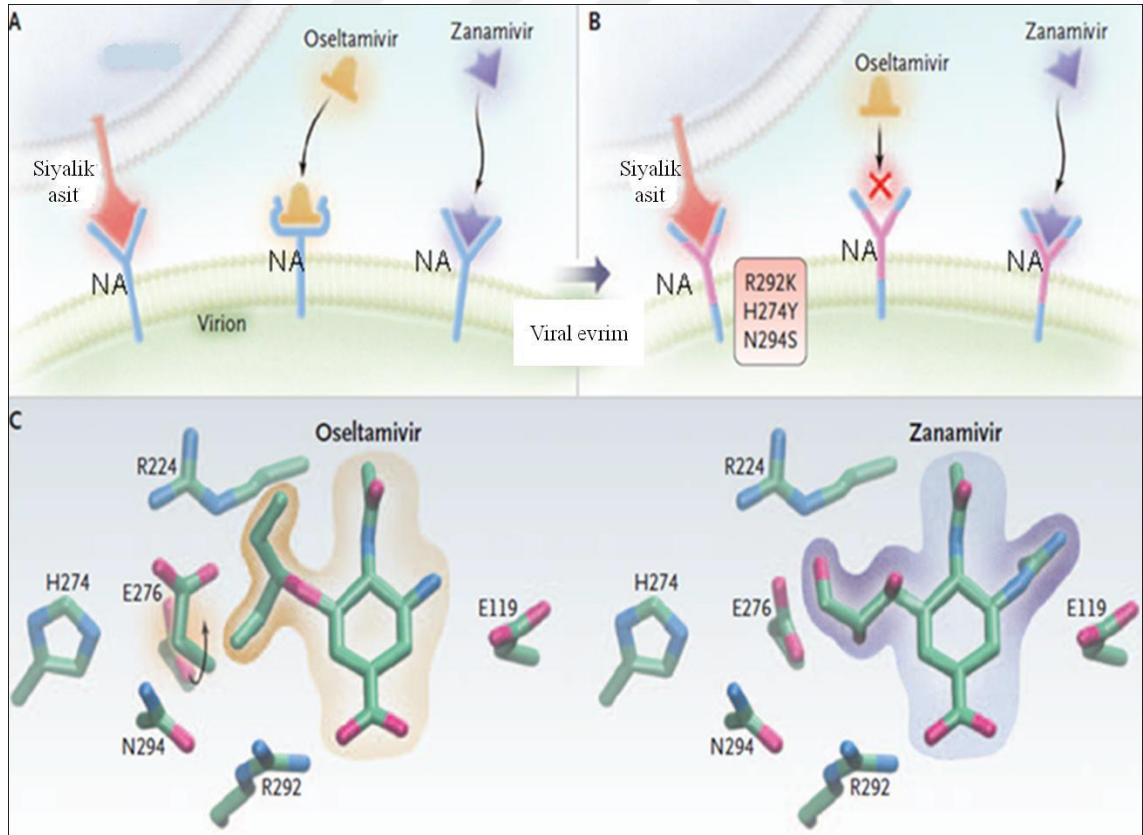
Zanamivir 1999 yılında kullanım lisansı alan ve ilk geliştirilen nöraminidaz inhibitörüdür (73). Oral yoldan inhalasyon yolu ile kullanımı olan bir antiviraldir (74). Zanamivir inhalasyonu bronkospazm riskini artırdığından astım veya KOAH (Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı) gibi reaktif hava yolu hastalığı olanlarda ve ciddi kalp hastalığı olanlarda kullanılmamalıdır (53).

Zanamivirin oral yolla uygulandığında biyoyararlılık oranının çok düşük olması, oral yolla uygulanabilir antiviral arayışlarını gündeme getirmiştir. Bilim adamları yine NA molekülünün aktif bölgesinin kristal yapısını kullanarak sentezi daha kolay ve biyoyararlanımı daha yüksek bir molekül araştırmış ve bulmuştur. Bu molekül, etil ester pro-drug şekli olan oseltamivir fosfattır (32). Oral yolla alınan oseltamivir fosfatın %80'inin sistemik olarak emildiği, emilen oseltamivir fosfatın karaciğer esterazları tarafından aktif ilaç oseltamivir karboksilata dönüştürüldüğü saptanmıştır (75).

Oseltamivir, zanamivirin aksine ağızdan kullanıldığında biyoyararlanımı yüksek olan bir ön ilaçtır. Şubat 2011 itibarıyla yüzden fazla ülkede onay almış ve piyasaya girdiğinden beri 83 milyondan fazla hastada kullanılmıştır. DSÖ, ciddi ya da ilerleyici Influenza enfeksiyonu görülen tüm hastalara oseltamivir tedavisini önermekte, immunsupresif hastalarda klinik yanıtla ilgili olarak daha yüksek doz ve daha uzun süreli tedaviyi tavsiye etmektedir. Oseltamivir genelde az yan etkisi olan bir ilaç olup en çok görülen yan etki mide bağırsak sistemi ile ilgilidir (76). Oseltamivir ile erken tedaviye başlandığında, yatan hastalarda önemli ölçüde sağkalım sağlandığı ve *Influenza 2009 (H1N1)* virüsü ile enfekte olan ağır hastalarda sağkalımı önemli ölçüde etkilediği gösterilmiştir (77,78).

### 2.10.2 Nöraminidaz İnhibitörlerinde Direnç

Dirençli mutantların ortaya çıkışında, iki mekanizma rol oynamaktadır. Birinci mekanizma; NA geninin aktif enzim bölgesinde bulunan aminoasitlerde değişime yol açan mutasyonlardır. Bu mutasyon NA'nın aktif bölgesi ile ilaç arasındaki etkileşimin bozulmasına neden olarak ilacın inhibitör etkisini azaltır (79). Oseltamivirin NA molekülüne bağlanması sırasında enzimin aktif bölgesinde morfolojik bir değişiklik oluşurken, zanamivirin bağlanması sırasında böyle bir morfolojik değişiklik gözlenmez. Bundan dolayı, NA molekülünde meydana gelen ve oseltamivir direnci oluşturan bazı mutasyonlar zanamivir direncinin görülmesine neden olmazlar. Moleküler çalışmalar göstermektedir ki; NA molekülünde oseltamivir yan zincirini içine alan kovuğun oluşması için E276 amino asidinin rotasyon yaparak R224 aminoasiti ile bağ kurması gerekir. R292K, N294S, ve H275Y mutasyonları E276 amino asidinin rotasyonunu engelleyerek kovuk oluşmasını engeller ve böylece oseltamivir NA'ya bağlanamaz. Bu mutasyonlar zanamivir bağlanmasını engellemezler (29).



Şekil 15. Oseltamivir direnç mekanizması (29).



Nöraminidazın aktif bölgesinde meydana gelen şekil değişikliği ile oseltamivirin bağlanması için bir kovuk oluşur, zanamivir bağlanması için herhangi bir morfolojik değişikliğe gerek yoktur (A). Meydana gelebilecek mutasyonlardan herhangi biri aktif bölgedeki morfolojik değişikliğin oluşumuna engel olarak oseltamivirin bağlanmasına da engel olur. Fakat; oseltamivir direnci meydana gelen virüs konak hücredeki sialik asit reseptörüne ve zanamivire bağlanabilme özelliğini devam ettirir (B). E276 amino asiti rotasyon yaparak R224 amino asiti ile bağ kurar ve kovuk oluşur. R292K, N294S, ve H274Y mutasyonları amino asitler arasında meydana gelen rotasyonunu engeller. Kovuk oluşumunun engellenmesi sonucu oseltamivir bağlanamaz ve virüs oseltamivire karşı direnç kazanır (C) (29).

Dirence neden olan ikinci mekanizma ise; HA'nın, sialik asit bağlama bölgesi çevresinde mutasyonların meydana gelmesi ile oluşur. HA'deki değişikliklerin ilaç duyarlılığının azalmasına etkisi tam olarak bilinmemektedir. Fakat HA ile sialik asit reseptörü arasındaki etkileşimin değişmesinden meydana gelen reseptör afinitesindeki azalmanın, ilaç direncine neden olduğu düşünülmektedir (79).

DSÖ, Influenza A virüs enfeksiyonlarının tedavisinde oseltamivir kullanımını tavsiye etmektedir. Ancak, 2007-2009 yılları arasında, mevsimsel *Influenza A (H1N1)* virüslerinin tümünde H275Y mutasyonunun neden olduğu oseltamivir direnç gelişimi gözlenmiştir. 2009 yılında dirençli mevsimsel *Influenza A (H1N1)* virüslerinin yerini, oseltamivire genellikle duyarlı olan ve tüm dünyada yaklaşık %1 oranında oseltamivir direnci görülen pandemik *Influenza A 2009 (H1N1)* virüsü almıştır. Ancak 2011 yılında H275Y mutasyonu dikkat çekici bir oranda artmıştır (80). Oseltamivir dirençli pandemik *Influenza A 2009 (H1N1)* virüs'ünün çeşitli ülkelerde izole edilmiş olması tüm dünyada sağlık hizmeti sağlayıcıları arasında endişeye sebep olmuştur (81). H275Y mutasyonu, NA (N1) proteininin 275. pozisyonunda bulunan Histidin amino asitinin tyrosine dönüşümü (H275Y) olarak ifade edilir ve oseltamivir direncinin genetik işaretidir (61,82). Oseltamivir dirençli virüslerin izlenmesi ve takibi direnç oranlarında gözlenebilecek ani artışların önüne geçilebilmesi açısından önemlidir (82). 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 (29).

### 2.10.3 Antiviral Direncin Saptanması

Influenza virüslerde antiviral direnç, NA enzim inhibisyon yöntemi ve moleküler saptama teknikleri (Pyrosekans ve RRT-PCR) ile saptanabilmektedir. Antiviral duyarlılık testleri klinik laboratuvarlarda rutin olarak kullanılan yöntemler değildir, daha çok epidemiyolojik çalışmalar için kullanılırlar.

NA enzim inhibisyon yöntemi; hücre kültürleri kullanılarak uygulanan geleneksel bir yöntemdir (83). Virüs hücre kültürlerinde antiviralin çeşitli konsantrasyonları kullanılarak çoğaltılır ve antiviral ilaçlara karşı oluşan direncin virüsün çoğalması üzerine etkisi araştırılır. Antivirale karşı dirençli olduğu saptanan virüslerin genetik analizi yapılır ve dirence neden olan mutasyon saptanır (29). Bu yöntemle virüsün genetik temelini bilmesi ile ilaç direncine neden olan mutasyonları hızlı bir şekilde saptayabilen moleküler saptama teknikleri geliştirilmiştir ve böylece antiviral direnç saptanabilmektedir.

Moleküler teknikler; NA enzim inhibisyon tekniğine göre klinik örnekler direkt uygulanabilmesi ve cansız virüsler kullanılabilmesi gibi avantajlara sahiptir. Pyrosekans yöntemi son yıllarda ortaya çıkan, antiviral dirence neden olan mutasyonları başarılı bir şekilde saptayabilen sekanslama yöntemidir. Bu yöntem CDC tarafından klinik örneklerden direk olarak antiviral direnç saptamak, ya da yeni veya daha önce varolan mutasyonları saptayabilmek için NA enzim inhibisyon yöntemi ile kombine olarak kullanılan bir yöntemdir. Adamantan direncine neden olan mutasyonları saptayabilmede başarılı iken, NA inhibitörlerine tam olarak karakterize edilememiştir. Spesifik materyaller ve özel eğitim gerektirdiğinden klinik laboratuvarlar için uygun bir yöntem değildir (83). RRT-PCR teknikleri hızlı olmaları ve yüksek duyarlılıkları ile sekans yöntemine spesifik bir alternatif oluşturmaktadırlar (59). Çeşitli çalışmalar göstermektedir ki RRT-PCR tekniği, oseltamivir direncine neden olan H275Y mutasyonunu saptama yöntemi olarak ifade edilmiş ve oseltamivir dirençli *Influenza A 2009 (H1N1)* virüsleri bu yöntemle analiz edilmiştir (83).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1 Tez Çalışmasında Kullanılan Örnekler

Bu tez çalışmasında 2009-2011 yılları arasında Yeditepe Üniversitesi Hastanesi'ne başvuran hastaların Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen klinik örneklerinden saptanan *Influenza A 2009 (H1N1)* virüs RNA'ları kullanılmıştır. Klinik örneklerden rutin laboratuvar çalışması sırasında Roche marka Magna Pure Compact Nükleik Asit izolasyon cihazında, "Roche Magna Pure Compact Nucleic Acid isolation Kit I" ile nükleik asit izole edilip, Light Cycler 2.0 Real-Time PCR cihazında, "Roche Real-Time Ready Influenza A/H1N1 Detection Set" kullanılarak hedefe yönelik PCR çalışması yapılmıştır. Virüs RNA'ları daha sonraki çalışmalarda kullanılabilme üzere -80°C'de saklanmıştır. Klinik örnekler, burun sürüntüsü ya da nazofarengeal aspirat örnekleridir. Burun sürüntü örnekleri Copan marka "UTM™ Viral Transport Media" ile, nazofarengeal aspirat örnekleri ise steril tüpler ile laboratuvara transfer edilmiştir. Tez çalışmasında toplam 131 adet *Influenza A 2009 H1N1* virüsü kullanılmıştır.

#### 3.2 Kullanılan Reaktif ve Ticari Kitler

- Real Time Ready Virus Master Kit; Roche
- Reverse ve Forward primerler, Alpha DNA
- Taqman MGB propları, Applied Biosystems
- Syber Gold
- 6x Loading Dye, Fermentas
- DNA Ladder 100 bp, Invitrogen

#### 3.3 Kullanılan Ekipmanlar

- LightCycler® 480 Sistem, Roche
- LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, Roche
- Allegra® X-22 santrifüj, Beckman Coulter
- Microfuge 16, Beckman Coulter

- Mikropipet 1000, 200, 100, 10, 2.5 µl, Thermo E. C. Finnpiquette
- Agaroj jel görüntüleme cihazı, Biorad Chemi Doc (for PC), Biorad® Gel Imager
- Biyolojik Koruma Kabini, Thermo E. C. Holten LaminAir

### 3.4 Kullanılan Kimyasallar

- EDTA; Scharlau AC0940
- Tris; Ultra Pure MP Biomedicals Inc.
- Borik Asit; Scharlau AC0577

### 3.5 Kullanılan Yöntemler

Bu tez çalışmasında *Influenza A 2009 (H1N1)* virüslerinde, NA geninde meydana gelen ve oseltamivir direncine neden olan H275Y mutasyonu, WHO “Real-Time RT PCR Allelic Discrimination Analysis for Detection of the Substitution at Amino Acid 275 in the Neuraminidase (NA) of A(H1N1)pdm09 Influenza Viruses” isimli kaynaktan referans Real-Time RT PCR (Tagman prop) yöntemi kullanılarak araştırılmıştır (84).

#### 3.5.1 Primer ve propların korfirmasyonu

WHO “Real-Time RT PCR “Allelic Discrimination Analysis for Detection of the Substitution at Amino Acid 275 in the Neuraminidase (NA) of A(H1N1)pdm09 Influenza Viruses” isimli kaynakta kullanılan primer ve proplar, yayında referans suş olarak verilen *A/Denmark/528/2009* Influenza virüsünün (85) NA gen bölgesi sekans dizisinin NCBI (National Center for Biotechnology Information)’dan bulunması ile konfirme edilmiştir.

**Tablo 3.** Real-Time RT PCR çalışmasında kullanılan primer ve prop dizileri

H1N1 NA Forward Primer	5' ATGTGCATGTGTAATGGTTCTTGCTTTAC 3'
H1N1 NA ReversePrimer	3' ACACATGTGATTTCACTAGAATCAGG 5'
FAM-274Y (Direnc mutasyonu)	(FAM)TACTATGAGGAAT (MGB)
VIC- H274	(VIC) CACTATGAGGAAT (MGB)

NCBI Resources How To

**Influenza Virus Resource**  
Information, Search and Analysis

Influenza Virus Genome Set

Flu home Database Genome Set Alignment Tree BLAST Annotation Submission FTP Virus resources

Download Protein (FASTA) Customize FASTA define

8 sequences (1 full set)

Accession	Length	Host	Segment	Subtype	Country	Region	Date	Virus <sup>1</sup> name	Mutations
✓ CY043347	2280	Human	1 (PB2)	H1N1	Denmark	N	2009/06/09	Influenza A virus (A/Denmark/528/2009(H1N1))	
✓ CY043348	2298	Human	2 (PB1)	H1N1	Denmark	N	2009/06/09	Influenza A virus (A/Denmark/528/2009(H1N1))	
✓ CY043349	2151	Human	3 (PA)	H1N1	Denmark	N	2009/06/09	Influenza A virus (A/Denmark/528/2009(H1N1))	
✓ CY043350	1733	Human	4 (HA)	H1N1	Denmark	N	2009/06/09	Influenza A virus (A/Denmark/528/2009(H1N1))	
✓ CY043351	1520	Human	5 (NP)	H1N1	Denmark	N	2009/06/09	Influenza A virus (A/Denmark/528/2009(H1N1))	
✓ CY043352	1424	Human	6 (NA)	H1N1	Denmark	N	2009/06/09	Influenza A virus (A/Denmark/528/2009(H1N1))	H274Y
✓ CY043353	986	Human	7 (MP)	H1N1	Denmark	N	2009/06/09	Influenza A virus (A/Denmark/528/2009(H1N1))	S31N
✓ CY043354	838	Human	8 (NS)	H1N1	Denmark	N	2009/06/09	Influenza A virus (A/Denmark/528/2009(H1N1))	

Şekil 16. NCBI veri tabanı kullanılarak referans virüsün NA gen bölgesinin bulunması

```

ATGAATCCAAACCAAAAGATAATAACCATTGGTTCGGTCTGTATGACAATTGGAATGGCTAACTTAATAT
TACAAATTGGAAACATAATCTCAATATGGATTAGCCACTCAATTCAACTGGGAAATCAAATCAGATTGA
AACATGCAATCAAAGCGTCATTACTTATGAAAACAACACTTGGGTAAATCAGACATATGTTAACATCAGC
AACACCAACTTTGCTGCTGGACAGTCAGTGGTTTCCGTGAAATTAGCGGGCAATTCCTCTCTGCCCCTG
TTAGTGGATGGCTATATACAGTAAAGACAACAGTATAAGAATCGGTTCCAAGGGGGATGTTGTTGTCAT
AAGGGAACCATTATATCATGCTCCCCCTTGGAAATGCAGAACCCTTCTTCTTGACTCAAGGGGCCCTTGCTA
AATGACAAACATTCCAATGGAACCATTAAAGACAGGAGCCCATATCGAACCTAATGAGCTGTCCTATTG
GTGAAGTTCCTCTCCATACAACCTCAAGATTTGAGTCAGTCGCTTGGTCAGCAAGTGCTTGTCTATGATGG
CATCAATTGGCTAAACAATTGGAATTTCTGGCCCAGACAATGGGGCAGTGGCTGTGTTAAAGTACAACGGC
ATAATAACAGACACTATCAAGAGTTGGAGAAACAATATATTGAGAACAACAAGAGTCTGAATGTGCATGTG
TAAATGGTTCTTGCTTTACTGTAATGACCGATGGACCAAGTGTGACAGGCCTCATAAAGATCTTCAG
AATAGAAAAGGGAAAGATAGTCAAATCAGTCGAAATGAATGCCCTAATATTAAGTATGAGGAAATGCTCC
TGTTATCCTGATTCTAGTGAATCACATGTGTGTGCAGGGATAACTGGCATGGCTCGAATCGACCGTGGG
TGCTTTTCAACCAGAATCTGGAATATCAGATAGGATACATATGCAGTGGGATTTTCGGAGACAATCCACG
CCCTAATGATAAGACAGGCAGTTGTGGTCCAGTATCGTCTAATGGAGCAAAATGGAGTAAAAGGATTTTCA
TTCAAATACGGCAATGGTGTGGATAGGGAGAATAAAAGCATTAGTCAAGAAACGGTTTTGAGATGA
TTTGGGATCCGAACGGATGGACTGGGACAGACAATAACTTCTCAATAAAGCAAGATATCGTAGGAATAAA
TGAGTGGTCCAGATATAGCGGGAGTTTTGTTCCAGCATCCAGAATAACAGGGCTGGATGTTATAAGACCT
TGCTTCTGGGTTGAACTAATCAGAGGGCGACCCAAAGAGAACAACAATCTGGACTAGCGGGAGCAGCATAT
CCTTTTGTGGTGTAAACAGTGACACTGTGGGTTGGTCTTGGCCAGACGGTGCTGAGTTGCCATTTACCAT
TGACAAGTAATTTGTTCAAAAAAC

```

Şekil 17. Influenza A virüs (A/Denmark/528/2009 (H1N1)) segment 6 (NA) sekans dizisi (Accession no: CY043352) Sarı işaretli dizi Forward primer, yeşil işaretli dizi reverse primer, pembe işaretli dizi ise FAM boyası ile işaretli (mutasyon bölgesi) prop dizisi

### 3.5.2 Primer ve propların hazırlanması

Alpha DNA tarafından seztezlenen primerler firma protokolüne uygun olarak hazırlandı. Liyofilize olarak gelen primerlerden forward primer, 610 µl; reverse primer ise 599 µl DNA, RNA içermeyen steril moleküler su ile sulandırılmış ve 100 µM stok elde edilmiştir. “RealTime Ready RNA Virus Master Kit” protolüne uygun olarak

primerlerin son konsantrasyonu 0.5µM olması için stok solüsyon moleküler su ile 1/10 oranında sulandırılmış ve 10µM'lık ara stoklar elde edilmiştir.

Applied Biosystems tarafından sentezlenen 50 nmol konsantrasyonunda 100 µM stok solüsyon şeklindeki proplar yine kullanılan kitin protokolüne uygun olarak son konsantrasyon 0.5µM olması için moleküler su ile 1/10 oranında sulandırılmış ve 10µM'lık ara stoklar elde edilmiştir.

### 3.5.3 Real-Time RT PCR aşaması

H275Y (N1 numaralandırma sistemine göre) mutasyonu bir tek nokta mutasyonudur. *Influenza A 2009 (H1N1)* virüs'ünün NA geninin 823. pozisyonundaki "C" (sitozin) nükleotidinin "T" (Timin) nükleotidine farklılaşmasıyla meydana gelir. (85) NA geninde meydana gelen bu tek nokta mutasyonu ile proteinin 275. pozisyonundaki "Histidin" amino asiti yerine "Tirozin" aminoasiti kodlanmış olur (86).

*Influenza A 2009 (H1N1)* virüslerinin büyük çoğunluğu daha önceki çalışmalarda oseltamivire duyarlı bulunduğu için çalışma iki aşamalı olarak planlanmıştır.

İlk aşamada tüm örneklerin duyarlılık açısından (VIC)CACTATGAGGAAT (MGB) prop dizisi kullanılarak reverse transkripsiyon basamağı ile birlikte tek aşamalı real-time RT PCR ile taranmasına karar verilmiştir. Mutasyon görülmeyen (ilaç direnci olmayan) tüm *Influenza A 2009 (H1N1)* virüslerinde PCR amplifikasyonu gerçekleşeceği düşünülmüştür. İkinci aşamada ise ilk çalışmada amplifikasyon saptanmayan örneklerin seçilip bu örneklerin H275Y mutasyonu açısından (FAM)TACTATGAGGAAT(MGB) prop dizisi kullanılarak yine reverse transkripsiyon basamağı ile birlikte tek aşamalı real-time RT PCR ile taranmasına karar verilmiştir. Bu amaçla, her iki PCR çalışmasında viral RNA'nın yüksek duyarlılık ve özgüllükte tek basamaklı real-time RT PCR ile hızlı bir şekilde saptanması için dizayn edilmiş olan Roche marka "RealTime Ready RNA Virus Master Kit" kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılacak olan tüm *Influenza A 2009 (H1N1)* virüslerinin nükleik asitlerinin DNA, RNA ve protein konsantrasyonu açısından spektrofotometrik olarak kalite ölçümü yapılması planlanmış fakat deneyin farklı bir merkezde çalışılacak olması nedeniyle ve uzun zaman saklanmış virüs RNA'larının kalitesinin dondurma-çözdürme'den dolayı daha fazla etkilenmesini önlemek amacıyla spektrofotometrik ölçüm yapılamamış ve RNA'lar direkt olarak PCR çalışmasına alınmıştır.

PCR hazırlığı sırasında aşağıdaki aşamalar izlenmiştir.

- Tüm reaktifler kısaca vortekslenip kapakları açılmadan önce santrifüj edilmiştir.
- Çalışılacak örnek sayısına göre PCR karışımı hazırlanmış ve plate kuyucuklarına pipetlenmiştir.
- Kuyucuklara çalışılacak örnek RNA'ları pipetlenmiş ve plate üzerine film, hava almayacak şekilde kapatılmıştır.
- Plate santrifüj edildikten sonra cihaza yüklenmiş ve program başlatılmıştır.
- Duyarlılık analizi için kullanılan VIC-H274 probu ile uygulanan PCR çalışmasının sonucu 533-580 filtre kombinasyonu; direnç analizi için kullanılan FAM-274Y probu ile uygulanan PCR çalışması ise 465-510 filtre kombinasyonu ile analiz edilmiştir.

**Tablo 4.** Real time RT PCR miks bileşenleri

<b>Bileşen</b>	<b>Miktar</b>
Enzyme Blend	0.4 µl
Reaction Buffer	4.0 µl
Forward Primer (10 µM)	1.0 µl
Reverse Primer (10 µM)	1.0 µl
Prop (10 µM)	1.0 µl
Moleküler su	7,6 µl
RNA	5.0 µl
Toplam Hacim	20 µl

Real-time RT PCR protokolü LightCycler 480 real-time PCR cihazında uygulanmıştır. Protokol şu aşamalardan oluşur.

- Viral RNA'nın revers transkripsiyonu
- cDNA/RNA hibritinin denatürasyonu
- cDNA amplifikasyonu
- Termal bloğun soğuması

**Tablo 5.** Real time RT PCR protoklü

	<b>Döngü</b>	<b>Sıcaklık (°C)</b>	<b>Süre</b>
<b>Revers Transkripsiyon</b>	1	50	8 dk.
<b>Denatürasyon</b>	1	95	5 dk.
<b>Amplifikasyon</b>	45	95	15 sn.
		55	45 sn.
		72	1 sn.



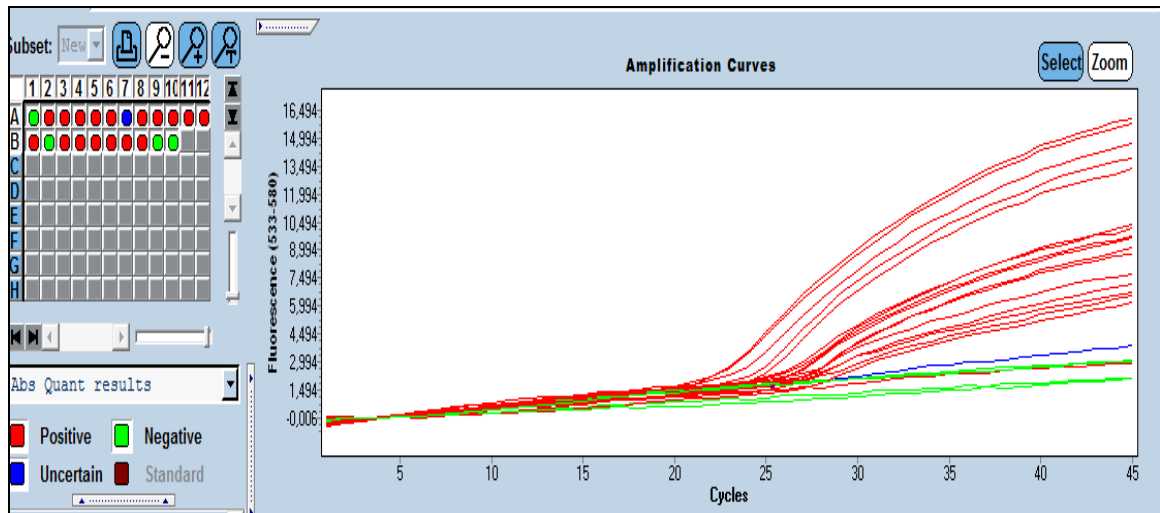
## 4. BULGULAR

### 4.1 Birinci PCR Aşaması (Oseltamivir duyarlı örneklerin saptanması)

VIC-H274 probu kullanılarak çalışılan Real-Time RT tagman PCR sonucunda toplam 131 *Influenza A 2009 (H1N1)* virüsünden 58 tanesinde amplifikasyon saptanarak bu suşlar oseltamivir duyarlı bulunmuştur. Bu suşların PCR CT değerleri aşağıdaki gibidir.

**Tablo 6.** Oseltamivir duyarlı *Influenza A 2009 (H1N1)* virüslerinin amplifikasyon ct değerleri

No:	Ct:	No:	Ct:	No:	Ct:	No:	Ct:	No:	Ct:
1	25	13	24	25	20	37	23	49	23
2	25	14	26	26	18	38	25	50	24
3	25	15	25	27	18	39	24	51	25
4	22	16	26	28	22	40	25	52	24
5	22	17	27	29	18	41	24	53	24
6	23	18	25	30	18	42	15	54	23
7	26	19	26	31	24	43	22	55	24
8	26	20	17	32	24	44	24	56	25
9	26	21	20	33	24	45	24	57	24
10	26	22	20	34	25	46	25	58	22
11	23	23	18	35	25	47	25		
12	25	24	18	36	25	48	25		



**Şekil 18.** Oseltamivire duyarlı saptanan *Influenza A 2009 (H1N1)* virüslerinin Real-Time RT PCR görüntüsü

#### **4.2 İkinci PCR Aşaması (Oseltamivir dirençli örneklerin saptanması)**

Birinci aşamada amplifikasyon saptanmayan 73 *Influenza A 2009 (H1N1)* virüsünün 65 tanesine FAM-274Y probu kullanılarak Real-Time RT PCR uygulanmıştır. 8 örnek, yetersiz örnek miktarı nedeniyle çalışılmamıştır. Deney sonucunda, çalışılan 65 örnekte herhangi bir amplifikasyon saptanmamıştır.

Tagman propla çoğaltılma sırasında, hedef nükleik asit dizisi üzerinde primerlerin bağlanma bölgeleri arasında kalan bölgede tagman proplar bağlanırlar. Primerlerin bağlanmasının ardından yeni zincir oluşmaya başlar. Probu bağlı olduğu bölgeye gelindiğinde tag DNA polimeraz enzimi 5-3 nükleaz aktivitesi ile raportör florokromu probdan ayırır. Serbest hale geçen FAM sinyali oluşturur. Her bir döngüde ürün çoğalımı arttıkça floresanda ona bağlı olarak artmaya devam eder. Deney sonuçlarımızda herhangi bir amplifikasyon göremediğimize göre mutasyon görülmesi beklenen bölgede hedef prop bağlanması gerçekleşmemiş anlamına gelmektedir. Aynı örneklerden çalışmanın planlanan her iki PCR aşamasında da sonuç alınamaması nedeniyle ikinci PCR çalışması sonrasında tüm PCR ürünlerine jel elektroforezi yöntemi uygulanarak nükleik asit varlığı kontrol edilmiştir. Elektroforez işlemi sonrası hedef bölgeye ait herhangi bir bant görüntülenememiştir. Bu nedenle PCR sırasında primer bağlanmasının gerçekleşmediği hedef bölgenin çoğalmadığı kanaatine varılmıştır. Bunun nedeninin ise uygun koşullarda saklanmasına rağmen uzun süre bekleyen suş RNA'larının bütünlüğünün bozulması olarak düşünülebilir.

## 5. TARTIŞMA

Influenza enfeksiyonu Influenza A ve B virüslerinin neden olduğu, özellikle kış aylarında, epidemiler ve pandemiler şeklinde görülebilen akut solunum yolu enfeksiyonudur. Sağlık alanındaki ve aşılardaki tüm gelişmelere rağmen özellikle kronik hastalığı olan kişiler için önemli bir mortalite ve morbidite sebebidir. Hastalık tanısının hızlı konulması, özgül tedavinin erken başlanması ve koruyucu önlemlerin alınması kişilerin ve toplumların sağlığı için oldukça önemlidir. Influenza enfeksiyonları sezonluk epidemilerle hızla bütün dünyada etkisini göstererek sağlık harcamaları ve okul , iş gücü kaybı ile önemli bir ekonomik yüke neden olmaktadır (50).

Domuz gribi, Influenza A virüsünün etken olduğu ve domuzlarda hızla yayılan salgınlara neden olan bir hayvan solunum yolu enfeksiyonuna verilen addır. Klasik domuz gribi virüsü *Influenza A (H1N1)*; ilk olarak 1930 yılında izole edilmiştir (47). Mart 2009'da Kuzey Amerika'da yeni bir insan-domuz-kuş reassortant *Influenza A (H1N1)* virüsü meydana çıkarak pandemiye yol açmıştır. İşte 2009-2010 pandemisine neden olan bu yeni *Influenza A (H1N1)* virüsünün, genetik bölgelerinin bir kısmı domuz Influenza virüsünden köken aldığı için, hastalık domuz gribi (Swine flu) olarak isimlendirilmiştir (50). DSÖ 11 Haziran 2009'da İnfluenza pandemi alarm seviyesini 6'ya yükseltmiştir (53). Pandemi, ilan edildiği tarihten sonra dünya üzerinde çok hızlı bir şekilde yayılmıştır. Ağustos 2009 tarihi sonu itibarıyla, hem Kuzey hem de Güney yarım kürede görülen İnfluenza vakalarının neredeyse tamamının etkeni *Influenza A 2009 (H1N1)* virüsü olduğu ortaya çıkmıştır (46). İnsan pandemik *Influenza A 2009 (H1N1)* virüsü tüm dünyada büyük bir sağlık sorunu haline gelmiş ve çok sayıda insan virüsle enfekte olmuştur (81).

Influenza tedavisinde nöraminidaz inhibitörleri (zanamivir, oseltamivir ve peramivir) ve M2 blokörleri amantanlar (amantadine ve rimantadin) olmak üzere iki grup antiviral kullanılmaktadır (69). DSÖ ve CDC gibi otoriteler, pandemik *Influenza*

*A 2009 (H1N1)* tedavisinde nöraminidaz inhibitörleri olan oseltamivir ya da zanamivir kullanılmasını önermektedir (53). Oseltamivir, zanamivirin tersine oral olarak kullanıldığında biyoyararlanımı yüksek olan bir ilaçtır (76). Oseltamivir ile erken tedaviye başlandığında, yatan hastalarda önemli ölçüde sağkalım sağlandığı ve *Influenza A 2009 (H1N1)* ile enfekte olan ağır hastalarda da sağkalımı önemli ölçüde etkilediği gösterilmiştir (77,78). Nöraminidaz inhibitörleri enfekte hücrelerden yeni virionların ayrılmasını ve diğer hücrelere sıçramasını önlemektedir. (82)

Antiviral tedavi sırasında ilaca dirençli suşların ortaya çıkışı büyük bir endişe sebebidir (82). NAI'nın, özellikle oseltamivirin yaygın kullanımı ilaca dirençli viral suşların ortaya çıkması ve yayılması için seçici bir baskı yaratmaktadır (90). Oseltamivire dirençli suşlar N1 numaralandırma sistemine göre NA geninin 275. pozisyonunda bulunan Histidin aminoasitidinin Tirozin'e değişimi ile karakterizedir (82).

Kuzey yarım kürede 2007-2008 *Influenza A* sezonunda, *Influenza A (H1N1)* virüslerinde oseltamivir direnci ortaya çıkıncaya kadar *Influenza* virüslerinde NAI direnci yaygın değildi (86). 2007-2008 *Influenza* sezonunun başlangıcında *Influenza A (H1N1)* virüslerinde oseltamivir direncinin ortaya çıkmasıyla özellikle Avrupa'da birçok dirençli suş raporlanmış ve oseltamivir dirençli *Influenza A (H1N1)* virüslerinin prevalansı tüm dünyada dramatik bir şekilde artmıştır. 2009 *Influenza* sezonu öncesi son raporlar çoğu *Influenza A (H1N1)* virüsünün oseltamivire karşı dirençli olduğunu göstermektedir (91). DSÖ verilerine göre dünya genelinde 2007-2008 sezonunda *Influenza A (H1N1)* virüslerinde direnç %15 iken 2008-2009 sezonunda %96'ya yükselmiştir (92).

2009 bahar aylarında pandemik *Influenza A 2009 (H1N1)* ortaya çıkması ve tüm dünyaya yayılmasıyla birlikte başlangıç raporları tüm pandemik H1N1 virüslerinin NAI'ne karşı duyarlı olduğunu göstermektedir (82). DSÖ, 15 Aralık 2009 da sporatik oseltamivir dirençli vakaların sayısının dünya genelinde yaklaşık 100 vakaya ulaştığını bildirmesiyle oseltamivir dirençli vakaların dikkatli bir şekilde izlenmesini önermiştir (90). Fakat pandemi süresince Japonya, Çin, ABD, Hong Kong, Singapur, Vietnam, Danimarka ve Kanada gibi birkaç ülkeden bildirilen çok az sayıda (DSÖ kayıtlarına göre 168) oseltamivir dirençli köken dışında antiviral direnç sorunu

yaşanmamıştır. Dirençli kökenlerle enfekte olan olguların %89’unda önceden oseltamivir kullanma öyküsü belirlenmiştir (93). Pandemi sonrası döneme bakıldığında da CDC tarafından 1 Ekim 2015 tarihinden itibaren test edilen pandemik *Influenza A 2009 (H1N1)* virüslerinde oseltamivir direnci %0,9 olarak tespit edilirken, 2013-2014 Influenza mevsimi süresince oseltamivir direnci gösteren *Influenza A 2009 (H1N1)* virüs prevelansı ABD’de yaklaşık %1 olup; düşük bulunmuştur (94).

Oseltamivir'e dirençli Influenza A virüslerinin fenotipik analizi, Influenza virüslerinde ilaç direncini tespit etmek için "altın standart" olarak kabul edilirken, genotipik analizler (pyrosekans), nokta mutasyonlarının saptanması için yaygın olarak kullanılmaktadır. Fakat bu testler uzun zaman alan, yoğun emek, özel ekipman ve personel gerektiren tekniklerdir. Bu nedenle oseltamivir direncinin saptanması için kısa süreli ve yüksek verimli analizler gereklidir (90). Pandemi *Influenza A 2009 (H1N1)* ve / veya antiviral ilaç dirençli mutasyonları tespit etmek için geliştirilen birçok PCR tabanlı testler mevcuttur (95). Real Time RT-PCR testleri hızlı olmaları ve yüksek duyarlılıkları ile spesifik bir alternatif oluşturmaktadırlar (59). Musa Hindiyeh ve arkadaşları Pandemi *Influenza A 2009 (H1N1)* virüsünde oseltamivir direncinin hızlı bir şekilde tespit edebilmek için “*Rapid Detection of Influenza A Pandemic (H1N1) 2009 Virus Neuraminidase Resistance Mutation H275Y by Real-Time Reverse Transcriptase PCR*” isimli çalışmalarında Real-Time Revers Transkriptaz PCR “ yöntemi kullanmışlardır (90). Yine Glenys R. Chidlow ve arkadaşları, “*The detection of oseltamivir-resistant pandemic influenza A/H1N1 2009 viruses using a real-time RT-PCR assay*” isimli çalışmalarında, Sunchai Payungporn ve arkadaşları, “*Detection of oseltamivir sensitive/resistant strains of pandemic influenza A virus (H1N1) from patients admitted to hospitals in Thailand*” isimli çalışmalarında; aynı yöntemi kullanmışlardır (86,81).

Bu tez çalışmasında da oseltamivir duyarlı ve dirençli suşları saptayabilmek amacıyla MGB tagman propları kullanılarak hızlı ve duyarlılığı yüksek bir teknik olması nedeniyle real-time revers transkriptaz PCR yöntemi uygulanmıştır.

Tagman propları MGB ve non-MGB olmak üzere ikiye ayrılırlar (87). Normal şartlarda probun primerden önce hedef bölgeye bağlanabilmesi için prop TM (melting-temperature) derecesinin, primer TM derecesinden daha yüksek olması gerekir (88,89).

Bu nedenle non-MGB prop dizilerinin primer dizilerinden daha uzun olması gerekir (87). Fakat probun fazla uzun olması bağlanma sırasında hatalı eşleşmelere, çok kısa olması ise özgülüğünün azalmasına neden olmaktadır (88,89). Ancak gen ekspresyonu ya da tek nokta mutasyonu saptanması gibi çalışmalar yüksek özgülük isteyen çalışmalardır. MGB Tagman proplarında, MGB grubu (minor groove binding) “guencher” boya ile 3’ ucuna bağlıdır. Prop hedef bölgeye bağlandığında MGB, çift sarmal DNA’nın minör oluşunu kuşatır ve bu kuşatma TM derecesini yükselterek bağlanmayı güçlendirir. Bu özelliğinden dolayı tagman MGB propları primerlerden daha kısa olabilir. Diğer tagman proplara göre daha kısa dizilere sahip olduğu halde primerlerden daha yüksek sıcaklıkta bağlanma özelliği ve daha yüksek özgülüğe sahip olmasından dolayı birçok kompleks genetik uygulamalarda tavsiye edilen prop tipidir (87). Bu nedenlerden dolayı bu tez çalışmasında MGB tagman prop tercih edilmiştir.

*Glenys R. Chidlow ve ark.* (86) Mayıs , Ekim 2009 tarihleri arasında toplanan ve pandemik Influenza A 2009 (H1N1) virüs olduğu bilinen 388 örneği oseltamivir direnci açısından RRT PCR yöntemiyle incelemiş ve 4 örnekte H275Y mutasyonu saptanmıştır. Bu dört örneğin ikisi yoğun bakımda tedavi gören hastalardan diğer ikisi ise hastanede yatmakta olan hastalardan izole edilmiştir.

Sunchai Payungporn ve ark. ( 81) Nisan 2009, Aralık 2010 tarihleri arasında Tayland’da, pandemik *Influenza A 2009 (H1N1)* virüsü olduğu saptanan 1288 örnek RRT PCR yöntemi ile oseltamivir direnci açısından incelenmiş ve sadece 4 tanesinde (%0,31) direnç saptamıştır.

Margaret Okomo-Adhiambo ve ark. (96) Ekim 2013, Nisan 2014 tarihlerinde Birleşik Devletler’de, toplamda 4968 pandemik *Influenza A 2009 (H1N1)* virüsü, pyrosekans ve nöraminidaz inhibisyon testleriyle oseltamivir direnci açısından incelenmiş ve 59 tanesinde (%1.2) direnç saptamıştır.

Yasushi Suzuki, ve ark. (82) Ocak 2008, Aralık 2009 yılları arasında, Japonya’da toplam 427 *Influenza A (H1N1)* virüsünü, cycling prop Real-Time PCR metodu ile oseltamivir direnci açısından taramış ve 2007-2008 Influenza sezonunda 72 mevsimsel *Influenza A (H1N1)* izolatının hiçbirinde direnç saptamamıştır. Fakat 2008-2009 sezonunda 282 mevsimsel *Influenza A (H1N1)* izolatının hepsinde oseltamivir

direnci saptamıştır. 2009-2010 sezonunda ise hiç mevsimsel *Influenza A (H1N1)* virüsü saptanmamış olup 73 pandemik *Influenza A 2009 (H1N1)* virüsünün hiçbirinde oseltamivir direnci saptanmamıştır.

Hoang Vu Mai-Phuong ve ark. (97) 2009-2012 yılları arasında, Viet Nam'da toplam 341 örnek *Influenza A* pozitif bulunmuş ve bunlardan 215 tanesinde pandemik *Influenza 2009 (H1N1)* virüsü saptanmıştır. Bu örnekler pyrosekans yöntemi ile oseltamivir direnci açısından araştırılmış ve 3 örnekte direnç (H275Y) saptanmıştır.

Weijuan Huang ve ark. (98) Eylül 2013, Mart 2014 tarihlerinde, Çin'de 1123 *Influenza A 2009 (H1N1)* virüsünü oseltamivir direnci açısından floresan temelli testlerle taramış ve toplam 24 (%2,14) örnekte H275Y direnci saptanmıştır.

Mosqueda-Gómez JL ve ark. (99) 2009-2012 yılları arasında Guajanuta, Meksika'da toplam 575 *Influenza A 2009 (H1N1)* virüsünü end-point real time RT PCR yöntemiyle oseltamivir direnci açısından incelemiş ve sadece 1 örnekte H275Y direnç mutasyonu saptanmıştır.

Guldemir D ve ark. (100) Türkiye'de post pandemik dönemde yaptıkları çalışmada, real-time RT PCR yöntemi ile analiz edilmiş 2601 klinik örnekten 233 tanesinde *Influenza A 2009 (H1N1)* virüsü saptanmış ve bu suşların HA ve NA gen bölgeleri sekans yöntemi ile analiz edilmiştir. İzolatların NA bölgelerinin analizi, oseltamivir direncinin Türkiye'de henüz bir sorun oluşturmadığını ortaya koymuştur.

Ertek M ve ark. (101) 15 Mayıs-30 Kasım 2009 tarihleri arasında Türkiye'de 19.973 örneği pandemik *Influenza A 2009 (H1N1)* açısından real-time RT PCR yöntemi ile analiz etmişler ve örneklerin %43.7'sinde virüs RNA'sına rastlamışlardır. Randomize olarak seçilen 29 örnek sekans analizi ile incelenmiş ve hiçbirinde NA geninde H275Y mutasyonu saptanmamıştır.

Bu tez çalışmasında Yeditepe Üniversitesi Hastanesi'ne başvuran hastaların Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen klinik örneklerinden pandemik *Influenza A 2009 (H1N1)* olduğu saptanan 131 virüs oseltamivir duyarlılığı-direnci açısından incelenmiştir. Toplam 58 örnek oseltamivire duyarlı saptanmıştır. Çalışmada

kullanılacak olan suşların nükleik asitlerinin DNA, RNA ve protein konsantrasyonu açısından spektrofotometrik olarak ölçümünün yapılması planlanmış fakat deneyin farklı bir merkezde çalışılacak olması ve uzun zaman saklanmış virüs RNA'larının kalitesinin dondurma-çözdürme'den etkilenmesini önlenmesi amacıyla RNA'lar direkt olarak PCR çalışmasına alınmıştır. Duyarlı *Influenza A 2009 (H1N1)* virüslerinin dışında kalan 65 örnek oseltamivir direnci açısından incelenmiş olup sonuç alınamama nedeninin düşük RNA kalitesi olabileceği düşünülmüştür. Çalışmamızda H275Y mutasyonu saptanmış standart dirençli bir suşun pozitif kontrol olarak kullanılması planlanmış fakat yetersiz bütçe nedeni ile temin edilememiştir. Yapılan çalışmalarda da görüldüğü gibi pandemik *Influenza 2009 (H1N1)* virüslerinde oseltamivir direnci tüm dünyada oldukça düşük oranlara sahipken ülkemizde ise henüz dirençli bir vakaya rastlanmamıştır. Bu nedenle, çalışmamızın başında örneklem sayımızın az olmasının direnç saptama şansımızı da oldukça düşüreceğinin bilincindeydik. Çalışmamızda oseltamivir duyalılığının yüksek oranda saptanması beklenildiği için WHO'nun standart protokolünü uygulayarak duyarlı *Influenza A 2009 (H1N1)* virüslerini tespit etmiş olduk.

Sürveyans, belirli bir bölgede dolaşımdaki virüslerin tipleri, alt türleri, antijenik özellikleri, antiviral direnç profilleri ve Influenza aktivitesi özellikleri hakkında değerli veriler sağlar (102). DSÖ, 1952 yılından itibaren Influenza virüslerini Global Influenza Sürveyans Ağı ile izlemektedir. Türkiye bu ağa 2005 senesinde katılmıştır (50). İnfluenza salgınlarının etkili bir şekilde gözlemlenmesi ve izlenmesi, hastalığın toplum üzerindeki etkisini değerlendirmek ve hastalık yönetim politikalarını tasarlamak, yeni alt tiplerin ve antiviral dirençli suşların ortaya çıkmasının tespiti için önemlidir. (103,104). Bu nedenle, pandemik suşların antiviral direnci için aktif gözetim, klinisyenler, laboratuvarlar ve ajanslar tarafından sürdürülmelidir. Bu virüsün bilgisi halen sınırlıdır, in vitro ve in vivo modellerde bu dirençli varyantın aktarım özelliklerinin karakterize edilmesi gereklidir (105).



## KAYNAKLAR

1. Carroll K.C., Butel J.S., Morse S.A. and Mietzner T.A. *Jawetz, Melnick and Adelberg's Medical Microbiology*, 27th ed., USA: McGraw-Hill Education; 2013; 565-568
2. Nicholson K.G., Wood J.M., Zambon M. *Influenza*, 2003 Nov 22; 362(9397): 1733-45.
3. Willke Topçu A., Söyletir G., Doğanay M. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. 3. Baskı. 2. cilt. 2008 sf:
4. Murray, P.R., Rosenthal, K.S. and Tenover F.C. *Medical Microbiology 6th ed.*, Editör Başustaoğlu A.C. Türkiye: Atlas Kitapçılık; 2010; 583-590
5. Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus Investigation Team, Dawood F.S., Jain S., Finelli L., Shaw M.W., Lindstrom S., Garten R.J., Gubareva L.V., Xu X., Bridges C.B., Uyeki T.M. *Emergence of a Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus in Humans*; 2009 Jun 18; 360(25):2605-15.
6. Alenzi F.Q. *H1N1 update review*. Saudi Med J.; 2010 Mar; 31(3):235-46
7. Brooks G.F., Carroll K.C., Butel J.S., Morse S.A. and Mietzner T.A. *Jawetz, Melnick and Adelberg's Medical Microbiology*, Editör Yenen O.Ş. Türkiye: Nobel Tıp Kitapevi; 2010; 533-545
8. Carroll K.C., Jorgensen, J.H., Funke, G., Landry, M.L., Warnock, D.W. and Ed. Versalovic J. *Manual of Clinical Microbiology* 10th ed., Washington: ASM Press; 2011; Section 2: 1334
9. Oxford J.S. *Antivirals For The Treatment and Prevention of Epidemic and Pandemic Influenza*. *Influenza Other Respir Viruses*; 2007 Jan;1(1):27-34.
10. Ferraris O., Lina B. *Mutations Of Neuraminidase Implicated in Neuraminidase Inhibitors Resistance*. *J Clin Virol*; 2008 Jan;41(1):13-9.
11. World Health Organization (WHO); *Influenza A (H1N1) Virus Resistance to Oseltamivir-Last Quarter 2007 To 2 June 2008*; 2008 June.

12. Wilschut J.C., McElhaney J.E., Palache M.A. Introduction Ed. Wilschut J.C., McElhaney J.E., Palache M.A. *Influenza*. PA, USA: Mosby-Elsevier; 2006; 11-23
13. Palese P., Shaw M.L. and Ed. Knipe D.M., Howley P.M. *Fields Virology, Orthomyxoviridae: The Viruses And Their Replication*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007: 1647–1689
14. Nguyen-Van-Tam J.S., Hampson A.W. *The Epidemiology and Clinical Impact of Pandemic Influenza*. Vaccine; 2003 May 1;21(16):1762-8
15. Smith W., Andrewes C.H., Laidlaw P.P. *A Virus Obtained From Influenza Patients*; Lancet 1933; 2: 66-68.
16. Andrewes C.H., Laidlaw P.P., Smith W. *The Susceptibility of Mice to the Viruses of Human and Swine Influenza*; Lancet 1934; 224: 859-862.
17. Taubenberger J.K., Morens D.M. *1918 Influenza, The mother of all pandemics*; Emerg Infect Dis; 2006 Jan;12(1):15-22.
18. Kitler ME, Gavinio P, Lavanchy D. *Influenza and the work of the World Health Organization*. Vaccine 2002; 20(Suppl 2): S5-S14
19. Stephenson I., Nicholson K.G., Glück R., Mischler R., Newman R.W., Palache A.M, Verlander N.Q., Warburton F., Wood J.M., Zambon M.C. *Safety and Antigenicity of Whole Virus and Subunit Influenza A/Hong Kong/1073/99 (H9N2) Vaccine in Healthy Adults: Phase I Randomised Trial*; Lancet. 2003 Dec 13;362(9400):1959-66.
20. Center for Diseases Control: Swine Influenza A (H1N1) Infection In Two Children-Southern California, March-April 2009, MMWR Morb Mortal Wkly Rep; 58: 400-402, 2009
21. Nicholson K.G., Webster R.G., Hay A.J. *CW Chronicle of influenza pandemics Textbook of Influenza Oxford: Blackwell Science; 1998; 3-18*
22. Sullivan S.J., Jacobson R.M., Dowdle W.R., Poland G.A., *2009 H1N1 Influenza; Mayo Clin Proc 2010 Jan;85:64-76*
23. Durdal U.S. A: *Pandemik Influenza İnfeksiyonunda Etyopatogenez ve Laboratuvar Tanı Yöntemleri*; Hacettepe Tıp Dergisi; 2010; 41(1): 13-27
24. Bouvier N.M., Palese P. *The Biology of Influenza Viruses*. Vaccine 2008 Sep 12; 26 Suppl 4: D49-53
25. Çıkman A. *Bölgemizde Influenza A (H1n1) Suşlarının İrdelenmesi*, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, 2011

26. Hirst G.K. *The Agglutination of Red Cells by Allantoic Fluid of Chick Embryos Infected with Influenza Virus* *Science* 1941 Jul 4; 94: 22-23.
27. Brooks G.F., Carroll K.C., Butel J.S., Morse S.A. *Jawetz, Melnick, Adelberg's Medical Microbiology* 24th ed.; Section Orthomyxoviruses (Influenza viruses) USA: Mc Graw Hill Education; 2007: 533-45.
28. Gamblin S.J., Skehel J.J. *Influenza Hemagglutinin and Neuraminidase Membrane Glycoproteins* *J Biol Chem* 2010; 285: 28403-28409.
29. Çıblak Akçay M. *Türkiye 'de İnfluenza a (H1N1, H3N2 İzolatlarında Antiviral Direnç Mutasyonlarının Araştırılması* İstanbul, İstanbul Üniversitesi, 2011
30. Varghese J.N., Laver W.G., Colman P.M. *Structure Of The İnfluenza Virus Glycoprotein Antigen Neuraminidase at 2.9 Å Resolution*; *Nature*. 1983 May 5-11;303(5912):35-40.
31. Colman P.M. *Influenza Virus Neuraminidase: Structure, Antibodies and İnhibitors* *Protein Sci.*; 1994 Oct;3(10):1687-96.
32. Air G.M. *Influenza Neuraminidase; Influenza Other Respir Viruses*; 2012 Jul;6(4):245-56.
33. Claas E.C., Osterhaus A.D., Van Beek R., De Jong J.C., Rimmelzwaan G.F., Senne D.A., Krauss S., Shortridge K.F., Webster R.G. *Human İnfluenza A H5N1 Virus Related to a Highly Pathogenic Avian İnfluenza Virus*; *Lancet*. 1998 Feb 14;351(9101):472-7.
34. Matrosovich M., Tuzikov A., Bovin N., Gambaryan A., Klimov A., Castrucci M.R., Donatelli I., Kawaoka Y. *Early Alterations Of The Receptor-Binding Properties of H1, H2, and H3 Avian İnfluenza Virus Hemagglutinins After Their İntroduction İnto Mammals*; *J Virol*; 2000 Sep;74(18):8502-12.
35. Bancroft C.T., Parslow T.G. *Evidence For Segment-Nonspecific Packaging of the İnfluenza A Virus Genome*; *J Virol* 2002 Jul;76(14):7133-9.
36. Fujii Y., Goto H., Watanabe T., Yoshida T., Kawaoka Y. *Selective İncorporation of İnfluenza Virus RNA Segments İnto Virions*; *Proc Natl Acad Sci USA*: 2003 Feb 18;100(4):2002-7.
37. Çalışkan K. *Solunumsal Patojen Virüsler ve İnfluenza A H1N1 (domuz gribi)'nin Multipleks PZR Yöntemleri ile Tanısı*; Afyon, Afyon Kocatepe Üniversitesi, 2011
38. Szewczyk B., Bieńkowska-Szewczyk K., Król E. *Introduction To Molecular Biology Of İnfluenza A Viruses*. *Acta Biochim Pol.* 2014;61(3):397-401

39. Wright P.F., Neumann G., Kawaoka Y., Ed. Knipe DM, Howley P.M., *Fields Virology*; Section Orthomyxoviruses Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007; 1691–1740
40. Arias C.F., Escalera-Zamudio M., Soto-Del Río Mde L., Cobián-Güemes A.G., Isa P, López S. *Molecular Anatomy Of 2009 Influenza Virus A (H1N1)* Arch Med Res 2009 Nov; 40: 643-654
41. Şanlı K. *İnfluenza Virüsü Ve Domuz Gribi*. JOPP Dergisi; 2010; 2(1):4-12
42. Garten R.J., Davis C.T., Russell C.A., Shu B., Lindstrom S., Balish A., et all. *Antigenic and Genetic Characteristics of Swine-Origin 2009 A(H1N1) Influenza Viruses Circulating in Humans*; Science 2009 July 10; 325: 197-201
43. Brookes S.M., Irvine R.M., Nunez A., Clifford D., Essen S., Brown I.H., Van Reeth K., Kuntz-Simon G., Loeffen W., Foni E., Larsen L, Matrosovich M., Bublot M., Maldonado J., Beer M., Cattoli G. *Influenza A (H1N1) Infection in Pigs*. Vet Rec 2009 Jun 13 ; 164:760-1.
44. Osterhaus A., Garau J. *Update on the H1N1 influenza A outbreak*. 19th Eur Congr Clin Microbiol Infect Dis (ECCMID) 2009, Helsinki
45. Cohen J. *What's Old Is New: 1918 Virus Matches 2009 H1N1 Strain* ; Science 2010 Mar 26;327(5973):1563-4.
46. Badur S. *Pandemik Influenza A (H1N1) 2009: Ülkemizde Ve Dünyada Epidemiyolojik Özellikleri*. İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi; 2012 April; S.I. v.73, ISSN;1305-6441.
47. Aşçıoğlu S. *H1N1 2009 İnfluenza Pandemisinin Küresel Epidemiyolojisi*. Hacettepe Tıp Dergisi 2010; 41:1-4
48. Shinde V., Bridges C.B., Uyeki T.M., Shu B., Balişh A., Xu X., Lindstrom S., Gubareva L.V., Deyde V., Garten R.J., Harris M., Gerber S., Vagasky S., Smith F., Pascoe N., Martin K., Dufficy D., Ritger K., Conover C., Quinlish P., Klimov A., Bresse J.S., Finelli L. *Triple-Reassortant Swine İnfluenza A (HI) İn Humans in United States, 2005-2009*. N Engl J Med 2009 Jun 18;360(25):2616-25.
49. Fereidouni S.R., Beer M., Vahlenkamp T., Starick E. *Differentiation of Two Distinct Clusters Among Currently Circulating Influenza A (H1N1) Viruses, March-September 2009*. EuroSurveill 2009
50. Özışık L., Başaran Çalık N., Ünal S. *Her yönüyle İnfluenza 2016: Türkiye*. İç Hastalıkları Dergisi 2016; 23:1-11

51. Balkan İ. *Pandemik Grip*. Journal of Experimental and Clinical Medicine, Volume 2013; 29(Supplement 3): 193–200
52. Akın L. Türkiye’de Pandemik Grip Epidemiyolojisi. Hacettepe Tıp Dergisi 2010; 41:5-12
53. Cengiz A. *Pandemik H1N1 İnfluenza: Çocuklarda Klinik Bulgular Tanı, Tedavi*. Hacettepe Tıp Dergisi 2010; 41:28-37
54. Halk Sağlığı Uzmanları Derneği, Türkiye Halk Sağlığı Raporu 2012; [http://halksagligiokulu.org/anasayfa/components/com\\_booklibrary/ebooks/Turkiye\\_Saglik\\_Raporu\\_2012.pdf](http://halksagligiokulu.org/anasayfa/components/com_booklibrary/ebooks/Turkiye_Saglik_Raporu_2012.pdf)
55. *CDC Estimates of 2009 H1N1 Influenza Cases, Hospitalizations and Deaths in the United States, April 2009-February 13, 2010. CDC Report, March 12, 2010, 1-15*
56. World Health Organization (WHO) 2010. In focus: *H1N1 Now in the Post-Pandemic period. August 10, 2010*; Erişim 21.07.2016  
[http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2010/h1n1\\_vpc\\_20100810/e](http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2010/h1n1_vpc_20100810/e)
57. Cheng V.C., To K.K., Tse H, Hung I.F., Yuen K.Y. *Two Years After Pandemic Influenza A/2009/H1N1: What Have We Learned?* Clin Microbiol Rev. 2012 Apr;25(2):223-63.
58. Heikkien T., Marttilla J., Salmi A.A., Ruuskanen O. Nasal Swap Versus Nasopharyngeal Aspirate for Isolation of Respiratory Viruses; J Clin Microbiol; 2012 Nov; 40(11):4337-9
59. Kim D.K., Poudel B. *Tools to Detect İnfluenza Virus*; Yonsei Med J. 2013 May 1;54(3):560-6.
60. Aslan S., Akçay Ciblak M., Kanturvardar Tütenyurd M., Bozkaya E., Badur S. *İnfluenza A Virüsünün Tanısında Hücre Kültürü, Real-time PCR, in-house PCR ve Hızlı Test Yöntemlerinin Karşılaştırılması*; Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi 2012; 42(3):93-101
61. Wang R., Taubenberger J.K. *Methods for Molecular Surveillance of İnfluenza*; Expert Rev Anti Infect Ther. 2010 May;8(5):517-27
62. Rello J., Pop-Vicas A. *Clinical Review: Primary İnfluenza Viral Pneumonia*; Crit Care. 2009;13(6):235.
63. Kahya S., Yılmaz Ö., Carlı K. *Enfeksiyöz Hayvan Hastalıklarının Teşhisinde Gerçek Zamanlı (Real Time) PCR’ın Geleneksel Zamanlı PCR’a Göre Avantajları*; Uludağ Üniversitesi J. Fac. Vet. Med. 2013; 2: 39-44

64. Karaltı İ. *Candida ve Aspergillus Enfeksiyonlarının Real Time PCR Yöntemi İle Hızlı Tanısının Kültür Yöntemi İle Karşılaştırılması Ve Antifungal Direncin Kolorimetrik Yöntemle Tayini*; İstanbul, Marmara Üniversitesi, 2011
65. Çetinkaya E., Ayhan E. *Mikrobiyolojide Kullanılan Bazı Moleküler Teknikler*; Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi 2012; 2 (1), 53-62
66. Bustin S.A. *Absolute Quantification of mRNA Using Realtime Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Assays*; J Mol Endocrinol. 2000 Oct;25(2):169-93
67. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarları Real Time PCR Kursu Kitapçığı; 4-5 Haziran 2012; Ankara
68. Okutucu B., Pehlivan S. *Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ve Uygulama Alanları*; ARŞİV 2003; 12:138
69. Fiore A.E., Fry A., Shay D., Gubareva L., Bresee J.S., Uyeki T.M. *Antiviral Agents For The Treatment and Chemoprophylaxis Of İnfluenza-Recommendations Of The Advisory Committee On Immunization Practices (ACIP)*; MMWR Recommendations and reports : Morbidity and Mortality Weekly Report Recommendations and Reports/Centers for Disease Control. 2011; 60: 1-24.
70. Dobson J., Whitley R.J., Pocock S., Monto A.S. *Oseltamivir Treatment For İnfluenza İn Adults: A Meta-Analysis Of Randomised Controlled Trials*; Lancet 2015; 385: 1729-37.
71. Aoki F.Y., Ed. Nicholson K.G., Webster R.G., Hay A.J. *Text Book of İnfluenza Section Amantadine and Rimantadine* ; Oxford: Blackwell Science; 1998. pp. 457-476
72. Laplante J.M., Marshall S.A., Shudt M., Van T.T., Reisdorf E.S., Mingle L.A., Shult P.A., St George K. *İnfluenza Antiviral Resistance Testing İn New York and Wisconsin, 2006 To 2008: Methodology And Surveillance Data*; J Clin Microbiol 2009; 47: 1372-8
73. Kamali A., Holodniy M. *İnfluenza Treatment And Prophylaxis With Neuraminidase İnhibitors: A Review*; Infect Drug Resist. 2013 Nov 19;6:187-98.
74. Çağatay A. *Pandemik İnfluenza'da Antiviral Tedavi*; İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi 2012; 73.

75. Moscona A. *Neuraminidase Inhibitors for Influenza*; N Engl J Med 2005; 353: 1363-1373.
76. Çiftçi E., Karbuz A., Kendirli T. *Influenza ve Oseltamivir Kullanımı*; Türk Pediatri Ars 2016; 51: 63-71.
77. Dominguez-Cherit G., Lapinsky S.E., Macias A.E., Pinto R., Espinosa-Perez L., de la Torre A., Poblano-Morales M., Baltazar-Torres J.A., Bautista E., Martinez A., Martinez M.A., Rivero E., Valdez R., Ruiz-Palacios G., Hernandez M., Stewart T.E., Fowler R.A. *Critically Ill Patients With 2009 Influenza A(H1N1) In Mexico*; JAMA. 2009;302(17):1880-7.
78. Jain S., Kamimoto L., Bramley A.M., Schmitz A.M., Benoit S.R., Louie J., Sugerman D.E., Druckenmiller J.K., Ritger K.A., Chugh R., Jasuja S., Deutscher M., Chen S., Walker J.D., Duchin J.S., Lett S., Soliva S., Wells E.V., Swerdlow D., Uyeki T.M., Fiore A.E., Olsen S.J., Fry A.M., Bridges C.B., Finelli L. *2009 Pandemic Influenza A (H1N1) Virus Hospitalizations Investigation Team. Hospitalized Patients with 2009 H1N1 Influenza in the United States, April-June 2009*. N Engl J Med. 2009; 361: 1935-44
79. Zambon M. *Laboratory Diagnosis of Influenza*. In: Nicholson K.G., Webster R.G, Hay A.J. (eds). Textbook of Influenza. Oxford: Blackwell 1998; 291-313
80. Baek Y.H., Song M.S., Lee E.Y., Kim Y.I., Kim E.H., Park S.J., Park K.J., Kwon H.I., Pascua P.N., Lim G.J., Kim S., Yoon S.W., Kim M.H., Webby R.J., Choi Y.K. *Profiling And Characterization Of Influenza Virus NI Strains Potentially Resistant To Multiple Neuraminidase Inhibitors*; J Virol. 2015 Jan;89(1):287-99
81. Payungpom S., Poomipak W., Makkoch J., Rianthavorn P. Theamboonlers A., Poovorawan Y. *Detection of Osektamivir Sensiteve/ Resistanant of Pandemic Influenza A Virus (H1N1) From Patients Admitted to Hospitals in Thailand*; J Virol Methods. 2011 Nov;177(2):133-9
82. Suzuki Y., Saito R., Sato I., Zaraket H., Nishikawa M., Tamura T., Dapat C., Capering-Dapat I., Baranovich T., Suzuki T., Suzuki H. *Identification of Osetlavimir Resistance Among Pandemic and Seaosonal Influenza A (H1N1) Viruses by an His 275 try Genotyping Assay Using The Cycling Probe Method*; J Clin Microbiol. 2011 Jan;49(1):125-30

- 83.** Kumar S., Henrickson K.J. *Update On Influenza Diagnostics: Lessons From The Novel H1N1 Influenza A Pandemic.*; Clin Microbiol Rev. 2012 Apr;25(2):344-61
- 84.** World Health Organization (WHO) *Real-time RT-PCR Allelic Discrimination Analysis for Detection of the Substitution at Amino Acid 275 in the Neuraminidase (NA) of A(H1N1)pdm09 Influenza Viruses*; Influenza Virus Research Center National Institute of Infectious Diseases Tokyo, Japan: Nov. 2012;1-6
- 85.** Nakauchi M., Ujike M., Obuchi M., Takashita E., Takayama I., Ejima M., Oba K., Konomi N., Odagiri T., Tashiro M., Kageyama T. *Influenza virus surveillance group of Japan rapid discrimination of oseltamivir-resistant 275y and-susceptible 275h substitutions in the neuraminidase gene of pandemic influenza A (H1N1) 2009 Virus by Duplex one-step RT-PCR Assay*; J Med Virol. 2011 Jul;83(7):1121-7
- 86.** Chidlow GçR., Harnett G.B., Williams S.H. Tempone S.S., Speers D.L. Hurt A.C., Deng Y.M., Smith D.W. *The Detection of Oseltavimiv Resistant Pandemic Influenza A ( H1N1) 2009 Viruses Using a Real Time RT-PCR Assay*; J Virol Methots 2010 Oct; 169 (1):47-51.
- 87.** Life Sicience, Real Time PCR Handbook;  
[http://find.lifetechnologies.com/Global/FileLib/qPCR/RealTimePCR\\_Handbook\\_Update\\_FLR.pdf](http://find.lifetechnologies.com/Global/FileLib/qPCR/RealTimePCR_Handbook_Update_FLR.pdf)
- 88.** Papin J., Vahrson W., Hines-Boykin R. and Dittmer D.P., Ed. Lieberman P.M. *Methods in Molecular Biology; Section Real-Time Quantitive PCR Analysis of Viral Transcription.*; 2002: 449-479
- 89.** Amissah N.B., Packer H., Prediger E., Sabel J. *Prime Time qPCR application Guide Experimental Overview, Protocol, Troubleshooting*; Section Real Time qPCR Design and Protocol; 3th ed. 2011: 24-46
- 90.** Hindiyeh M., Ram D., Mandelboim M., Meningher T., Hirsh S., Robinov J., Levy V. Ortizer S., Azar R., Grossman Z., Mendelson E. *Rapid Detection of Influenza A Pandemic (H1N1) 2009 Virus Neuraminidase Resistance Mutation H 275 by Real Time RT PCR*; J Clin Microbiol. 2010 May; 48(5):1884-7
- 91.** Çarhan A., Albayrak N., Altaş A., Uyar Y., Özkaya E. *Türkiye’de 2007 – 2008 İnfluenza Sezonunda Oseltamivir Dirençli İnfluenza A (H1N1) Virüslerinin*



*H274Y Mutasyonu İle Saptanması*; Türk Hijyen Deneysel Biyoloji Dergisi. 2012; 69(1): 1 – 6

92. World Health Organization (WHO) *Seasonal influenza A(H1N1) viruses resistant to oseltamivir-last quarter 2008 to 31 March 2009*
93. Graitcer S.B., Gubareva L., Kamimoto L., Doshi S., Vandermeer M., Louie J., Waters C., Moore Z., Sleeman K., Okomo-Adhiambo M., Marshall S.A., St George K. Pan C.Y., LaPlante J.M. , Klimov A., Fry A.M. *Characterics of Patients wiht Oseltavimir- Resistant Pandemic (H1N1) 2009*; USA Emerg Infect Dis. 2011 Feb; 17(2):255-7
94. Centers for Disease Control and Prevention. *Seasonal Influenza Flu Activity & Surveillance, Weekly U.S. Influenza Surveillance Report: 2015-2016 Influenza Season Week 4 ending January 30, 2016*
95. Chandler D.P., Griesemer S.B., .Knickerbocker C., Golova J.B., Lambarqui A. Perov A.N. Zimmerman C. Wilws C. Rudy G.B. St George K. *Development and Clinical Testing of a Simple, Low-Density Gel Element Array for Influenza Identification, Subtyping and H 275Y Detection. J Virol Methods. 2014 Nov;208:152-9.*
96. Okomo-Adhiambo M., Fry A.M., Su S., Nguyen H.T., Elal A.A., Negron E., Hand J., Garten R.J., Barnes J., Xiyan X., Villanueva J.M., Gubareva L.V.; 2013–2014 US Influenza Antiviral Working Group. *Oseltamivir-resistant influenza A(H1N1)pdm09 viruses; United States, 2013-14. Emerg Infect Dis. 2015 Jan;21(1):136-41*
97. Hoang Vu M.P., Nguyen C.T., Nguyen le K.H., Nguyen T.K., Le Q.M. *Oseltamivir Resistance Among İnfluenza Viruses: Surveillance İn Northern Viet Nam, 2009-2012. Western Pac Surveill Response J. 2013 Jun 26;4(2):25-9*
98. Huang W., Li X., Cheng Y., Tan M., Guo J., Wei H., Zhao X., Lan Y., Xiao N., Wang Z., Wang D., Shu Y. *Characteristicstics of Oseltamivir-Resistant Influenza A (H1N1) pdm09 Virus During the 2013-2014 Influenza Season in Mainland China; Virol J. 2015 Jun 24;12:96*
99. Mosqueda-Gómez J.L., Belaunzarán-Zamudio P.F., Barba A., Córdova-Villalobos J.A., Cuellar-Rodríguez J.M., Ernesto Macías A. *Surveillance of Oseltamivir-Resistant Influenza A (H1N1) pdm09 in GuanajuatoState, Mexico from 2009 to 2012. Rev Invest Clin. 2015 Jul-Aug;67(4):235-9*

- 100.** Guldemir D., Kalaycıoğlu A.T., Altas A.B., Korukluoğlu G., Durmaz R. *Monitoring Genetic Diversity of Influenza A (H1N1) pdm 09 Virus Circulating During the Post-Pandemic Period in Turkey*; Jpn J Infect Dis. 2013; 66 (4): 299-305
- 101.** Ertek M., Durmaz R., Guldemir D., Altas A.B., Albayrak N., Korukluoğlu G. *Epidemiological Demographic and Molecular Characteristics of Laboratory-Confirmed Pandemic Influenza A (H1N1) Virus Infection in Turkey; May 15-Nov 30, 2009*, Jpn J Infect Dis. 2010 Jul;63(4):239-45
- 102.** Akçay Ciblak M., Kanturvardar Tütenyurd M., Asar S., Tulunoğlu M., Fındıkçı N., Badur S. *Influenza Surveillance in nine Consecutive Seasons, 2003-2012; Result from National Influenza Reference Laboratory, Istanbul Faculty of Medicine, Turkey*; Mikrobiyol Bul. 2012 Oct; 46 (4): 575-593
- 103.** Zaraket H., Saito R. *Japanese Surveillance Systems and Treatment for Influenza*; Curr Treat Options Infect Dis. 2016;8(4):311-328.
- 104.** Ciblak M.A., 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.
- 105.** Gioula G., Melidou A., Exindari M., Papoutsis N., Chatzidimitriou D., Dotis J., Malisiovas M. *Oseltamivir-Resistant Influenza A Pandemic (H1N1) 2009 Virus in Northern Greece*. Hippokratia. 2011 Jul;15(3):272-4



## YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

KURUL ADI	YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
AÇIK ADRES	YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ HASTANESİ Devlet Yolu Ankara Cad. No: 102-104, 34752 Kozyatağı, İstanbul
TELEFON	0216 578 47 97
E-POSTA	gulin.demir@yeditepe.edu.tr

T	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Influenza A(2009 H1N1) virüsünde H275Y mutasyonunun Real-Time PCR ve dizi analizi yöntemi ile saptanması.		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜNÜN KODU			
	EUDRACT NUMARASI			
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr.Gülten Çelik Biyolog Burcu Öksüz		
	SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Mikrobiyoloji Moleküler Tıp		
	KOORDİNATÖRÜN ÜNVANI/ADI/SOYADI			
	KOORDİNATÖRÜN UZMANLIK ALANI			
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	Yeditepe Üniversitesi Hastanesi		
	ARAŞTIRMA MERKEZİNİN AÇIK ADRESİ	Yeditepe Üniversitesi Hastanesi		
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ			
	UZMANLIK TEZİ/AKADEMİK AMAÇLI	UZMANLIK TEZİ <input checked="" type="checkbox"/>	AKADEMİK AMAÇLI <input type="checkbox"/>	
	ARAŞTIRMANIN FAZI VE TÜRÜ	FAZ 1 <input type="checkbox"/>	FAZ 2 <input type="checkbox"/>	FAZ 3 <input type="checkbox"/>
		FAZ 4 <input type="checkbox"/>	BE/BY <input type="checkbox"/>	DİĞER <input type="checkbox"/>
	İLAC ARAŞTIRMA <input checked="" type="checkbox"/>	DIŞI <input checked="" type="checkbox"/>	DİĞER ise belirtiniz: Belirtiniz:Laboratuvar çalışması.	
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/> ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>	

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>

DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı		Açıklama
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input type="checkbox"/>	
	SIGORTA	<input type="checkbox"/>	
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	<input type="checkbox"/>	
	ILAN	<input type="checkbox"/>	
	YILLIK BİLDİRİM SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>	

YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ  
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR  
FORMU

GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>	
DİĞER	<input type="checkbox"/>	

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: <b>299</b>	Tarih: <b>12.02.2013</b>
	Prof.Dr.Gülden Çelik ve Biyolog Burcu Öksüz sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik bir sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurulu üyelerinin oy çokluğu ile karar verilmiştir.	

ETİK KURULU BİLGİLERİ

ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu, Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Kuruluş ve Çalışma Esasları.
---------------	--

ETİK KURUL BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI: Prof. Dr. R. Serdar ALPAN
ETİK KURULU ÜYELERİ

Unvani/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		İlişki *		Katılım **		İmza
Prof. Dr. R. Serdar Alpan	Farmakoloji	YÜTF	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. M. Reha Cengizlier	Pediyatri	YÜTF	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Serdar Öztezcan	Biyokimya	YÜTF	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Baki Ekçi	Genel Cerrahi	YÜTF	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Ferda Özkan	Patoloji	YÜTF	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr. Dr. Nural Bekiroğlu	Biyostatistik	MÜTF	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Esra Can Say	Diş Has. Ted.	YÜDF	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Meriç Köksal	Eczacılık	YÜEF	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Ali Rıza Okur	Hukuk	YÜHF	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Başar Atalay	Beyin Cerrahi	YÜTF	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd.Doç.Dr.Nesrin Sarıman	Göğüs Hastalıkları	MÜTF	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd.Doç.Dr.Esin Öztürk Işık	Biyomedikal Mühendisi	YÜTF	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Bilge Firuzbay	Sivil Üye/Emekli		E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

\* : Araştırma ile ilişki  
\*\* : Toplantıda Bulunma

**Önemli Not:** Çalışmanın Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylanan protokole göre yürütülmesi ve çalışma protokolündeki değişikliklerin kurulumuza bildirilmesi gerekmektedir.

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	Burcu	<b>Soyadı</b>	Öksüz
<b>Doğ.Yeri</b>	Samsun	<b>Doğ.Tar.</b>	01.01.1981
<b>Uyruğu</b>	TC	<b>TC Kim No</b>	48364711330
<b>Email</b>	burcuoksuz05@gmail.com	<b>Tel</b>	0 532 6507789

### Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
<b>Doktora</b>		
<b>Yük.Lis.</b>	Yeditepe Üniversitesi Moleküler Tıp A.D.	2017
<b>Lisans</b>	Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Biyoloji Bölümü	2003
<b>Lise</b>	Tülay Başaran Anadolu Lisesi	1998

### İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Biyolog	Medical Park Göztepe Hastanesi Genetik Tanı Merkezi	Ağustos 2016- Halen
2.	Biyolog	Yeditepe Üniversitesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji A.D.	9 yıl (2007- 2015)
3.	Biyolog	Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi	3 yıl (2004- 2006)

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	İyi	İyi		YÖKDİL (56)

\*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
<b>ALES Puanı</b>	69	70	
<b>(Diğer) Puanı</b>			

### Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Word	İyi
Excel	İyi
PowerPoint	İyi

### Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

**Özel İlgi Alanları (Hobileri):** Gezinti, yürüyüş

