Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD.
ve
Ankara Mikrobiyoloji Derneği

PROF. DR. ŞEMSETTİN USTAÇELEBİ ANISINA



Viroloji Eğitim Günleri

22 - 24 Haziran 2009
Zalifre Otel, Safranbolu

Düzenleme Kurulu

Prof. Dr. Gülşen Hasçelik
Prof. Dr. Dürdal Us
Doç. Dr. Ahmet Pınar
Y.Doç. Dr. Koray Ergünay

BİLİMSEL PROGRAM

22 Haziran 2009 Pazartesi

09.30 – 13.30	Kayıt
14.00 – 14.30	Açılış
14.30 – 15.10	İnfluenza enfeksiyonlarında immünopatogenez, **Prof. Dr. Selim Badur**
15.10 – 15.50	HCV patogenezindeki yenilikler, **Prof. Dr. Hakan Abacıoğlu**
15.50 – 16.20	Kahve Arası
16.20 – 16.50	Retrovirusların transformasyon mekanizmaları, **Prof. Dr. Dürdal Us**
16.50 – 17.20	Viruslarda latentlik mekanizmaları, **Doç. Dr. Ahmet Pınar**
17.20 – 18.20	Akşam gösterimi: “Dev Kanatlar” belgeseli

23 Haziran 2009 Salı

09.00 – 09.40	**Anma: Değerli Hocamızın Ardından…**
09.40 – 10.20	Yeni insan solunum yolu virusları, **Prof. Dr. Emel Bozkaya**
10.20 – 10.50	Yeni insan polyomavirusları, **Y. Doç. Dr. Koray Ergünay**
10.50 – 11.20	Kahve Arası
11.20 – 12.00	HBV S geni mutasyon analizleri ve anlamı, **Prof. Dr. Selda Erensoy**
12.00 – 12.40	Klinik mikrobiyolog gözüyle HBV ve karaciğer transplantasyonu, **Prof. Dr. Arzu Sayıner**
12.40 – 14.00	Yemek Arası
14.00 – 14.40	Post transplant lenfoproliferatif hastalıklarda virusların rolü, **Prof. Dr. Meral Gültekin**
14.40 – 15.20	2009 Domuz gribi salgını ve ülkemizdeki durum, **Prof. Dr. Selim Badur**
15.20 – 15.50	Kahve Arası
15.50 – 16.20	Yeni anti-HIV ajanlar; maraviroc ve raltegravir, **Prof. Dr. Dürdal Us**
16.20 – 17.00	Sunum teknikleri, **Dr.Meral Akçay Çiblak**

24 Haziran 2009 Çarşamba

09.00 – 09.40	Güncel ve tekrar güncelleşen viruslar, **Prof. Dr. Yusuf Özbal**
09.40 – 10.20	İnsan adenovirus enfeksiyonlarında tanı, **Prof. Dr. Arzu Sayıner**
10.20 – 10.50	Kahve Arası
10.50 – 11.30	Klinik viroloji testlerinde yöntem geçerlilik belirlemesi, **Prof. Dr. Selda Erensoy**
11.30 – 12.00	Endemik Burkitt lenfoma: Düşmanların işbirliği, **Prof. Dr. Dürdal Us**
12.00 – 12.30	Kapanış

HCV PATOGENEZİNDE YENİLİKLER

PROF. DR. HAKAN ABACIOĞLU

22 HAZİRAN 2009, 15:10-15:50

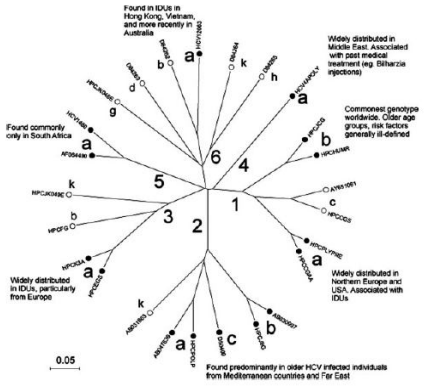
HCV patogenezinde yenilikler

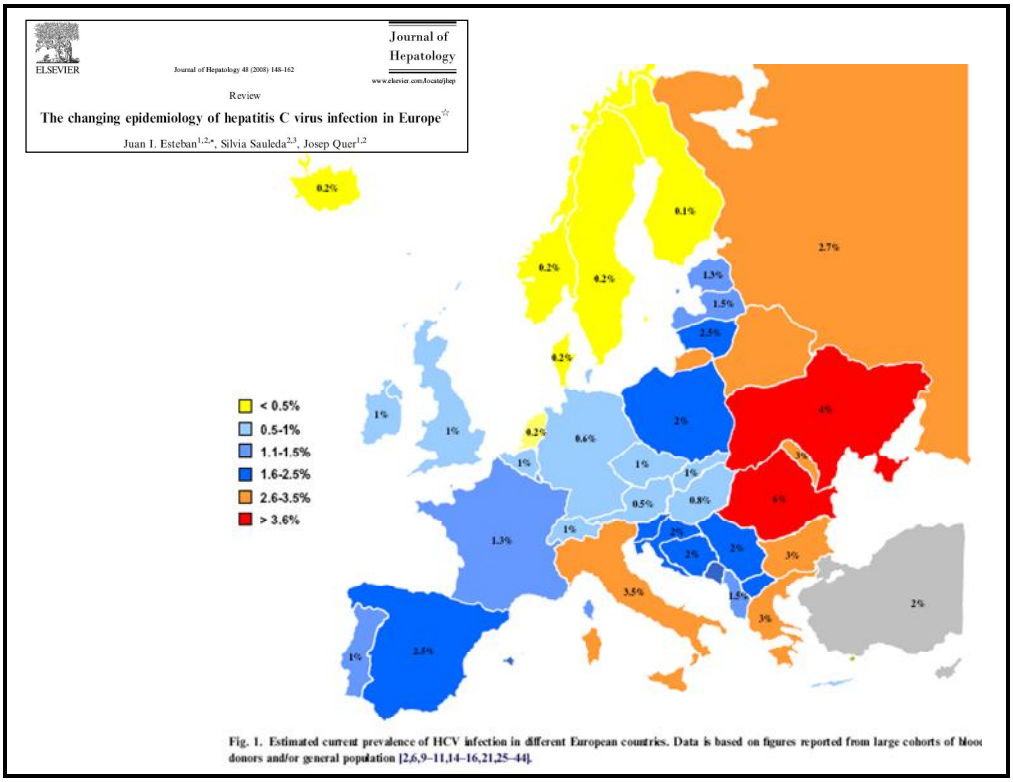
Prof. Dr. Hakan Abacıoğlu

Viroloji Kursu-Safranbolu 2009

Taksonomi

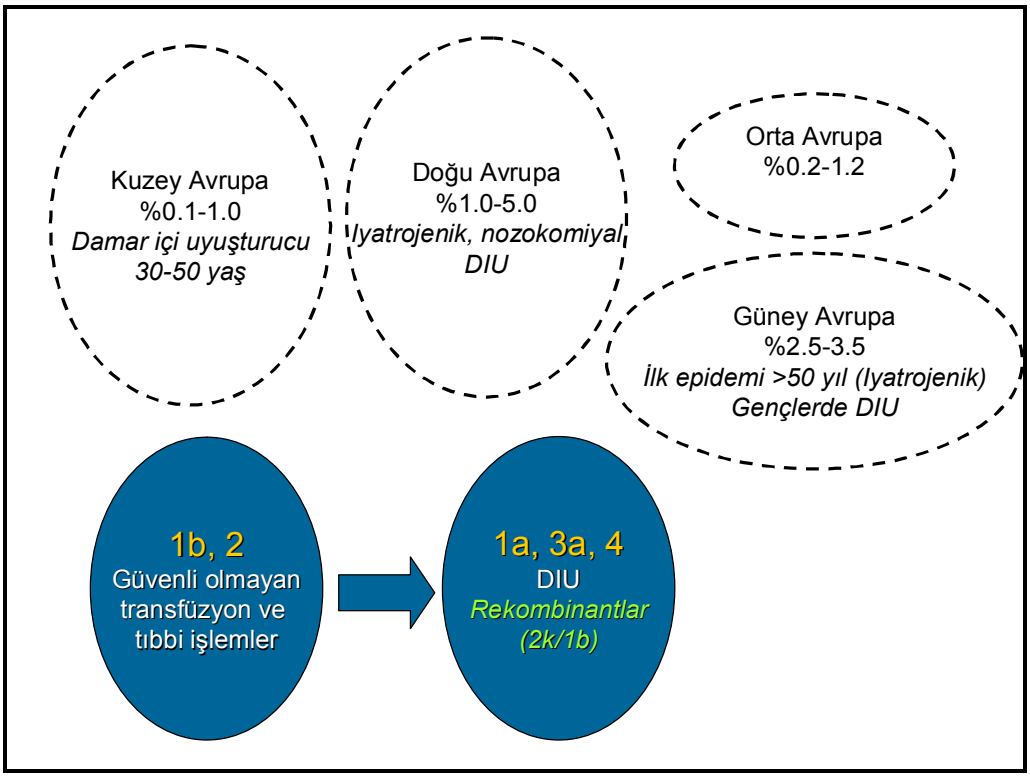
- Flaviviridae ailesi
  - Hepacivirus
    - Hepatit C virus
- Genotipler
  - Tip 1-6
    - nt düzeyinde %31-33 farklılık
  - Subtipler (>100) [a, b, c, vb]
    - nt düzeyinde %20-25 farklılık



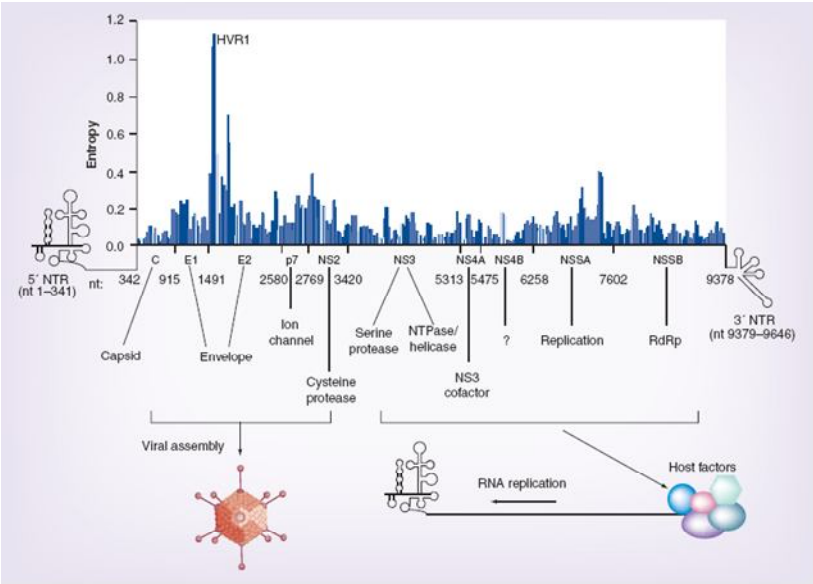

ELSEVIER
Journal of Hepatology 48 (2008) 148–162
Journal of Hepatology
www.elsevier.com/locate/jhep
Review
The changing epidemiology of hepatitis C virus infection in Europe☆

Juan I. Esteban[1,2,*], Silvia Sauleda[2,3], Josep Quer[1,2]

Fig. 1. Estimated current prevalence of HCV infection in different European countries. Data is based on figures reported from large cohorts of blood donors and/or general population [2,6,9–11,14–16,21,25–44].



HCV genom yapısı

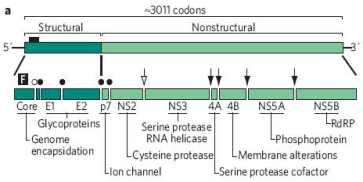


t1/2= 3 saat
10^{10} -10^{12} virus/gün
50 virion/hepatosit/gün (hepatositlerin %10'nun infekte olduğu varsayılarak)

Mutasyon hızı
1.5-2.0 x 10^{-3}

Neumann, A.U., Lam, N.P., Dahari, H., Gretch, D.R., Wiley, T.E., Layden, T.J. and Perelson, A.S. (1998). Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. Science 282, 103 – 107.

"Core" izoformları



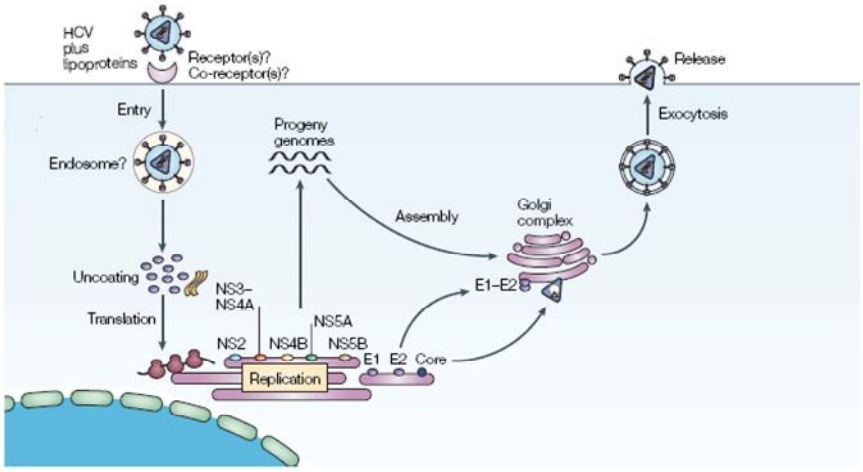
JOURNAL OF VIROLOGY, Apr. 2009, p. 3104–3114
0022-538X/09/$08.00+0 doi:10.1128/JVI.01679-08
Copyright © 2009, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.
Vol. 83, No. 7

Internal Initiation Stimulates Production of p8 Minicore, a Member of a Newly Discovered Family of Hepatitis C Virus Core Protein Isoforms▽

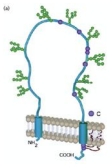
Francis J. Eng,[1] Jose L. Walewski,[1] Arielle L. Klepper,[1] Sarah L. Fishman,[1] Suresh M. Desai,[2] Laura K. McMullan,[3]† Matthew J. Evans,[3]‡ Charles M. Rice,[3] and Andrea D. Branch[1]*

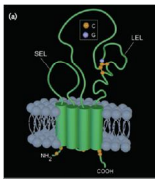
and larger isoforms. The family of minicores ranges in size from 8 to 14 kDa. All lack the N-terminal portion of the p21 core. In conclusion, the *core* gene contains an internal signal that stimulates the initiation of protein synthesis at or near codon 91, leading to the production of p8. Infections viruses of both genotype 1 and 2 HCV express a family of larger isoforms, in addition to p8. Minicores lack significant portions of the RNA binding domain of p21 core. Studies are under way to determine their functions.

HCV: *replikasyon döngüsü*

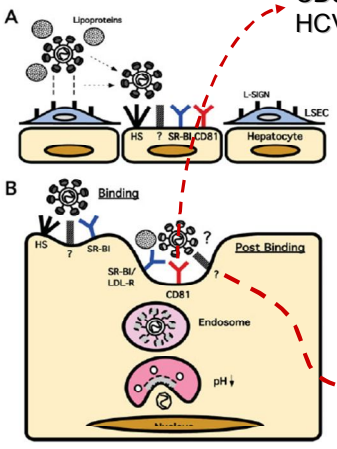


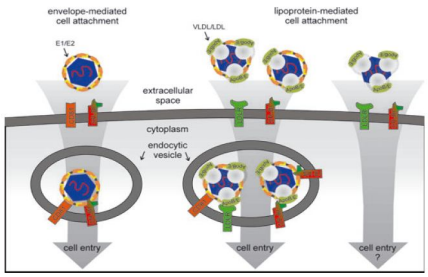
Viral reseptörler





CD81 partneri EWI-2wint
HCV infeksiyonu önlüyor





Claudin-1
Claudin-6
Claudin-9

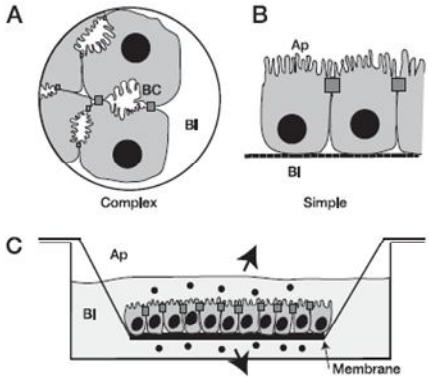
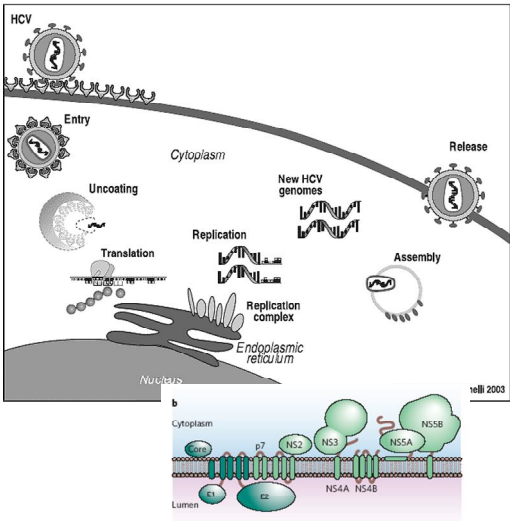


FIG. 1. Epithelial cell polarity. A. Hepatocytes in vivo and in vitro develop complex polarity, such that adjacent apical (Ap) surfaces will form bile canaliculae (BC). B. Other polarized epithelial cells grow with a simple (columnar) orientation of polarity. C. The apical and basolateral domains are both accessible when cells, such as those in panel B, are grown as a confluent monolayer on semipermeable membranes, with tight junctions between cells preventing lateral diffusion of substrates.

HCV endoplazmik retikulum membranında replike olur



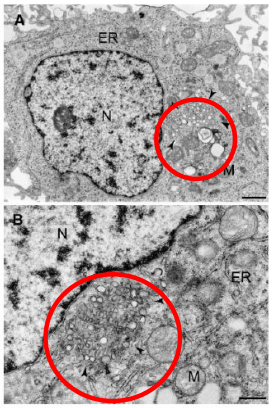
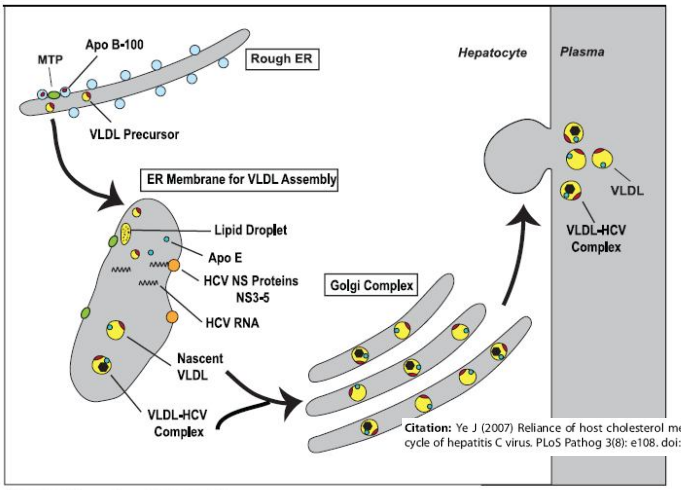


Fig. 7. HCV RNA replication complex. (A) Low-power overview of a Huh-7 cell harboring a subgenomic HCV replicon. A distinct membrane alteration, named membranous web (arrows), is found in the juxtanuclear region. Note the circumscript nature of this specific membrane alteration and the otherwise unaltered cellular organelles. Bar, 1 μm. (B) Higher magnification of a membranous web (arrows) composed of small vesicles embedded in a membrane matrix. Note the close association of the membranous web with the rough endoplasmic reticulum. Bar, 500 nm. The membranous web harbors all HCV nonstructural proteins and nascent viral RNA in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons, and therefore represents the HCV RNA replication complex. N, nucleus; ER, endoplasmic reticulum; M, mitochondria. Adapted from Gosert et al.,[102] with permission.

HCV-VLDL



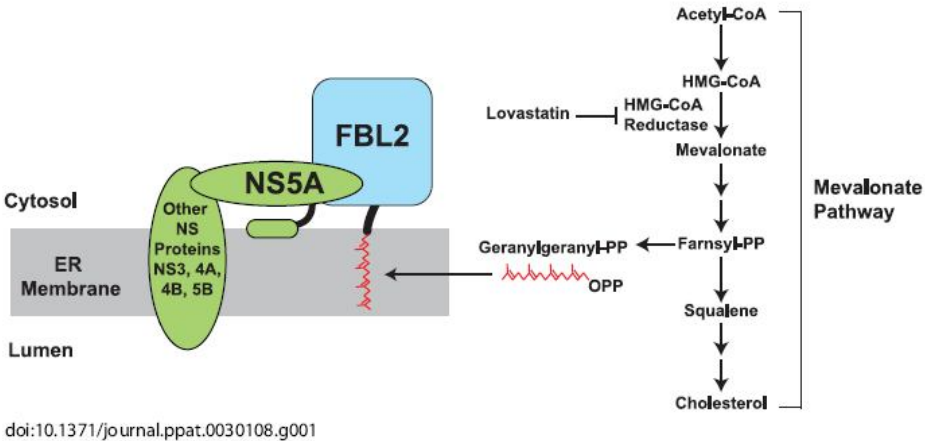
Citation: Ye J (2007) Reliance of host cholesterol metabolic pathways for the life cycle of hepatitis C virus. PLoS Pathog 3(8): e108. doi:10.1371/journal.ppat.0030108

doi:10.1371/journal.ppat.0030108.g002

Figure 2. HCV Replicates on ER Membranes Involved in the Assembly of VLDL and Is Secreted Together with VLDL

The assembly of VLDL begins with the synthesis of apoB in the rough ER, resulting in the formation of a VLDL precursor that contains only a small amount of lipid. In the lumen of the ER, this precursor is fused with lipid droplets (enriched in triglyceride and cholesterol) to generate nascent VLDL. This reaction is mediated by MTP. The nascent VLDL particles, which contain both apoB and apoE, are secreted into plasma through exocytosis. The ER membranes involved in the assembly of VLDL are also enriched in HCV NS proteins and RNA. Replication of HCV on these membranes might allow the virus to attach to or become incorporated into VLDL so that HCV is secreted together with VLDL.

HCV-*mevalonat yolağı* ilişkisi



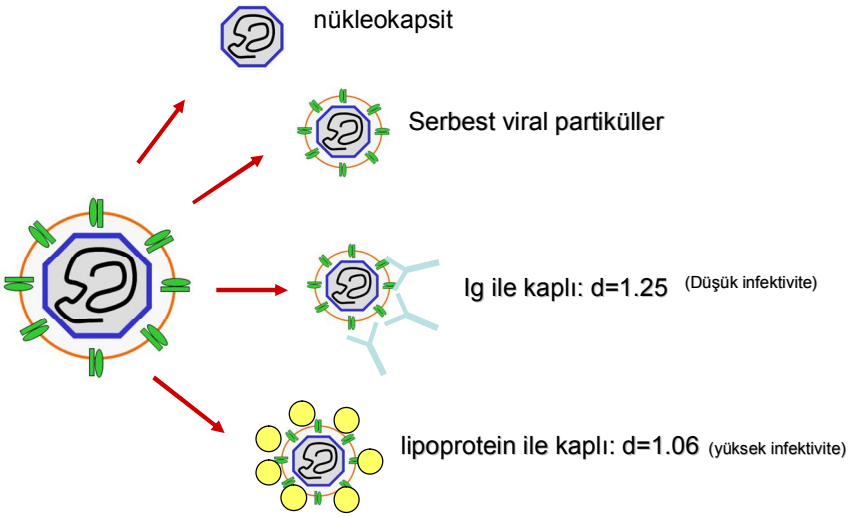
doi:10.1371/journal.ppat.0030108.g001

Citation: Ye J (2007) Reliance of host cholesterol metabolic pathways for the life cycle of hepatitis C virus. PLoS Pathog 3(8): e108. doi:10.1371/journal.ppat.0030108

Figure 1. Requirement of the Mevalonate Pathway for HCV Replication

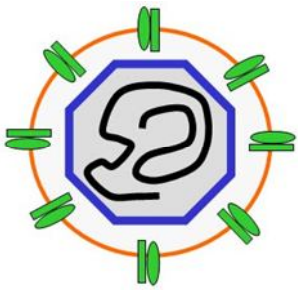
Cells are capable of synthesizing cholesterol through the mevalonate pathway. This pathway also produces geranylgeranyl lipid, which is attached to the COOH-terminus of FBL2. Geranylgeranylated FBL2 binds to NS5A, an interaction required for HCV RNA replication. Lovastatin, an inhibitor of HMG CoA reductase, blocks the entire mevalonate pathway. As a result, cells are depleted of geranylgeranyl lipid and replication of HCV is inhibited. PP, pyrophosphate.

HCV: *viral formlar*

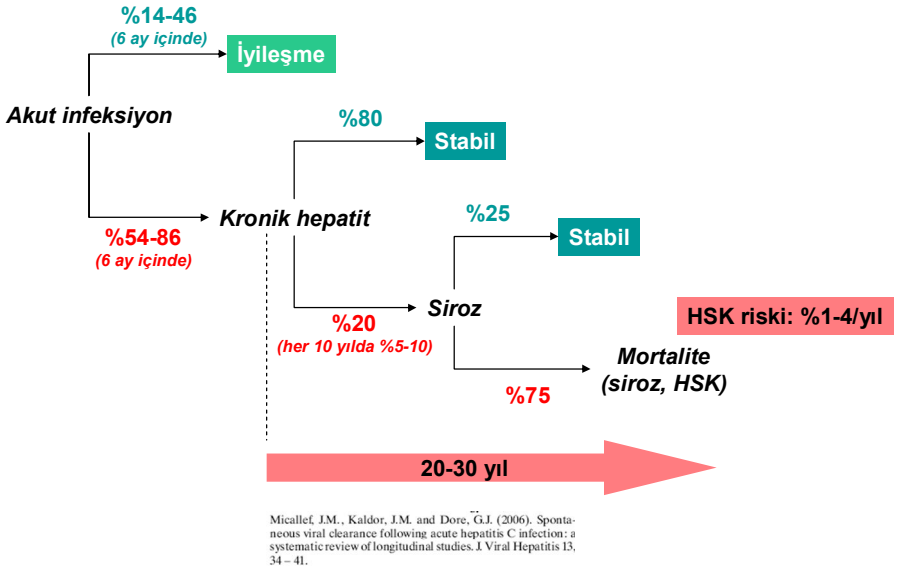


HCV'yi anlamak: *modeller*

- Akut HCV infeksiyonundan iyileşenler
- Kronik infekte olanlar
  - *İnfeksiyonu kontrol altında tutanlar*
  - *Tedaviye yanıt verenler/vermeyenler*
  - *Siroz ve HSK geliştirenler*
- Hayvan modelleri
- Hücre kültürü modelleri



HCV: *klinik gidiş*



Micallef, J.M., Kaldor, J.M. and Dore, G.J. (2006). Spontaneous viral clearance following acute hepatitis C infection: a systematic review of longitudinal studies. J. Viral Hepatitis 13, 34 – 41.

ELSEVIER SAUNDERS

CLINICS IN LIVER DISEASE

Clin Liver Dis 12 (2008) 611–636

Extrahepatic Manifestations of Hepatitis C Virus Infection

Anna Linda Zignego, MD, PhD[a,*], Antonio Craxì, MD[b]

Box 1. Classification of extrahepatic manifestations of hepatitis C virus infection

Association defined on the basis of high prevalence and pathogenesis
Mixed cryoglobulinemia (complete or incomplete clinical syndrome)
B-cell non-Hodgkin's lymphoma

Association defined on the basis of higher prevalences than in controls
Monoclonal gammopathies
Porphyria cutanea tarda
Lichen planus
Diabetes mellitus

Associations to be confirmed/characterized
Autoimmune thyroiditis
Thyroid cancer
Sicca syndrome
Alveolitis–lung fibrosis
Noncryoglobulinemic nephropathies
Erectile dysfunctions
Carotid Atherosclerosis
Psychopathological disorders

Anecdotal observations
Psoriasis
Peripheral/central neuropathies
Chronic polyarthritis
Rheumatoid arthritis
Polyarthritis nodosa
Bechet's syndrome
Myositis/dermatomyositis
Fibromyalgia
Chronic urticaria
Chronic pruritus
Kaposi's pseudosarcoma
Vitiligo
Cardiomyopathies
Mooren corneal ulcer
Necrolytic acral erythema

Miks kriyoglobulinemi
B-hücreli non-Hodgkin Lenfoma

Diabetes mellitus
Tiroiditler

Patogenez: *3 temel soru*

- İnfeksiyon nasıl kronikleşiyor?
  - *Bağışık yanıtlardan kaçış ve perzistans*
- Hepatik patolojiler nasıl ortaya çıkıyor?
  - *Hepatit*
  - *Steatoz*
  - *Fibroz / Siroz*
  - *Hepatosellüler karsinom*
- Ekstrahepatik patolojiler nasıl ortaya çıkıyor?

HCV patogenezi: *etkili faktörler*

ÇEVRESEL FAKTÖRLER
(sigara, toz, radyasyon, kirleticiler, vb)



- Tropizm ve replikatif kapasite
- Kritik genlerde genetik varyasyonlar
- Immunomodülasyon, *vb*
- Immunojenite
- Türümsüler ?
- Infektif doz ?



VİRAL FAKTÖRLER

- Konak bağışık yanıtları
  - *Doğal bağışıklık (ISG, NK, DC, vb)*
  - *Adaptif bağışıklık (CD8 ve CD4 yanıtları, nAb yanıtları)*
  - *Karaciğerin tolerojenik ortamı*
- Konak genetiği ve genetik varyasyonlar
  - *HCV (ko)reseptörleri*
  - *PTR (TLR; RIG-I, vb)*
  - *HLA alleleri*
  - *Diğer konak faktörleri*
- Diğer faktörler *(cinsiyet, yaş,vb)*

KONAK FAKTÖRLERİ



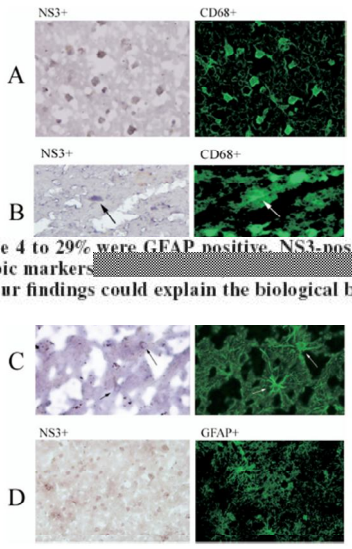
Viral tropizm

- Hepatotropik
  - *Hepatit, Siroz, HSK*
- Lenfotropik
  - *MC, B-hücreli NHL*
- Sistemik infeksiyon ?
  - *Tiroid, pankreas, sinir sistemi, vd*

JOURNAL OF VIROLOGY, Feb. 2009, p. 1312–1319
0022-538X/09/$08.00+0 doi:10.1128/JVI.01890-08
Copyright © 2009, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.
Vol. 83, No. 3

Hepatitis C Virus Neuroinvasion: Identification of Infected Cells[▽]

Jeffrey Wilkinson,[1] Marek Radkowski,[2] and Tomasz Laskus[1]*



of cells positive for HCV NS3 also were CD68 positive, while 4 to 29% were GFAP positive. NS3-positive cells were negative for neuron and oligodendrocyte phenotypic markers. Our findings could explain the biological basis of neurocognitive abnormalities in HCV infection.

Viral genlerde varyasyonlar

Journal of Medical Virology 81:1032–1039 (2009)

Amino Acid Substitutions in the Hepatitis C Virus Core Region of Genotype 1b Are the Important Predictor of Severe Insulin Resistance in Patients Without Cirrhosis and Diabetes Mellitus

TABLE II. Factors Associated With Severe IR (HOMA-IR ≥3.5) in Patients Infected With HCV Genotype 1b, Identified by Multivariate Analysis

Factor	Category	Odds ratio (95% CI)	*P*
Hepatocyte steatosis	1: Absent (<5%)	1	
	2: Present (≥5%)	4.170 (1.235–14.08)	0.021
Substitution of aa 70 and 91	1: Arg70 and Leu91	1	
	2: Gln70 (His70) and/or Met91	3.654 (1.215–10.99)	0.021
Age (years)	1: <55	1	
	2: ≥55	3.015 (1.071–8.488)	0.037

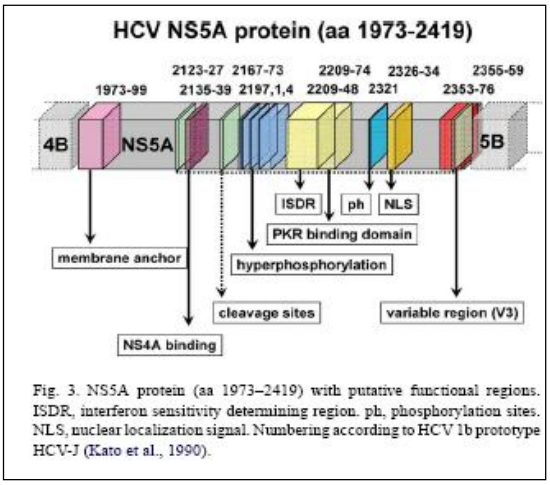


Fig. 3. NS5A protein (aa 1973–2419) with putative functional regions. ISDR, interferon sensitivity determining region. ph, phosphorylation sites. NLS, nuclear localization signal. Numbering according to HCV 1b prototype HCV-J (Kato et al., 1990).

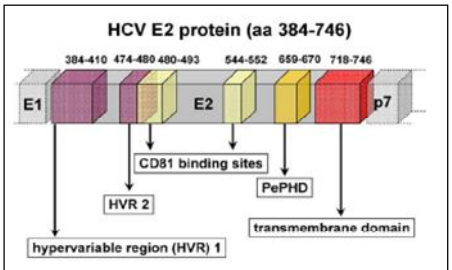
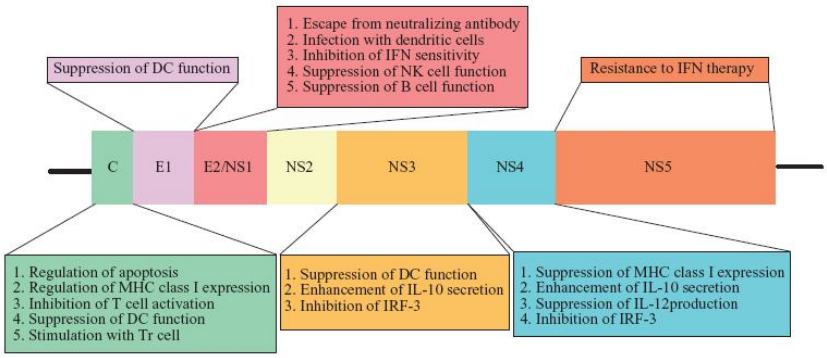


Fig. 2. E2 protein (aa 384–746) with potential functional regions. PePHD, PKR/eIF2α phosphorylation homology domain. Numbering according to HCV 1b prototype HCV-J (Kato et al., 1990).

Viral immunomodulasyon



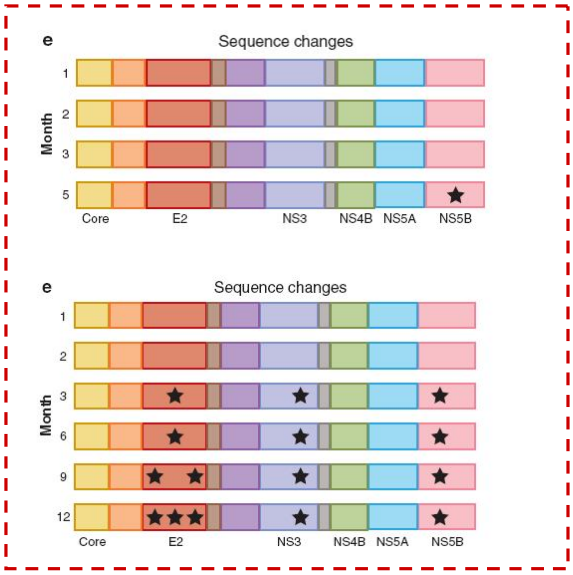
MINI-SERIES REVIEW: BASIC SCIENCE OF GASTROENTEROLOGY AND HEPATOLOGY

Immune responses in hepatitis C virus infection and mechanisms of hepatitis C virus persistence

Kazumasa Hiroishi, Takayoshi Ito and Michio Imawari

Journal of Gastroenterology and Hepatology 23 (2008) 1473–1482

Türümsüler (quasispecies)



SINIRLI

SÜREGEN

Flying Under the Radar: The Immunobiology of Hepatitis C

Lynn B. Dustin and Charles M. Rice

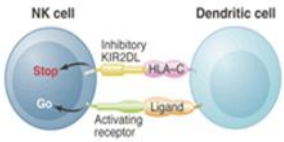
Annu. Rev. Immunol. 2007. 25:71–99

Bulaş yolu ve infektif doz

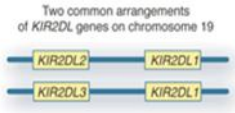
- Bulaş yolu
  - Vertikal vs transfüzyon (fark yok: Rerksuppaphol et al., 2004)
  - Parenteral vs Damar içi uyuşturucu (sonuç belirsiz)

Sutapa Roy Spontaneous Resolution of Hepatitis C Infection: Factors and Rates

- İnfektif doz
  - Doğal direçte etkin bazı genlerin koruyucu etkisi ancak düşük viral yüklerde etkili (Khakoo et al., 2004)



Inhibitory receptor	HLA–C ligand		Affinity of interaction
KIR2DL1	Lysine 80	C2	Strong
KIR2DL2	Asparagine 80	C1	Intermediate
KIR2DL3	Asparagine 80	C1	Weak



Homozigot bireylerde KIR2DL3 varlığı koruyucu (bu ilişki yalnızca DIU kullananlarda var)

HCV patogenezi: *etkili faktörler*

ÇEVRESEL FAKTÖRLER
(sigara, toz, radyasyon, kirleticiler, vb)

KONAK FAKTÖRLERİ

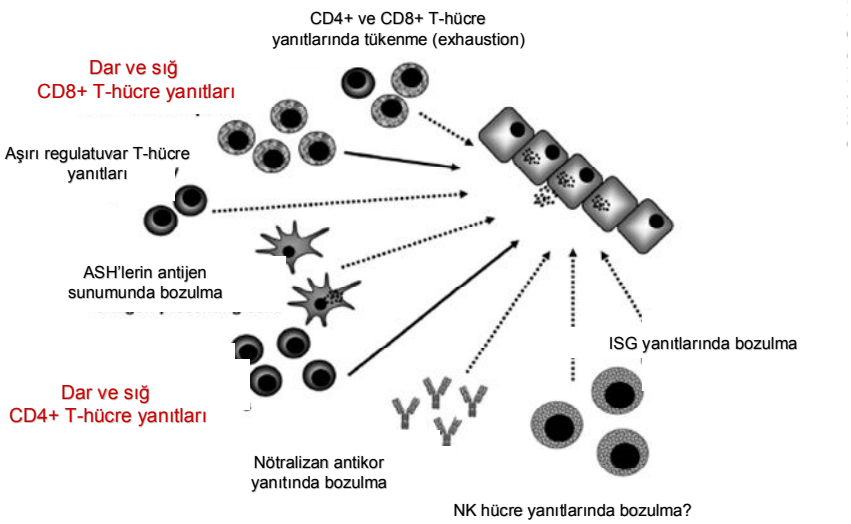
- Konak bağışık yanıtları
  - *Doğal bağışıklık (ISG, NK, DC, vb)*
  - *Adaptif bağışıklık (CD8 ve CD4 yanıtları, nAb yanıtları)*
  - *Karaciğerin tolerojenik ortamı*
- Konak genetiği ve genetik varyasyonlar
  - *HCV (ko)reseptörleri*
  - *PTR (TLR; RIG-I, vb)*
  - *HLA alleleri*
  - *Diğer konak faktörleri*
- Diğer faktörler *(cinsiyet, yaş,vb)*



Immunological determinants of the outcomes from primary hepatitis C infection

L.J. Post[a,b,c], S. Ratnarajah[c] and A. R Lloyd[a,c,*]

Cell. Mol. Life Sci. 66 (2009) 733 – 756



Bağışık yanıt kinetikleri

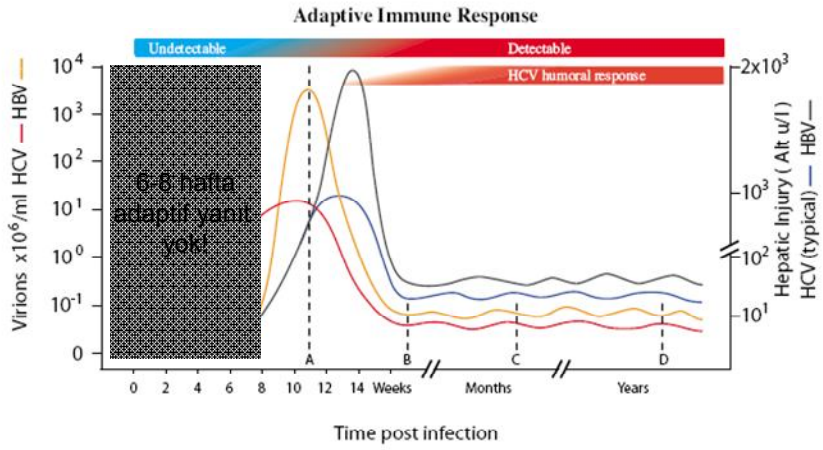
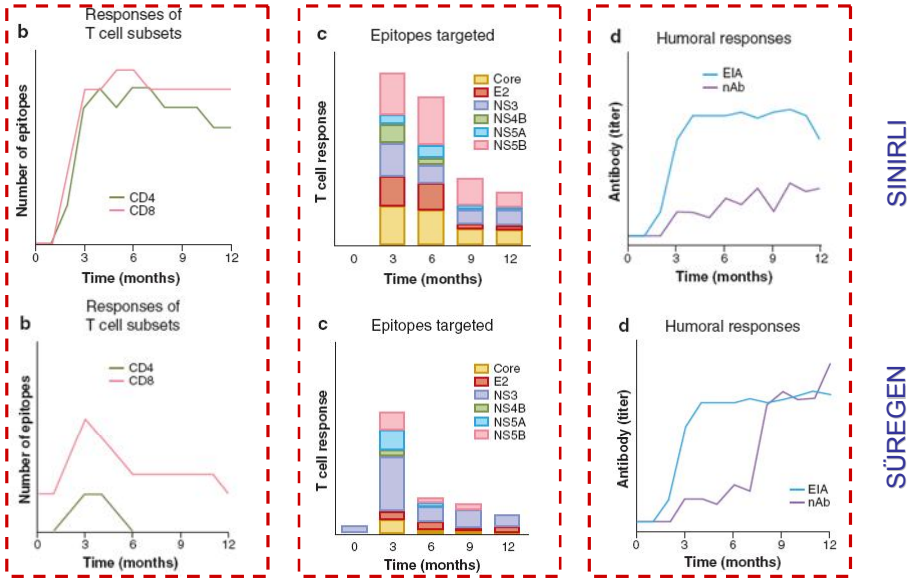


Figure 1
Viral replication, immunological and tissue injury kinetics following acute HCV and HBV infection. Data summated from Figure 1 [29] and modified to represent typical patients with chronic viral persistence. Note: a) High level HCV replication for 6–8 weeks prior to any immune responses, b) onset of humoral immune response well after down-regulation of viral replication [34], and c) transaminase peaks occurs ~ 2weeks later.

Adaptif yanıtlar



Bağışık yanıtlardan kaçış

- *Doğal bağışıklık* (?)
- Sıvısal
  - (HVR-1 mutasyonları)
- Hücresel
  - (NS3 mutasyonları)

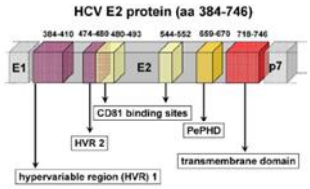
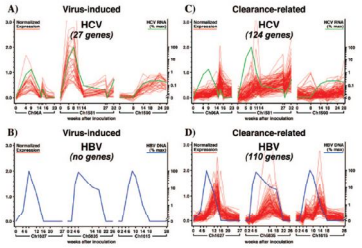


Fig. 2. E2 protein (aa 384–746) with potential functional regions. PePHD, PKR/eIF2α phosphorylation homology domain. Numbering according to HCV 1b prototype HCV-J (Kato et al., 1990).



Vol. 79, 2005 MINIREVIEW 9375

TABLE 2. Cellular genes that correlate with viremia in HCV and HBV infection

Genes correlating with viremia in infection with:		
HCV		HBV
Agrin	MX1	None
Gal83BP	OAS	
Histone H2B	Sp100	
IFI44	STAT1	
IFI-6-16	TRIM 14	
IFIT1	TRIM 22	
IFIT4	Trp-asp 2	
IFITM1	UBE2L6	
ISG15	Viperin	
Ly6E	XIAPAP1	

TABLE 3. Cellular genes induced during clearance of both HBV and HCV from the liver

Cellular gene induced		
T cell	IFN-γ inducible	Miscellaneous
CD3	GBP1	Adenylate cyclase
CD53	GBP2	Butyrophilin
Granzyme A	LMP-2	C1q
IL 10-R	Mec1.1	CD5 antigen-like
Leupaxin	MHC class I	CD48
TcRβ	MHC class II	CD74
TcRγ	MIG	IG lambda C2
	MIP-1β	IgG Fc receptor
	PA28α	Tyrosine kinase binding protein
	RANTES	Uncoupling protein 2
	Solute carrier 7A	
	TrpRS	
	Ubiquitin D	

Bağışık yanıtların baskılanması

1

- *Doğal bağışıklık*
  - NS3/4A IFN-β uyarımına neden olan TLR3 ve RIG-I yolaklarındaki adaptör proteinleri parçalar.

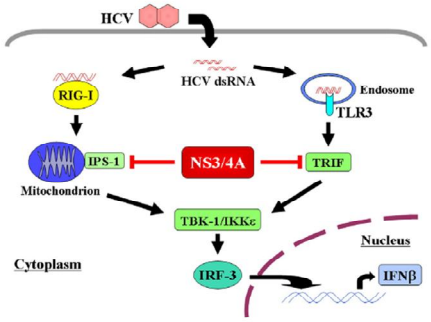


Figure 2 HCV RNA induces activation of IRF-3 via both the RIG-I and TLR3 pathways. Activated IRF-3 leads to IFNβ production and

Clinical Immunology (2008) 128, 133–147

Bağışık yanıtların baskılanması

- *Doğal bağışıklık*
  - ISG (interferon stimulated genes) yanıtlarını bozar.

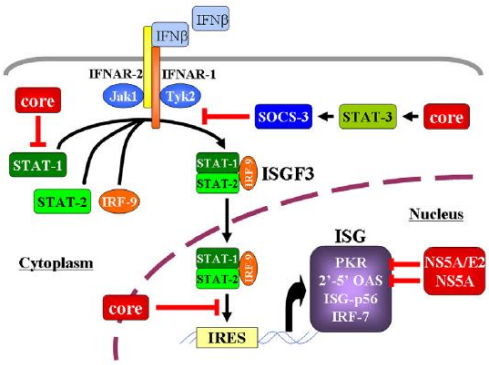


Figure 3 Newly synthesized IFNβ binds to its cognate receptor and activates the expression of numerous IFN-stimulated genes (ISG) via JAK/STAT pathway. HCV core protein inhibits this pathway via several mechanisms. HCV core protein inihibits activation or translocation of STAT-1 and formulation of ISGF3 by inducing SOCS-3. HCV core protein also blocks DNA binding by ISGF3. NS5A inhibits activation of PKR and 2ε-5ε OAS. E2 inhibits activation of PKR.

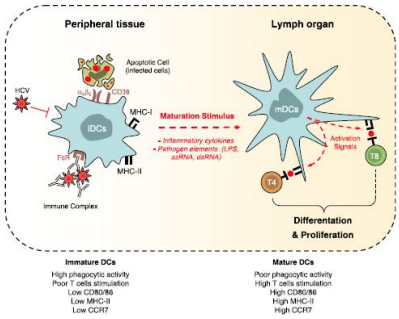
Clinical Immunology (2008) **128**, 133–147

Bağışık yanıtların baskılanması

- *NK yanıtlarının baskılanması*
  - E2-CD81: sitotoksik yanıt ve IFn-γ yanıtında azalma
  - "Core" proteini MHC I ekspresyonunda artışa neden olur
  - CD94/NKG2a ekspresyonunda artış (inhibitör reseptör)
  - HLA-E stabilizasyonu (CD94/NKG2a'nin ligandı)
  - *KIR2DL3 genotipi (eradikasyonla ilişkili)*

Bağışık yanıtların baskılanması

- *Dendritik hücre yanıtlarında baskılanma*
  - "Core" ve E1 olgunlaşmayı engeller
  - pDC sayısında azalma (IFNα yanıtında azalma)
  - TLR2 ekspresyonunda azalma
  - MICA/B ekspresyonunda azalma
  - IL-15 yanıtında azalma
  - "core", NS3, NS5A ve NS5B olgun DC'lerde apoptoza neden olur



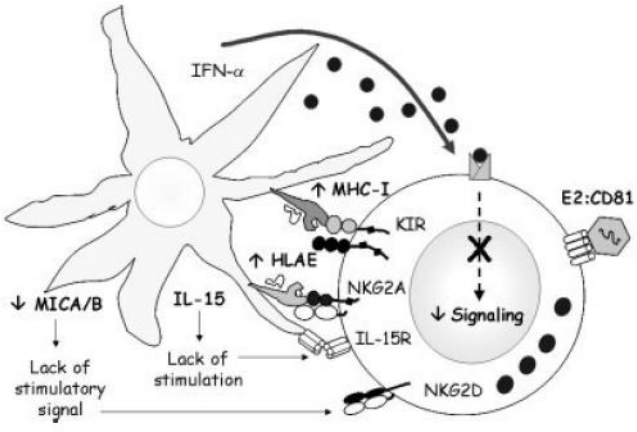
NK aktivasyonunda azalma

OPEN ACCESS Freely available online PLoS one

Hepatitis C Virus Is a Weak Inducer of Interferon Alpha in Plasmacytoid Dendritic Cells in Comparison with Influenza and Human Herpesvirus Type-1

Françoise Gondois-Rey[1,2,3], Clélia Dental[1,2,3], Philippe Halfon[4], Thomas F. Baumert[5], Daniel Olive[1,2,3], Ivan Hirsch[1,2,3]*

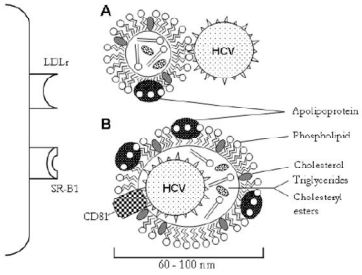
Citation: Gondois-Rey F, Dental C, Halfon P, Baumert TF, Olive D, et al. (2009) Hepatitis C Virus Is a Weak Inducer of Interferon Alpha in Plasmacytoid Dendritic Cells in Comparison with Influenza and Human Herpesvirus Type-1. PLoS ONE 4(2): e4319. doi:10.1371/journal.pone.0004319

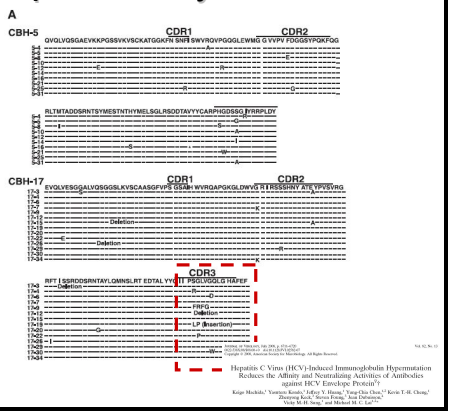


5

Bağışık yanıtların baskılanması

- *Sıvısal yanıtların baskılanması*
  - Nötralizan epitopların maskelenmesi (lipidler ve glikolizasyon)
  - E2-CD81: Ig genlerinde hipermutasyon

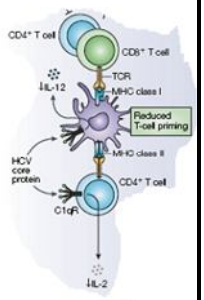


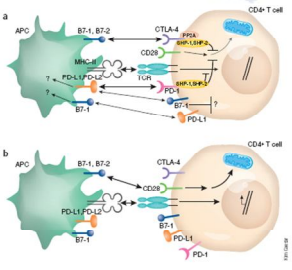


6

Bağışık yanıtların baskılanması

- *Hücresel yanıtların baskılanması*
  - Core-gC1qR (T-hücre yanıtlarını baskılar)
  - Core, IL-2 ve IL-2Rα transkipsiyonunu engeller (bellek CTL'lerin efektörlere farklılaşmasında sorun)
  - NS4A/B MHC I transportunu engeller
  - PD-1 ekspresyonunda artış





6b

Hepatic Transcriptome Analysis of Hepatitis C Virus Infection in Chimpanzees Defines Unique Gene Expression Patterns Associated with Viral Clearance

Santosh Nanda[1,3☯], Michael B. Havert[1,3☯], Gloria M. Calderón[1], Michael Thomson[1,4], Christian Jacobson[2,5], Daniel Kastner[2], T. Jake Liang[1*]

1 Liver Diseases Branch, NIDDK, NIH, Bethesda, Maryland, United States of America, 2 Genetics and Genomics Branch, NIAMS, NIH, Bethesda, Maryland, United States of America, 3 CBER, FDA, Bethesda, Maryland, United States of America, 4 Virology Department, GlaxoSmithKline, Research Triangle Park, North Carolina, United States of America, 5 Departments of Biology and Mechanical & Mechatronics Engineering, University of Waterloo, Waterloo, Ontario, Canada

Abstract

Hepatitis C virus infection leads to a high rate of chronicity. Mechanisms of viral clearance and persistence are still poorly understood. In this study, hepatic gene expression analysis was performed to identify any molecular signature associated with the outcome of hepatitis C virus (HCV) infection in chimpanzees. Acutely HCV-infected chimpanzees with self-limited infection or progression to chronicity were studied. Interferon stimulated genes were induced irrespective of the outcome of infection.

[redacted]

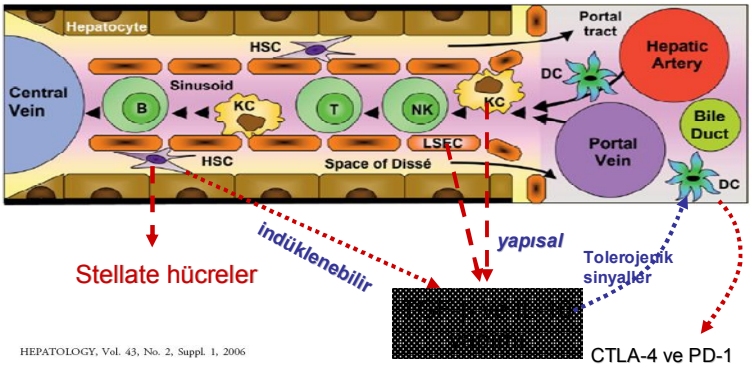
clearance phase of the acute self-limited infection. The induction of these genes may represent an initial response of cellular injury and proliferation that successfully translates to a "danger signal" leading to induction of adaptive immunity to control viral infection. This primary difference in hepatic gene expression between self-limited and chronic infections supports the concept that successful activation of HCV-specific T-cell response is critical in clearance of acute HCV infection.

Citation: Nanda S, Havert MB, Calderón GM, Thomson M, Jacobson C, et al. (2008) Hepatic Transcriptome Analysis of Hepatitis C Virus Infection in Chimpanzees Defines Unique Gene Expression Patterns Associated with Viral Clearance. PLoS ONE 3(10): e3442. doi:10.1371/journal.pone.0003442

7

Bağışık yanıtların baskılanması

- *Karaciğerin tolerojenik ortamı*
  - Karaciğerin tolerojenik ortamı (sinusoidal endotel hücreleri ve Kuppfer hücrelerinin yeterli CD80 ve CD86 eksprese etmeden antijen sunumu yapması toleransa neden olur?)
  - LSEC ve Kuppfer hücreleri tarafından TGF-β ve IL-10 yapımı
  - DC'lerde inhibitör moleküllerin (CTLA-4 ve PD-1) ekspresyonu

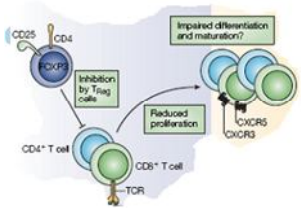


HEPATOLOGY, Vol. 43, No. 2, Suppl. 1, 2006

CTLA-4 ve PD-1 eksprese ederek T-lenfosit inhibisyonu

Bağışık yanıtların baskılanması

- *Treg (Regulatuvar T-hücreleri) aktivasyonu*
  - "core" spesifik Treg tarafından IL-10 yapımı
  - Periferik kanda TGF-β salgılayan Treg



HCV patogenezi: *etkili faktörler*

ÇEVRESEL FAKTÖRLER
(sigara, toz, radyasyon, kirleticiler, vb)

KONAK FAKTÖRLERİ

- Konak bağışık yanıtları
  - *Doğal bağışıklık (ISG, NK, DC, vb)*
  - *Adaptif bağışıklık (CD8 ve CD4 yanıtları, nAb yanıtları)*
  - *Karaciğerin tolerojenik ortamı*
- Konak genetiği ve genetik varyasyonlar
  - *HCV (ko)reseptörleri*
  - *PTR (TLR; RIG-I, vb)*
  - *HLA alleleri*
  - *Diğer konak faktörleri*
- Diğer faktörler *(cinsiyet, yaş,vb)*



Genetik varyasyonlar: *HLA polimorfizmleri*

1

Table 1. HLA associations with viral clearance in primary HCV infection.

Reference	Population studied	Alleles or haplotype	Association	Effect size (Percentage RNA negative vs. RNA positive)	OR, RR or Pc
Alric 1997 [216]	French Caucasoids 103 RNA + 25 RNA –	DRB1*1101 DQB1*0301	Viral clearance Viral clearance	40 vs. 10 84 vs. 31	Pc <0.02 Pc <0.01
Cramp 1998 [217]	Caucasoids Clinic pts vs. HCW 49 RNA +; 55 RNA – 134 controls	DQB1*0301 DQA1*03 DRB1*04 One or more of above 3	Viral clearance Viral clearance Viral clearance Viral clearance	53 vs. 18 51 vs. 18 47 vs. 16 69 vs. 27	OR 5.09 OR 4.69 OR 4.52 NS
Minton 1998 [218]	Caucasoid, 3% Asian 137 RNA + 35 RNA –	DRB1*11 DQB1*0301	Viral clearance Viral clearance	31 vs. 8 51 vs. 24	RR 0.19 RR 075
Mangia 1999 [219]	Italian Caucasoids 149 RNA + 35 RNA –	DRB1*1104 DQB1*0301 DRB1*1104-DQB1*0301	Viral clearance Viral clearance Viral clearance	18.6 vs. 5 53 vs. 29 18.3 vs. 4.8	OR 4.51 OR 4.52 OR 7.38

- Sınıf II
  - DQB*0301 (klirens)
  - DRB1*1101 (klirens)
  - DRB1*0101 (klirens)
- Sınıf I
  - HLA-B27 (klirens)
  - HLA-Cw*04 (perzistans)

Review

Immunological determinants of the outcomes from primary hepatitis C infection

J. J. Post[a,b], S. Ratnarajah[a] and A. R Lloyd[a,c,*]

Cell. Mol. Life Sci. 66 (2009) 733 – 756

Genetik varyasyonlar: *diğer polimorfizmler*

2

- CCR2 (SNP)
- IL-10 promoter
  - 592 AA (klirens) /1082 GG (perzistans)
- ISG'ler
  - MxA (GG 88) (perzistans)
  - OAS-1 (3'-UTR) (perzistans)
- TGF-β promoter

Table 2 List of the genes that differ between non-responders and sustained virological responders (training set)[73]

Gene symbol	Family	Name of the encoded protein	NR/SVR
IFI-6-16	IFN-inducible protein	IFNα-inducible protein 3	3.5
IFI27	IFN-inducible protein	IFNα-inducible protein 27	4.2
ISG15	IFN-inducible protein	IFNα-inducible protein 2	3.7
MX1	IFN-inducible protein	Activating transcription factor 6	2.7
HERC5	IFN-inducible protein	Hect domain and RLD 5	2.2
TGFB2	Growth factor	Transforming growth factor β2	2.7
OAS2	IFN-inducible protein	29-59-Oligoadenylate synthetase 2	1.8
VEGFD	Angiogenesis	Vascular endothelial growth factor D	2.4
IL8	Interleukin	Interleukin 8	3.2
IFIT1	IFN-inducible protein	IFN-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	55.3

Gene expression ratios were compared among non-responder and sustained virological responder liver gene expression values.
IFN, interferon.

Gut 2009;**58**:846–858. doi:10.1136/gut.2008.166348

Review

Immunological determinants of the outcomes from primary hepatitis C infection

J. J. Post[a,b], S. Ratnarajah[a] and A. R Lloyd[a,c,*]

Cell. Mol. Life Sci. 66 (2009) 733 – 756

MicroRNA (miRNA) ve HCV

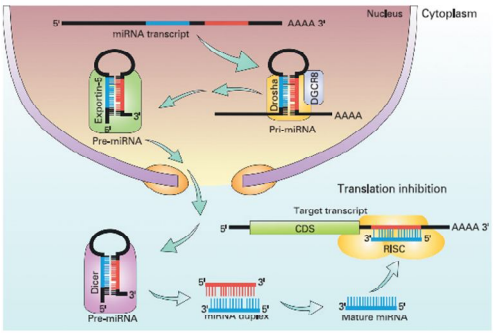


Figure 2 Biogenesis of microRNAs (miRNAs). miRNA is transcribed mainly by RNA polymerase II. The primary transcript (pri-miRNA that can be quite large) is processed ir the nucleus by an enzymatic complex that includes the enzymes Drosha and DGCR8, which leads to the formation of a 70–100 nucleotide hairpin precursor named pre-miRNA This second precursor binds exportin-5 in the nucleus and is transported to the cytoplasm, where it is cleaved by Dicer into mature miRNA. This mature miRNA is incorporated into a ribonucleoprotein complex called the "RNA-induced silencing complex" (RISC), and guides the RISC to the 3′-unstranslated region of the target mRNAs. On the basis of the degree of homology between the miRNA and the mRNA, RISC can inhibit mRNA function by either promoting its degradation or inhibiting its translation. It is believed that each miRNA can target up to 200 mRNAs, and multiple miRNAs can target a given transcript. Therefore, the potential regulatory circuitry afforded by miRNA is extremely complex.

- miRNA:
  - 20-22 nt
  - RNA polimeraz II ve III ile Drosha ve Dicer
  - >700 miRNA (insan)
- Karaciğere özgü miR-122'nin deplesyonu HCV replikasyonunu inhibe ediyor.
- IFN-β miR-122 ekspresyonunu inhibe ediyor.

GUT

Gene expression and hepatitis C virus infection

T Asselah, I Bièche, A Sabbagh, P Bedossa, R Moreau, D Valla, M Vidaud and P Marcellin

Gut 2009;58:846-858; originally published online 11 Dec 2008; doi:10.1136/gut.2008.166348

MicroRNA (miRNA) ve HCV-2

ELSEVIER

Journal of Hepatology 50 (2009) 453–460

Journal of Hepatology

www.elsevier.com/locate/jhep

Regulation of the hepatitis C virus genome replication by miR-199a☆

Yoshiki Murakami[1,*], Hussein H. Aly[1], Atsushi Tajima[2], Ituro Inoue[2], Kunitada Shimotohno[3,4]

Results [redacted] in two cells bearing replicons (replicon cell) HCV-1b [illegible] miRNA inhibition by specific antisense oligonucleotide (ASO) accelerated viral replication. Prior transfection of immortalized hepatocytes which were infected with serum of HCV genotype 1b and 2a-infected patients, with miR-199a* reduced HCV RNA replication activity. Mutation in the miR-199a* target site in the replicon reduced the effect of the miR-199a*. HCV replicon RNA is accumulated to the RNA-induced silencing complex (RISC) when miR-199a* was overexpressed to the replicon cell. This antiviral effect by miR-199a* was independent of the interferon pathway.

Conclusions: The results of this study suggest that miR-199a* directly regulates HCV replication and may serve as a novel antiviral therapy.

Patogenez: *3 temel soru*

- İnfeksiyon nasıl kronikleşiyor?
  - *Bağışık yanıtlardan kaçış ve perzistans*
- Hepatik patolojiler nasıl ortaya çıkıyor?
  - *Hepatit*
  - *Steatoz*
  - *Fibroz / Siroz*
  - *Hepatosellüler karsinom*
- Ekstrahepatik patolojiler nasıl ortaya çıkıyor?

Steatoz

Table 1
Summary of studies regarding hepatic steatosis in hepatitis C virus

Author, year	Patients (n)	Characteristics associated with steatosis (*P*)
Hourigan et al [75]	148	BMI (0.0001), age (0.002)
Rubbia-Brandt et al [23]	101	Genotype 3 (0.002)
Adinolfi et al [45]	180	Genotype 3 (<0.01), BMI in genotype 1 (<0.001), visceral fat distribution (<0.001)
Hickman et al [76]	160	Genotype 3 (0.0001)
Sanyal et al [77]	144	BMI (<0.001), weight (<0.003)
Younossi et al [49]	120	BMI (0.03), genotype 3 (0.03)
Castera et al [27]	151	BMI >25 kg/m^2 (0.02), genotype 3 (0.07)
Patton et al [29]	574	Genotype 3 (<0.03)
Liu et al [78]	95	Hyperglycemia (0.01), BMI >27 kg/m^2 (<0.01)

Abbreviation: BMI, body mass index.

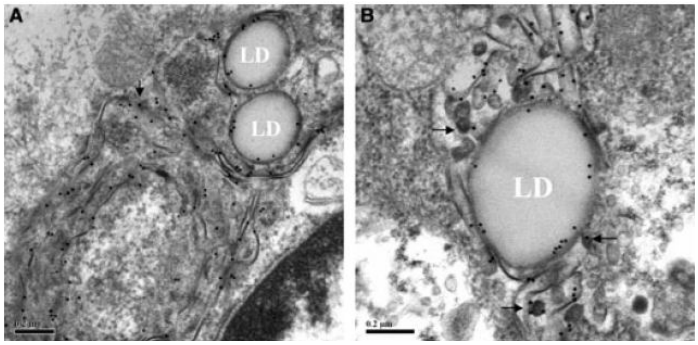
CLINICS IN LIVER DISEASE
Clin Liver Dis 12 (2008) 573–585

Hepatitis C Infection and Nonalcoholic Fatty Liver Disease

Onpan Cheung, MD[a], Arun J. Sanyal, MBBS, MD[b,*]

“Core” ve steatoz

- *HCV “core” proteini “Fatty acid synthase” enzim yapımını arttırır.*
- *Genotip 3a >1b (FAS transkripsiyonunu arttırma yönünden)*



Journal of Viral Hepatitis, 2008, 15, 157–164 doi:10.1111/j.1365-2893.2007.00953.x

REVIEW

Hepatitis C virus core protein, lipid droplets and steatosis

P. Roingeard and C. Hourioux INSERM ERI 19, Université François Rabelais & CHRU de Tours, Tours, France

HCV ve Hepatosellüler karsinom (HSK)

Table 1
Risk factors associated with development of hepatocellular carcinoma in patients who have hepatitis C virus infection

Study	Factor	Risk	Comment
Corrao and Arico [23]	Alcohol	OR = 9.2 (95% CI: 2.0–43.2)	LDAI = 0 g
		OR = 147 (95% CI: 42.1–514.3)	LDAI = 175 g
Tagger et al [37]		Synergy index: 2.4	Alcohol: 41–80 g/d
		Synergy index: 4.0	Alcohol: > 80 g/d
Donato et al [38]		RR = 29.8 (95% CI: 13.3–66.5)	Alcohol: 0–80 g/d
		RR = 66.3 (95% CI: 20.5–214)	Alcohol: > 80 g/d
Donato et al [39]		OR = 55.0 (95% CI: 29.9–101.0)	Alcohol: 0–60 g/d
		OR = 109 (95% CI: 50.9–233.0)	Alcohol: > 60 g/d
Hassan et al [40]		OR = 53.9 (95% CI: 7.0–415.7)	Alcohol: > 80 mL/d
Yuan et al [41][a]		Synergy index: 5.5 (95% CI: 3.9–7.0)	Alcohol: > 4 drinks per day
Donato et al [21]	HBV	OR = 135 (95% CI: 79.7–242)	—
Tagger et al [37]		Synergy index: 2.4	—
Chiaramonte et al [42]		HR = 2.3 (95% CI: 5 1.1–4.6)	—
Yuan et al [41]		OR = 63.9 (95% CI: 8.6–475.3)	—
Yuan et al [41][a]	Diabetes	Synergy index: 4.8 (95% CI: 2.7–6.9)	—
Komura et al [43]		HR = 2.9 (95% CI: 1.5–5.5)	Risk for recurrence of HCV- or HBV-related HCC
Ohata et al [44]	Liver steatosis	RR = 2.81 (95% CI: 1.24–6.37)	—
Pekow et al [45]	Liver steatosis	OR = 6.39 (95% CI: 1.04, 39.35)	—
Kumar et al [46]	Liver steatosis	OR = 1.0 (95% CI: 0.8–1.3; $P = .9$)	—
Bruno et al [47]	HCV genotype 1b	OR = 6.14 (95% CI: 1.77–21.37)	—
Tagger et al [37]		OR = 34.2 (95% CI: 18.0–64.7)	—
Donato et al [38]		RR = 34.3 (95% CI: 13.9–84.2)	—
Silini et al [48]		OR = 1.7 (95% CI: 1.06–2.9)	—
Lopez-Labrador et al [49]		OR = 4.286 (95% CI: 1.437–12.82)	—

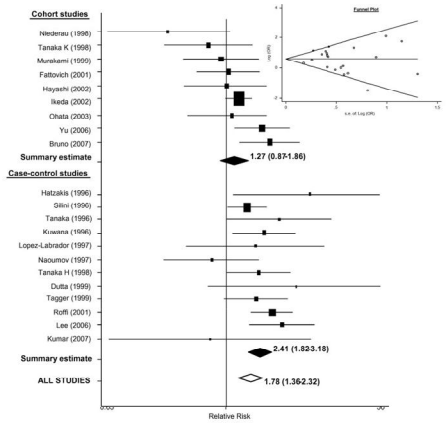
Abbreviations: CI, confidence interval; HR, hazard ratio; RR, relative risk, LDAI, lifetime daily alcohol use.
[a] Includes patients who had HCV, HBV, or both.

HEPATITIS C VIRUS INFECTION AND LIVER CANCER
ELSEVIER SAUNDERS
Clin Liver Dis 12 (2008) 661–674
CLINICS IN LIVER DISEASE

Hepatitis C Virus Infection and Hepatocellular Carcinoma

Wojciech Blonski, MD, PhD[a,b], K. Rajender Reddy, MD[a,*]

HSK-genotip 1b ilişkisi



- HCV tip 1b karaciğer kanserinin ilk evreleri için bağımsız bir risk faktörüdür.

J Hepatol. 2009 Jun;50(6):1142-54.

Çok basamaklı (?) HSK gelişimi

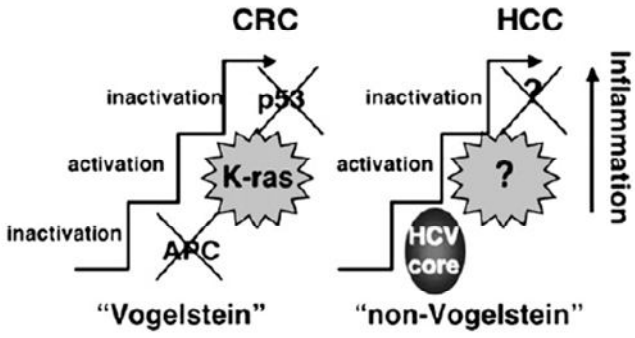


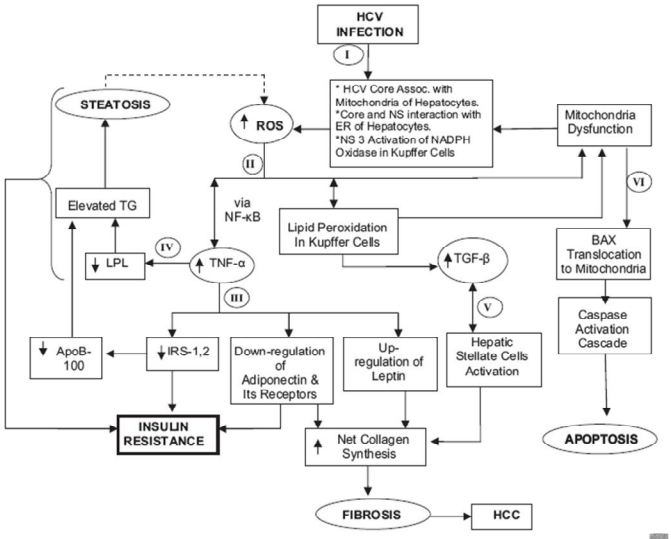
Fig. 2. Mechanism of HCV-associated hepatocarcinogenesis. Multiple steps are required in the induction of all cancers; it would be mandatory for hepatocarcinogenesis that genetic mutations accumulate in hepatocytes. In HCV infection, however, some of these steps might be skipped in the development of HCC in the presence of the core protein. The overall effects achieved by the expression of the core protein would be the induction of HCC, even in the absence of a complete set of genetic aberrations, required for carcinogenesis. By considering such a non-Vogelstein type process for the induction of HCC, a plausible explanation might be given for many unusual events happening in HCV carriers. CRC, colorectal cancer. (*From* Koike K. Molecular basis of hepatitis C virus-associated hepatocarcinogenesis: lessons from animal model studies. Clin Gastroenterol Hepatol 2005;3:S134; with permission.)

ELSEVIER SAUNDERS
Clin Liver Dis 12 (2008) 661–674
CLINICS IN LIVER DISEASE

Hepatitis C Virus Infection and Hepatocellular Carcinoma

Wojciech Blonski, MD, PhD[a,b],
K. Rajender Reddy, MD[a,*]

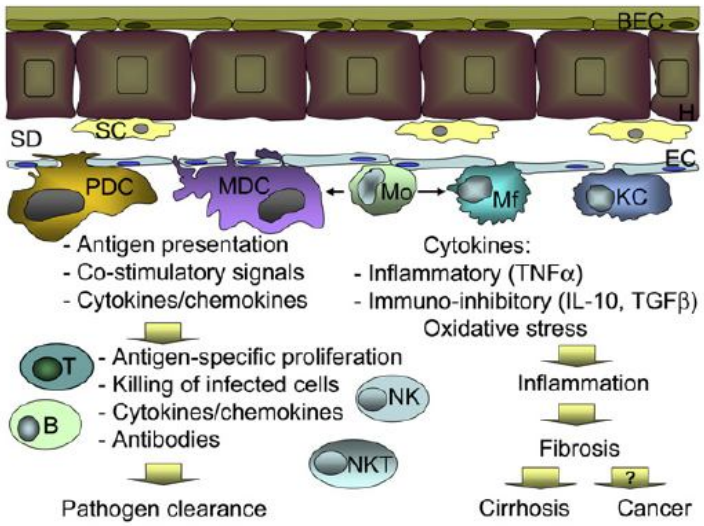
HCV ve oksidatif stress



HEPATOLOGY, Vol. 47, No. 6, 2008

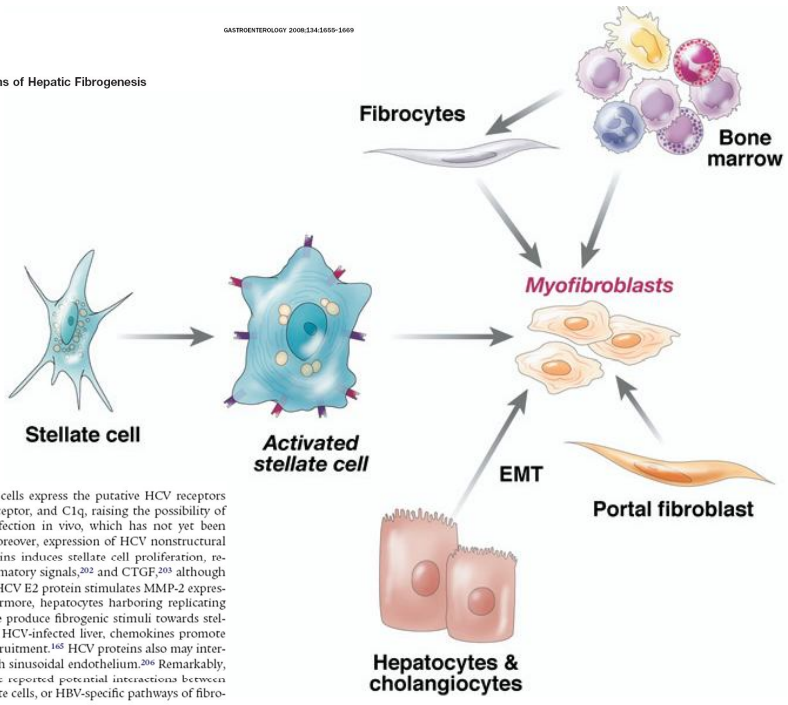
CLINICS IN LIVER DISEASE

Hepatitis C and Innate Immunity: Recent Advances



GASTROENTEROLOGY 2008;134:1655–1669

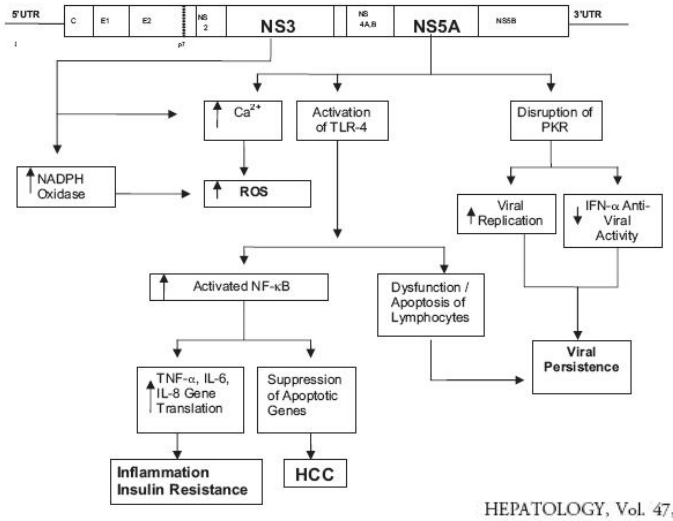
Mechanisms of Hepatic Fibrogenesis



Stellate cells express the putative HCV receptors CD80, LDL receptor, and C1q, raising the possibility of direct HCV infection in vivo, which has not yet been established. Moreover, expression of HCV nonstructural and core proteins induces stellate cell proliferation, release of inflammatory signals,[202] and CTGF,[203] although interaction of HCV E2 protein stimulates MMP-2 expression.[204] Furthermore, hepatocytes harboring replicating HCV in culture produce fibrogenic stimuli towards stellate cells.[205] In HCV-infected liver, chemokines promote lymphocyte recruitment.[165] HCV proteins also may interact directly with sinusoidal endothelium.[206] Remarkably, no studies have reported potential interactions between HBV and stellate cells, or HBV-specific pathways of fibrogenesis.

2

HCV proteinleri ve ER



HEPATOLOGY, Vol. 47, No. 6, 2008

"Core" proteinin moleküler etkileri

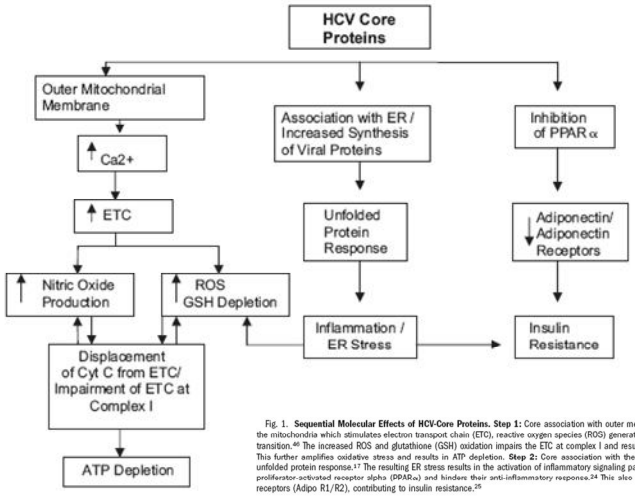


Fig. 1. **Sequential Molecular Effects of HCV-Core Proteins. Step 1:** Core association with outer membrane results in an influx of calcium into the mitochondria which stimulates electron transport chain (ETC), reactive oxygen species (ROS) generation and induces mitochondrial permeability transition.[46] The increased ROS and glutathione (GSH) oxidation impairs the ETC at complex I and results in the displacement of cytochrome C.[14] This further amplifies oxidative stress and results in ATP depletion. **Step 2:** Core association with the endoplasmic reticulum (ER) generates an unfolded protein response.[17] The resulting ER stress results in the activation of inflammatory signaling pathways.[15] **Step 3:** Core inhibits peroxisome proliferator-activated receptor alpha ($PPAR_{\alpha}$) and hinders their anti-inflammatory response.[24] This also inhibits the adipokine, adiponectin, and its receptors (Adipo R1/R2), contributing to insulin resistance.[25]

HEPATOLOGY, Vol. 47, No. 6, 2008

ELSEVIER SAUNDERS

CLINICS IN LIVER DISEASE

Clin Liver Dis 12 (2008) 611–636

Extrahepatic Manifestations of Hepatitis C Virus Infection

Anna Linda Zignego, MD, PhD[a,*], Antonio Craxi, MD[b]

Box 1. Classification of extrahepatic manifestations of hepatitis C virus infection

Association defined on the basis of high prevalence and pathogenesis
Mixed cryoglobulinemia (complete or incomplete clinical syndrome)
B-cell non-Hodgkin's lymphoma

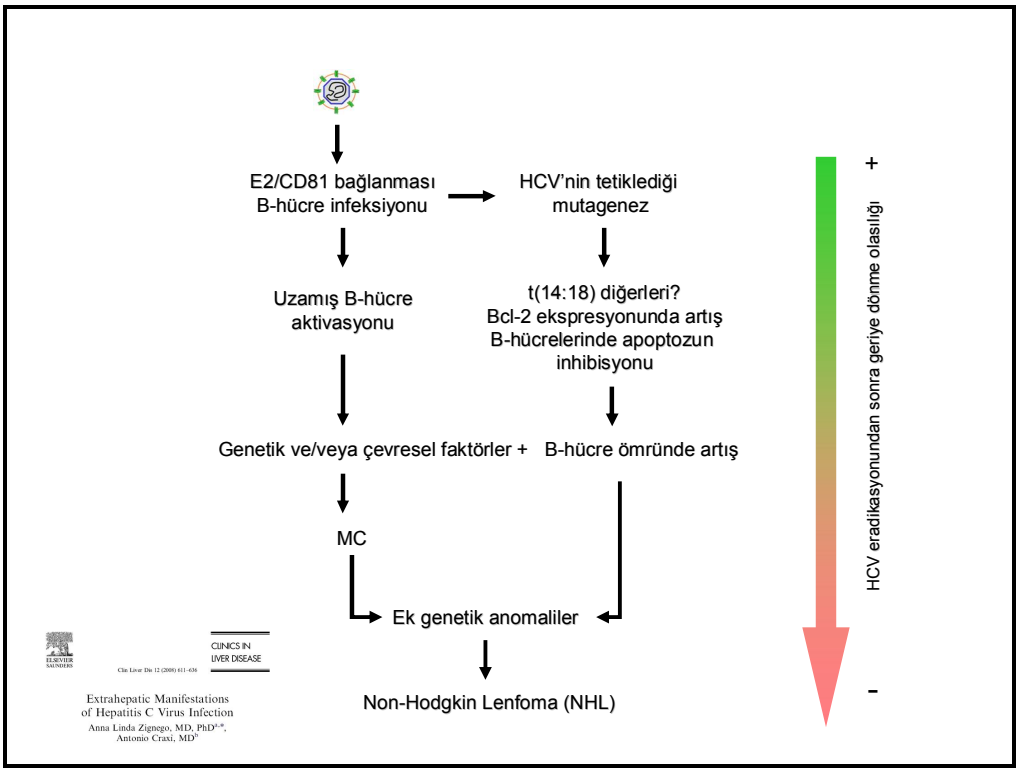
Association defined on the basis of higher prevalences than in controls
Monoclonal gammopathies
Porphyria cutanea tarda
Lichen planus
Diabetes mellitus

Associations to be confirmed/characterized
Autoimmune thyroiditis
Thyroid cancer
Sicca syndrome
Alveolitis–lung fibrosis
Noncryoglobulinemic nephropathies
Erectile dysfunctions
Carotid Atherosclerosis
Psychopathological disorders

Anecdotal observations
Psoriasis
Peripheral/central neuropathies
Chronic polyarthritis
Rheumatoid arthritis
Polyarthritis nodosa
Bechet's syndrome
Myositis/dermatomyositis
Fibromyalgia
Chronic urticaria
Chronic pruritus
Kaposi's pseudosarcoma
Vitiligo
Cardiomyopathies
Mooren corneal ulcer
Necrolytic acral erythema

Miks kriyoglobulinemi
B-hücreli non-Hodgkin Lenfoma

Diabetes mellitus
Tiroiditler



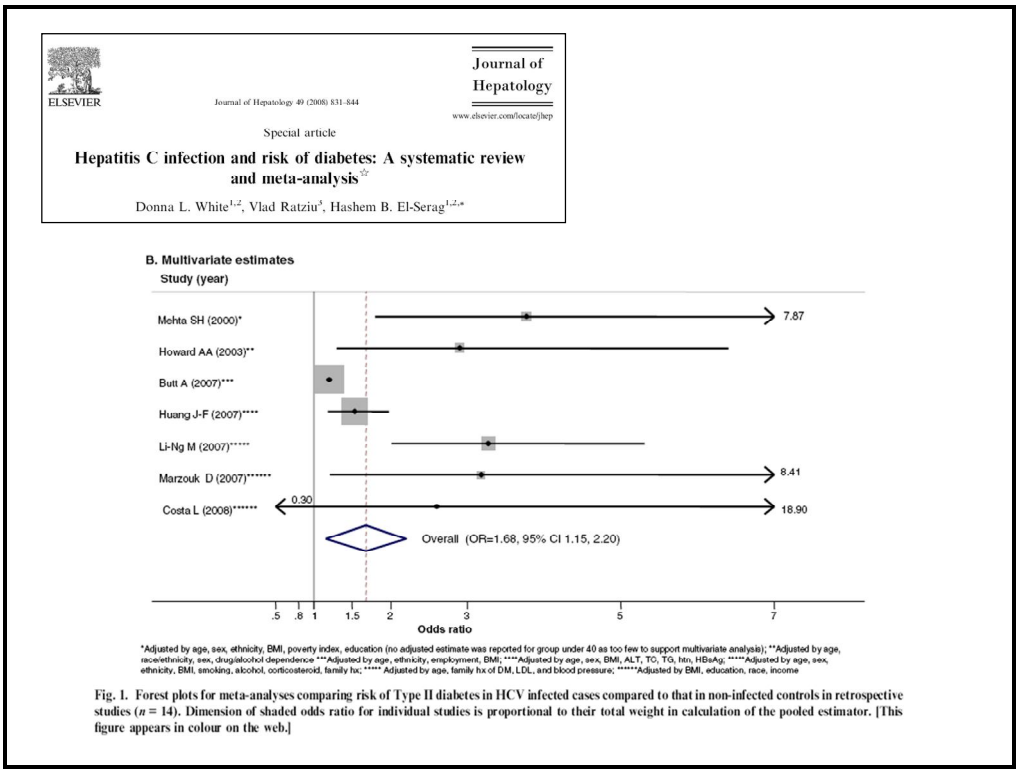
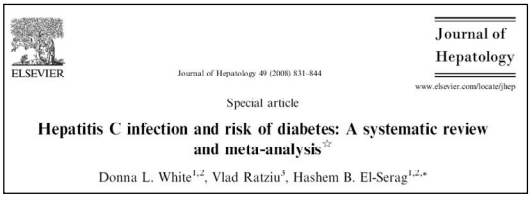


Fig. 1. Forest plots for meta-analyses comparing risk of Type II diabetes in HCV infected cases compared to that in non-infected controls in retrospective studies ($n = 14$). Dimension of shaded odds ratio for individual studies is proportional to their total weight in calculation of the pooled estimator. [This figure appears in colour on the web.]

HCV-T2D ilişkisi

- Virusun insulin sentezine etkisi
  - *"Core" proteininin insulin sinyalizasyonu ile etkileşimi*
    - *IRS-1 fosforilasyonunda ve Akt sinyalinde azalma*
    - *IRS-1 ve IRS-2 degradasyonu*
  - *Adacık hücrelerinin infeksiyonuna bağlı*
- Sitokin (IFN-γ ve TNF-α) yanıtına bağlı
- Siroza bağlı glisemik kontrolün bozulması



ELSEVIER

Journal of Hepatology 49 (2008) 831–844

Journal of Hepatology

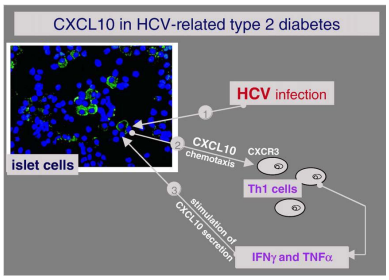
www.elsevier.com/locate/jhep

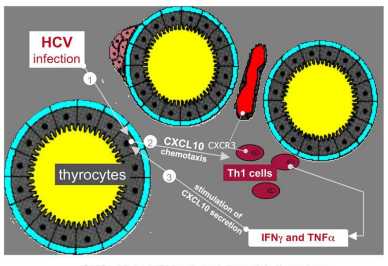
Special article

Hepatitis C infection and risk of diabetes: A systematic review and meta-analysis☆

Donna L. White[1,2], Vlad Ratziu[3], Hashem B. El-Serag[1,2,*]

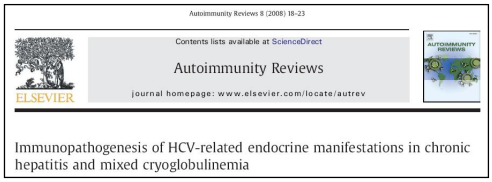
Th1 lenfositler ve sitokin yanıtı





CXCL10 in HCV-related thyroid disorders

- Adacık hücreleri ya da tirositlerin HCV ile infeksiyonu
- CXCL10 salınımında artma
- Th1 lenfosit göçü ve sitokin yanıtı



Autoimmunity Reviews 8 (2008) 18–23

Contents lists available at ScienceDirect

Autoimmunity Reviews

journal homepage: www.elsevier.com/locate/autrev

ELSEVIER

Immunopathogenesis of HCV-related endocrine manifestations in chronic hepatitis and mixed cryoglobulinemia

RETROVİRUSLARIN TRANSFORMASYON MEKANİZMALARI

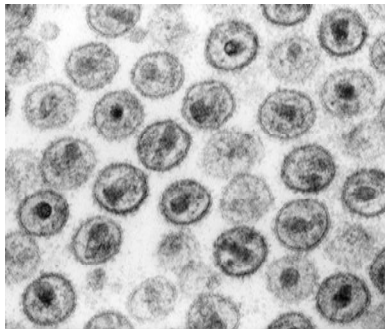
PROF. DR. DÜRDAL US

22 HAZİRAN 2009, 16:20-16:50

RETROVİRUSLARIN TRANSFORMASYON MEKANİZMALARI

Prof.Dr.Dürdal Us
Hacettepe Üni. Tıp Fak. Mikrobiyoloji ve Klin. Mik. AD.
Ankara

Retroviruslar

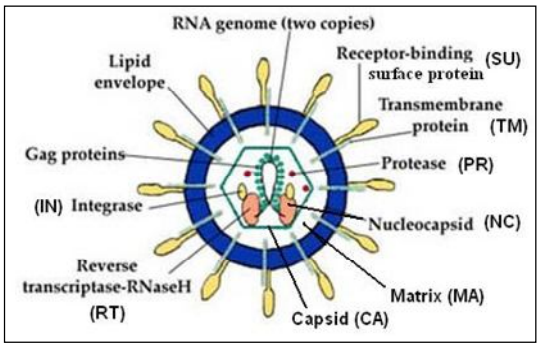


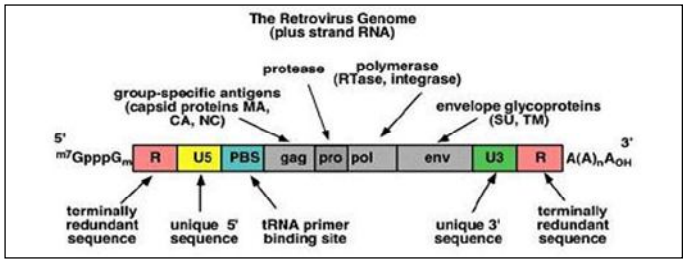
- Zarflı, ikozahedral, diploid tiRNA
- Oncoviruslar
  - Hayvan tümör virusları
    - ALV, MMTV, MLV (morfotip B,C,D)
  - İnsan tümör virusları
    - HTLV-1 & 2 (morfotip C)
- Lentiviruslar
  - HIV (morfotip C)

Retroviridae : Yeni sınıflandırma (2000)

Yeni isim	Örnek	Morfoloji
Alpharetrovirus	Avian leukosis virus (ALV) Rous sarcoma virus (RSV)	Tip C
Betaretrovirus	Mouse mammary tumor virus (MMTV) Mason-Pfizer monkey virus (MPMV)	Tip B Tip D
Gammaretrovirus	Murine leukemia virus (MuLV) Feline leukemia virus (FeLV)	Tip C
Deltaretrovirus	HTLV-1, -2 STLV-1,-2,-3	Tip C
Epsilonretrovirus	Walleye dermal sarcoma virus	-
Lentivirus	HIV-1, -2 SIV Visna/Maedi	Tip C (Konik kor)
Spumavirus	Human foamy virus (HFV)	Tip A (İmmatür)

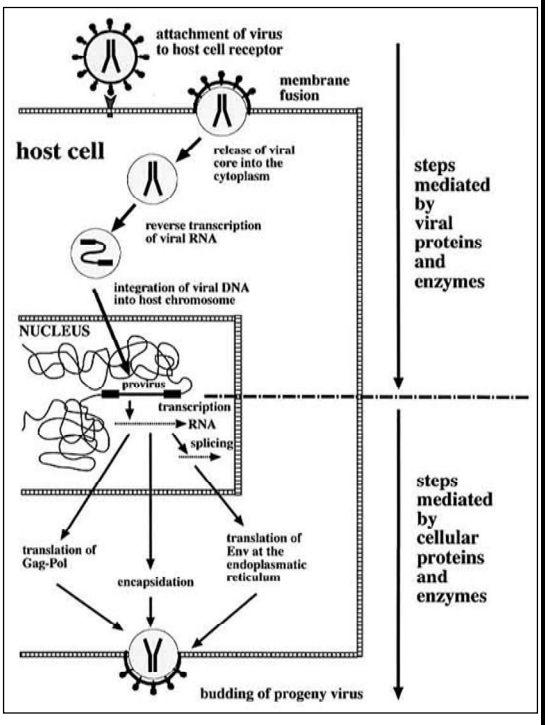
Yapı ve Genom





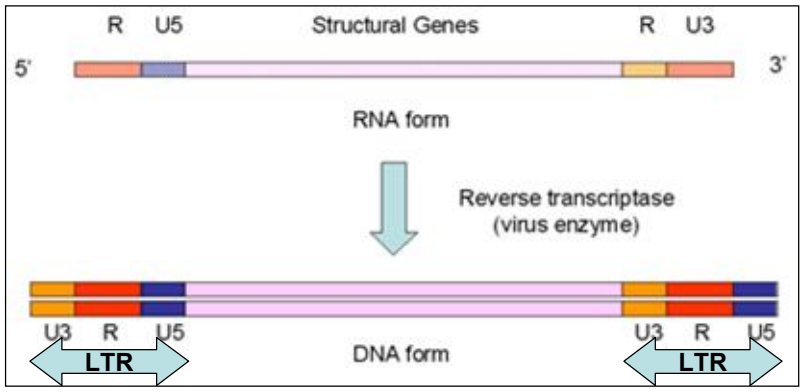
Replikasyon

- Viral RNA (+) iplikli olmasına rağmen enfeksiyondan sonra doğrudan mRNA görevi görmez.
- Ters transkripsiyon sırasında primer olarak, virusun yanında taşıdığı özel bir hücresel (prolyl) tRNA molekülünü kullanılır.



Ters transkripsiyon sırasında LTR bölgeleri oluşur

- Revers transkriptaz (RT), RNA genomunun 5' ucunda tek kopya olarak bulunan U5 bölgesini duplike ederek DNA'nın 3' ucuna, RNA'nın 3' ucunda tek kopya olarak bulunan U3'ü duplike ederek DNA'nın 5' ucuna ekler.



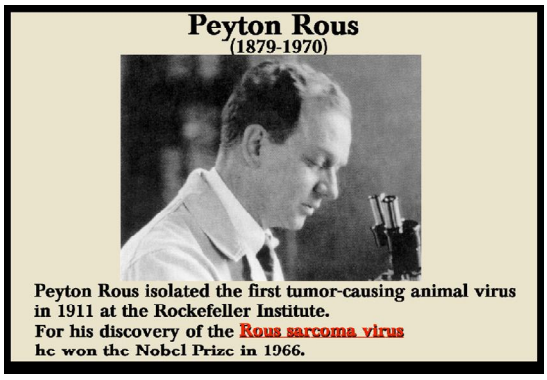
Proviral DNA transkripsiyonunda konak RNA polimerazının kullanım sorunu

- Normal hücrelerde RNA pol II enzimi DNA'dan mRNA sentezi yaparken genin tümünü kopyalamamaktadır.
- Dolayısıyla bu enzim, viral DNA'nın transkripsiyonu sırasında başlama ve bitiş bölgelerinin dışında kalan bölgeleri (sırasıyla U5 ve U3) kopyalamayacaktır.
- Virusun ters transkripsiyon sırasında LTR bölgeleri oluşturması ve LTR bölgeleriyle kromozoma integrasyonu bu sorunu çözmek içindir.
- Bu mekanizma ile kromozoma integrasyon sonrası, viral DNA transkripsiyonu sırasında virusun dizi kaybı önlenmiş olur.
- Tek ve uzun bir parça halinde sentezlenen viral mRNA'nın da kesilerek işlenmesi gereklidir.

Retroviruslar ve kanser: Tarihçe

- **1911**→ Peyton Rous → Tavuk tümör virusunun tanımlanması (Nobel ödülü, 1966)
- **1963** → Howard Temin → Retroviruslarda ters transkripsiyon hipotezi ve provirus konsepti
- **1969** → Huebner & Todaro → Viral onkogen hipotezi
- **1970** → Temin & Baltimore → Revers transkriptaz enziminin tanımlanması (Nobel ödülü; 1975)
- **1979** → Poiesz & Robert Gallo → İlk insan retrovirusunun (HTLV-1) tanımlanması
- **1981** → Kalynaraman → HTLV-2'nin tanımlanması
- **1983** → Gallo & Montagnier → HIV'in tanımlanması (Nobel ödülü; 2008)

- Dr.Rous, doku aktarımı ile tavuk tümörlerinin sağlıklı hayvanlara bulaştırılabildiğini göstermiş ve etkeni izole ederek kanser oluşturan ilk retrovirusu tanımlamıştır. (Rous Sarcoma virus; RSV)
- RSV'un, klasik retrovirus genomuna ek olarak, onkojenik potansiyele sahip ekstra bir gen daha içerdiği saptanmıştır. (onkogen)
- Daha sonra birçok retrovirusun çeşitli onkogenlere sahip olduğu gösterilmiş ve bu onkogenlerin normal hücrelerde homolog kopyalarının olduğu bulunmuştur.

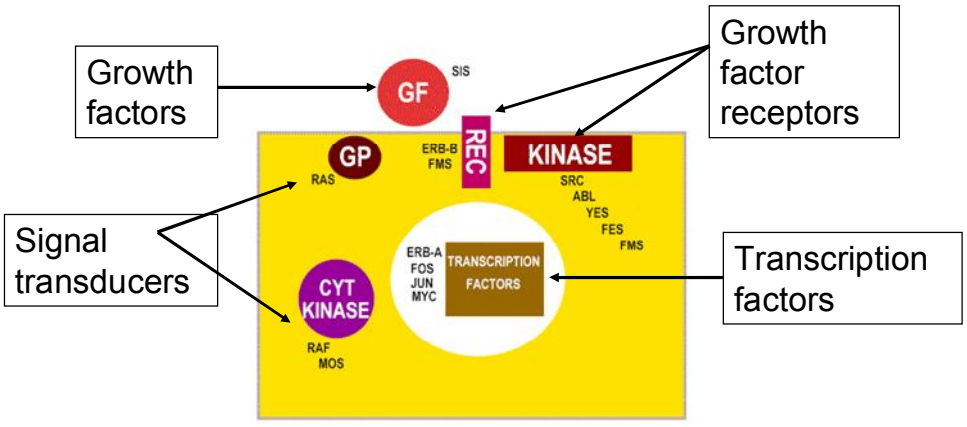


ONKOGENLER

- Normal bir hücreyi kanser hücresine dönüştürme potansiyeli olan proteinleri kodlayan genlerdir.
- Bir onkogen hücreye bir virus tarafından taşınabilir. (viral onkogen: v-onc)
- Onkogenler normal hücrelerde de bulunur ve kontrollü olarak düşük düzeyde ekprese edilirler. (hücresel -proto- onkogen = c-onc)
- c-onc. mutasyonları ya da regülasyon bozuklukları hücrenin transformasyonuna yol açar.

Hücresel –proto-onkogenler (c-onc)

- Hücre çoğalma ve farklılaşmasının kontrolünde rol alan proteinleri kodlarlar



FUNCTION OF PROTO-ONCOGENE-ENCODED PROTEINS	EXAMPLE
Control of DNA transcription (found in nucleus)	***myc***
Signaling of hormone/growth factor binding such as a tyrosine kinase	***src*** is a membrane-bound tyr kinase.
GTP-binding proteins involved in signal transduction from a surface receptor to the nucleus	***ras***
Growth factors	***sis*** is an altered form of platelet-derived growth factor B chain
Growth factor receptors	***erb*-B** is a homolog of the epidermal growth factor receptor (it is also a tyrosine kinase). ***fms*** is a homolog of the macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) receptor

Retroviral onkogenler (v-onc)

- Hücre kaynaklıdırlar → Hücre kromozomundan çıkarken rekombinasyon yoluyla alınırlar
- Normal hüc.de homolog karşılıkları vardır.
- Viral replikasyon için gerekli değildirler
- LTR içerirler (c-onc, LTR içermez)
- İntronları yoktur (“spliced-cellular” mRNA kaynaklı)
- C-onc’lerden değişik düzeylerde (nokta mutasyonlarından gen delesyonuna kadar) farklılık gösterirler. Bu durum transformasyon kapasitelerini etkiler.

Retroviruslar 3 temel mekanizma ile tümör oluşumuna neden olurlar

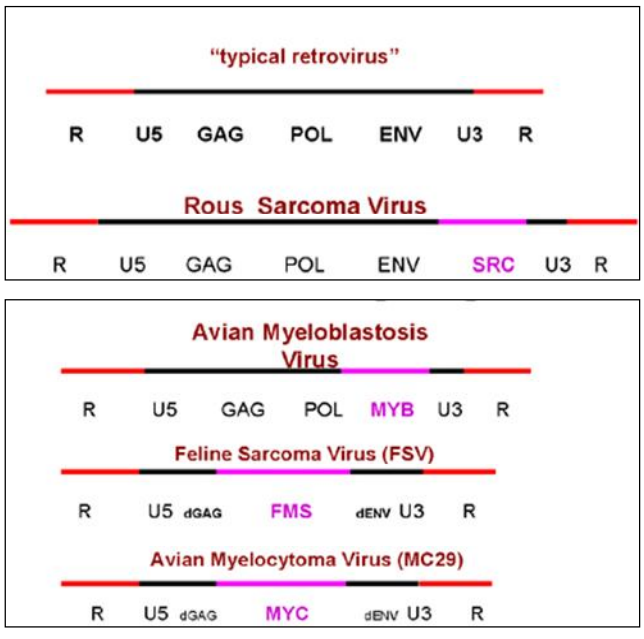
1) Akut transformasyon (Transducing retroviruses)
2) Kronik transformasyon (Cis-acting retroviruses)
3) Transaktivasyon (Trans-activating retroviruses)

Virusun kategorisi	Tümör latentlik süresi	Tümör oluşum riski	Onkojenik mekanizma	Viral genom; replikasyon durumu
Akut transformasyon yapanlar	Kısa (günler)	Yüksek (>%90)	Viral genomda v-onc varlığı	Eksik; Replikasyon-defektif
Kronik transformasyon yapanlar	Orta (haftalar, aylar)	Orta-yüksek	Provirus insersiyonu ile c-onc aktivasyonu	Tam; Replikasyon-kompetan
Transaktivasyon yapanlar	Uzun (aylar, yıllar)	Düşük (<%5)	Virusun kodladığı transkripsiyonel regülatör protein	Tam; Replikasyon-kompetan

Akut transformasyon yapan retroviruslar

- V-onc taşırlar
- Kromozoma rastgele pozisyonlarda integre olurlar.
- V-onc'ler, hücre proliferasyon faktörlerine homolog ürünler kodlayarak hücre döngüsü kontrolünün bozulmasına yol açar.
- Bugüne dek insanlar için akut transformasyon yapan retrovirus tanımlanmamıştır.

- Akut transformasyon yapan retrovirusların genomları eksiktir. Zira v-onc transdüksiyonu, bazı viral genlerin delesyonuna neden olur.
- Bu viruslar defektiftirler ve replikasyon için yardımcı bir retrovirusun yardımına gereksinim duyarlar.
- Bir istisna: Rous sarcoma virus→ RSV normal genomun yanı sıra ekstra bir gen taşır (*src*=sarcoma)
  - *c-src* ve *v-src* arasındaki en önemli fark → kinaz aktivitesi (~20X)



Akut Transformasyon Yapan Bazı Retrovirus Onkogenleri

REPRESENTATIVE VIRAL ONCOGENES

Oncogene	Origin	Species	Cellular function
v-abl	Abelson murine leukemia virus	Mouse	Tyrosine kinase
v-erbB	Avian erythroblastosis virus	Chicken	EGF receptor
v-fos	FBJ osteosarcoma virus	Mouse	Transcription factor
v-myc	Avian myelocytomatosis virus	Chicken	Transcription factor
v-Ha-ras	Harvey murine sarcoma virus	Mouse	GTP-binding protein
v-sis	Simian sarcoma virus	Monkey	Platelet-derived growth factor
v-src	Rous sarcoma virus	Chicken	Tyrosine kinase signal protein

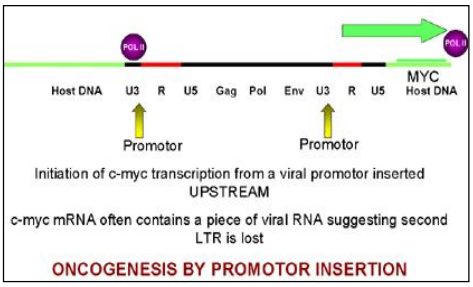
Copyright © 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

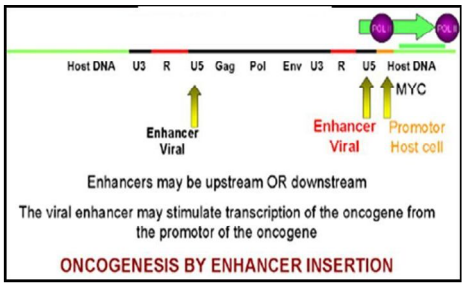
Kronik transformasyon yapan retroviruslar

- Onkogen taşımazlar.
- Genomları tamdır, defektif değildirler.
- Kromozomda belirli bir c-onc yanına integre olurlar.
- Proto-onkogenlerin aktivasyonuna ya da tümör süpresör genlerin inaktivasyonuna yol açarlar.
  - Örn. ALV (Avian leukosis virus) integrasyonu *myc* genini; MMTV ise (mouse mammary tumour virus) *int* genini aktive eder.
- Onkogenez yavaştır.

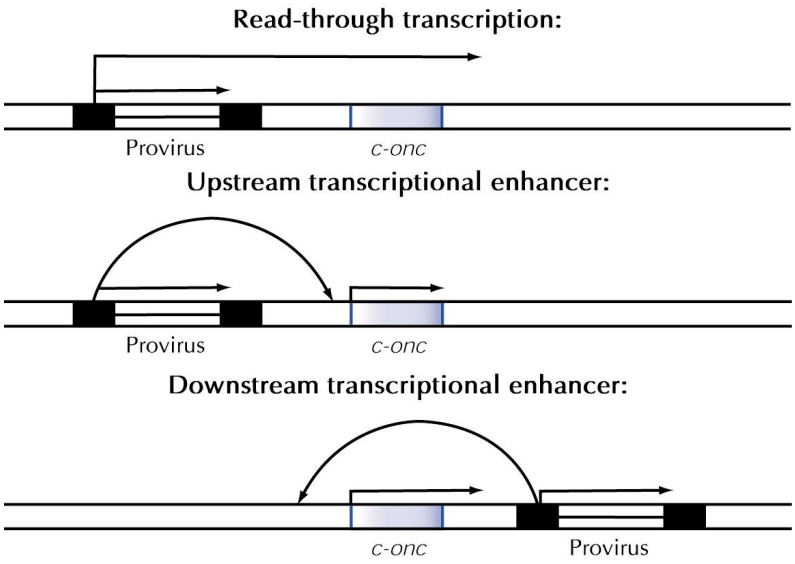
İnsersiyonel aktivasyon

- C-myc yanına integrasyon → C-myc, viral promotorun kontrolü altında yüksek düzeyde eksprese edilir
  - Provirus, c-onc promotorunun önüne (upstream) integre olarak proto-onkogenin transkripsiyonunu artırabilir (read-through transcription)
  - Provirus, c-onc promotorunun arkasına (downstream) veya önüne ters pozisyonda integre olabilir. Virus promotorundaki "enhancer" diziler proto-onkogenin transkripsiyonunu artırır.





Insertional Activation



Transaktivasyon yapan retroviruslar

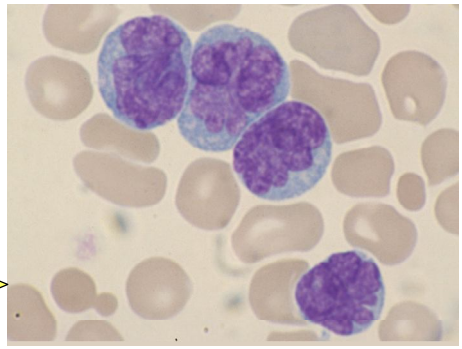
- Onkogen taşımazlar.
- Transformasyon, viral genom tarafından kodlanan transaktivatör bir proteinin (tax) etkisiyle olur.
- HTLV (Human T cell Leukemia Virus) tip 1 ve 2 →
  - CD4+ T lenfositlerine tropizm gösterirler, ancak diğer hücreleri de enfekte edebilirler.

HTLV-I & HTLV-II ile ilişkili klinik sendromlar

HTLV-1	HTLV-2
Adult T-cell leukemia/ lymphoma	Atypical hairy cell leukemia?
	Large granular lymphocytic leukemia?
HTLV associated myelopathy	Myelopathy, cerebellar ataxia
Mycosis fungoides?	Mycosis fungoides?
Increased susceptibility to infections	Increased susceptibility to infections
Polymyositis	Myositis
Uveitis	
Arthropathy	
Sjogren's syndrome	
Pulmonary syndrome, alveolitis	
Infectious dermatitis	

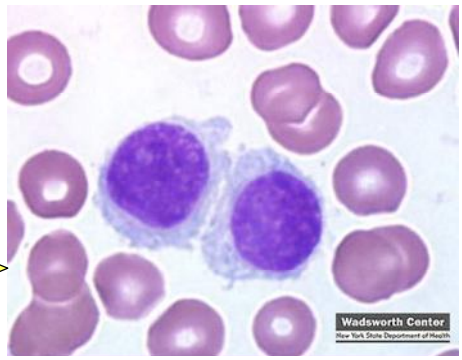
- HTLV-1 → Erişkin T hücre lösemisi (Adult T cell leukemia; ATL)

ATL'de "çiçek hücreler"



- HTLV-2 → Saçlı hücre lösemisi (Hairy cell leukemia; HCL)

HCL'de "saçlı hücreler"



ADULT T-CELL LEUKEMIA/LYMPHOMA ASSOCIATED WITH HTLV-1 INFECTION IN A BRAZILIAN ADOLESCENT

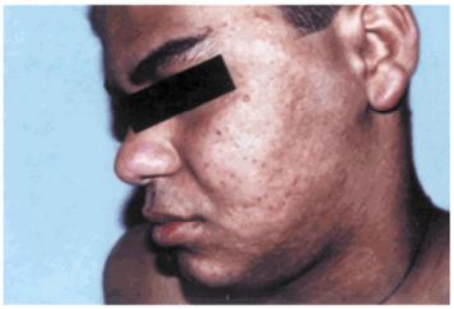


Fig. 1 - Erythematous infiltrating lesions on the face.

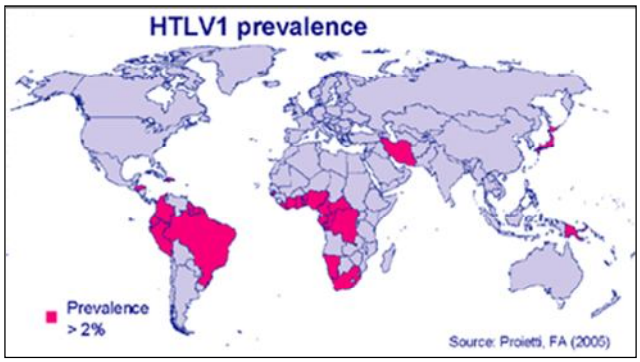


Fig. 2 - Papulotuberous cutaneous lesions in the upper limbs and torso.

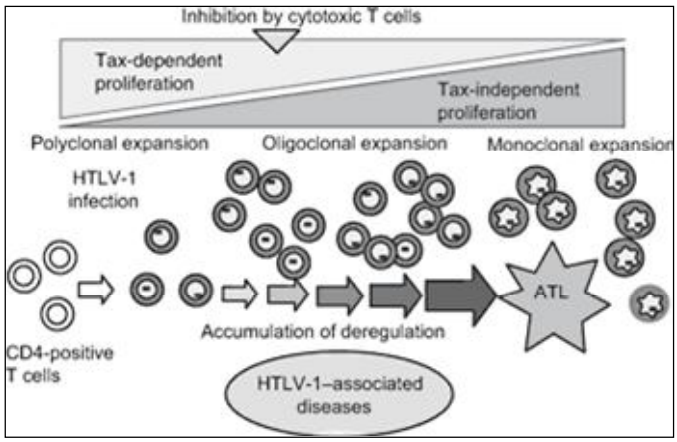
Rev Inst Med Trop S.Paulo 2001; 43 (5)

HTLV-1 Epidemiyolojisi

- G.Japonya, G.Amerika, Karaipler ve Afrika'nın bazı bölgelerinde endemiktir.
- Bulaşma→ Cinsel temas, IV ilaç kullanımı, kan transfüzyonu, anne sütü
- Olguların çoğu asemptomatiktir.
- Taşıyıcılarının ~%2-5'inde enf.dan 20-40 yıl sonra lösemi gelişir

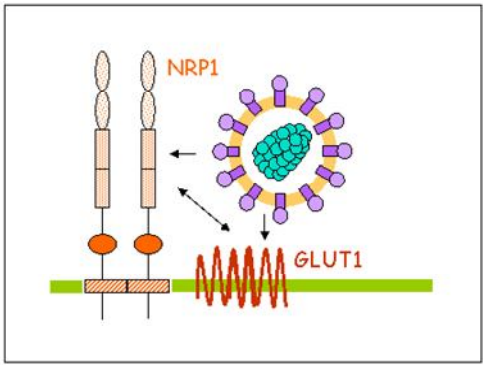


- ATL insidansının düşük olması ve klinik latentlik döneminin uzun sürmesi, T hücre transformasyonunun çok sayıda hücresel değişiklik ve mutasyonların birikimine bağlı olduğunu düşündürmektedir.



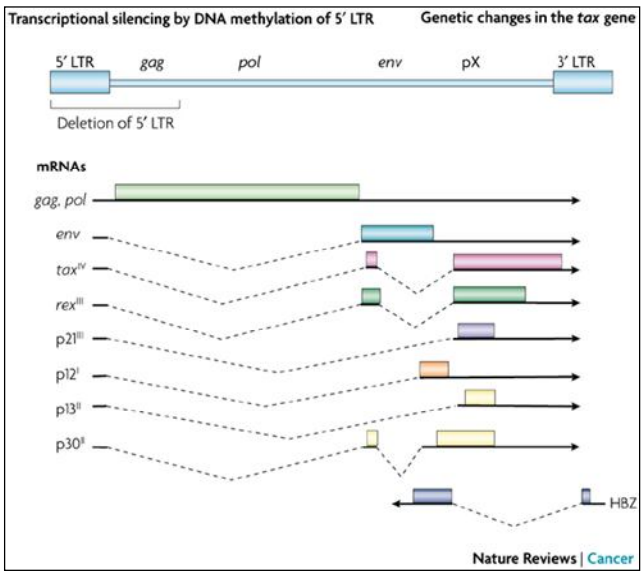
HTLV1 hücre reseptörleri

1) GLUT1 → Hücrelerde çok yaygın olarak bulunan glukoz taşıyıcısı
2) Neuropilin (NRP)-1 → Semaforin (akson motilite regülatörü) ve VEGF (anjiogenez faktörü) reseptörü



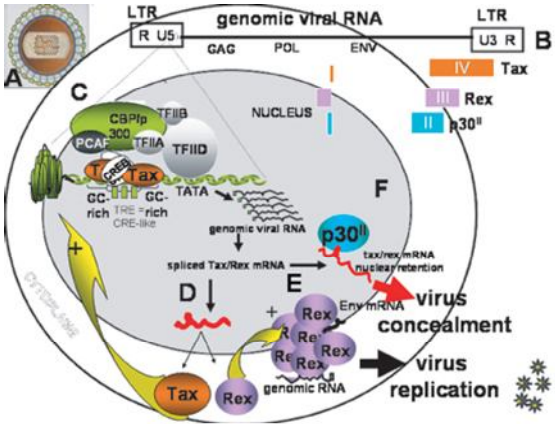
Manel et al. Cell 2003; 115:449
Ghez,Lepelletier,Lambert, et al. J Virol 2006; 80: 6644

HTLV-1 genomu



HTLV-I replikasyonu

A) Morfoloji
B) Genom
C) Transkripsiyon kompleksi
D) Tax sentezi ve tax'ın transkripsiyon faktörlerini aktive etmesi
E) Rex sentezi ve rex'in env mRNA ve genomik RNA'ları sitoplazmaya taşıması
F) $p30^{II}$ proteininin Tax/Rex mRNA'sını çekirdekte tutması (negatif regülatör)



Nicot C, et al. *Nat Med* 2004; 10: 197.

Tax ve Onkogenez

- Tax, 40 kDa büyüklüğünde bir fosfoproteindir.
- Viral replikasyon için gereklidir.
- HTLV genomunun transkripsiyonel aktivatörüdür.
- Viral genlerin transkripsiyonunu artırdığı gibi hücresel transkripsiyon faktörleri ve sinyal molekülleri ile ilişkiye girerek hücresel genlerin de transkripsiyonunu artırır.

Life, Death, and Tax: Role of HTLV-I Oncoprotein in Genetic Instability and Cellular Transformation*

Published, JBC Papers in Press, April 16, 2004,
DOI 10.1074/jbc.R400009200

Kuan-Teh Jeang‡§, Chou-zen Giam¶, Franca Majone‖, and Mordechai Aboud**

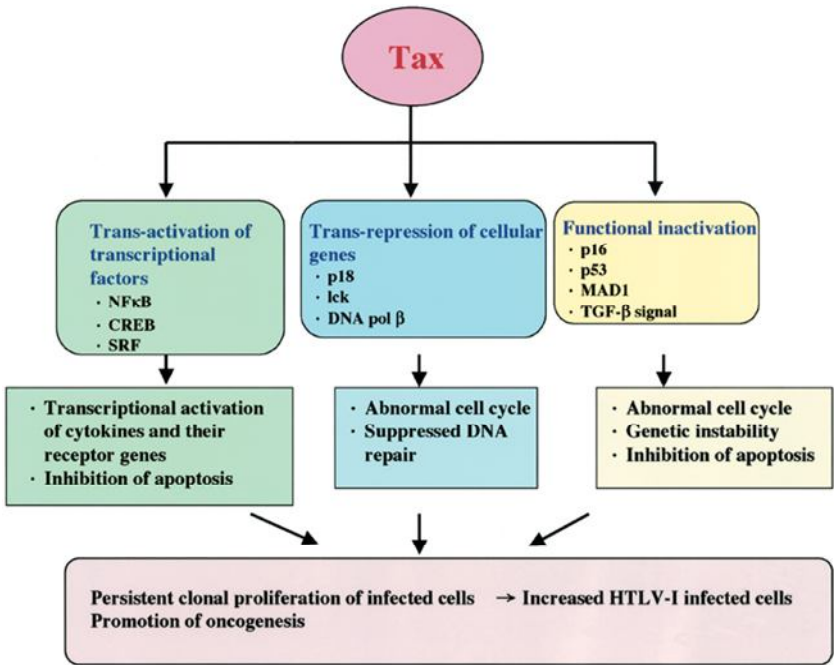
*From the ‡Laboratory of Molecular Microbiology, NIAID, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20892, ¶Department of Microbiology, Uniformed Services University of the Health Sciences, Bethesda, Maryland 20814, ‖Department of Biology, University of Padua, Padua, Italy, and **Department of Microbiology, Ben-Gurion University, Be'er Sheva 84105, Israel*

J Biol Chem 2004; 279:31991

Tax tarafından modüle edilen hücresel olaylar

Activated by Tax	Consequences
Cell-cycle phase activators (CDK2 and CDK4; cyclin D2; cyclin D3; WAF1; E2F1)	Accelerated G1–S progression and DNA hyper-replication
Growth receptors and proliferative factors (IL2 and IL15; IL2Rα and IL15Rα; telomerase; PCNA)	Increased cellular proliferation and decreased NER DNA repair
Transcription factors (CREB; AP1; SRF)	Increased cellular proliferation
Survival factors (Akt; NFκB)	Suppression of apoptosis and/or senescence; aneuploidy
Centrosome amplification (RANBP1; TAX1BP2)	Aneuploidy
Inactivated by Tax	
Cell-cycle phase inhibitors (p15, p16 and p18; RB; DLG1)	Increased cell-cycle phase transition
DNA repair factors (DNA polymerase β; MMR)	Increased ambient DNA breaks and microsatellite instability
DNA damage response (p53; CHK1; CHK2; telomerase; KU80)	Suppression of apoptosis and/or senescence; abrogation of tumorigenesis barrier
Chromosome instability checkpoint (MAD1; CHK1)	Aneuploidy

AP1, activator protein 1; CDK, cyclin-dependent kinase; CHK1, checkpoint kinase 1; CHK2, checkpoint kinase 2; CREB, cyclic AMP responsive element binding protein; DLG1, discs large homologue 1; IL, interleukin; IL15Rα, interleukin 15 receptor α; IL2Rα, interleukin 2 receptor α; MAD1, mitotic arrest deficiency protein 1; MMR, mismatch repair; NER, nuclear excision repair; NFκB, nuclear factor κB; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; RANBP1, Ran-binding protein 1; RB, retinoblastoma; SRF, serum response factor (also known as MCM1); TAX1BP2, Tax-binding protein 2.

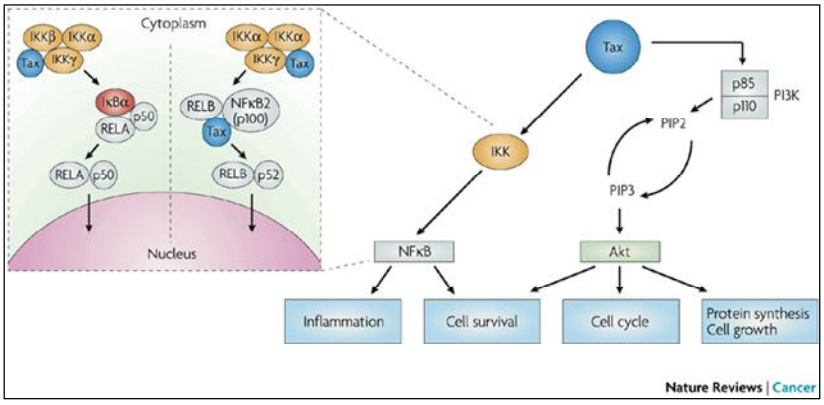


Matsuoka M. *Oncogene* 2003; **22:** 5131

Tax, seçici olmayan (geniş etkili) bir transaktivatördür

- NF-κB/IκB komplekslerini parçalayarak NF-κB aktivasyonu yapar. (NFκB: Nüklear Faktor κB, IκB: NFκB inhibitörü)
- Tax, birçok hücresel regülatör faktörün transkripsiyonunu artırır:
  - IL-2 receptor α
  - Interlökinler (IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, GM-CSF)
  - Platelet-derived growth factor
  - Tumor growth factor β1
  - MHC class I
  - c-myc
  - c-fos
  - Parathyroid hormone-related protein

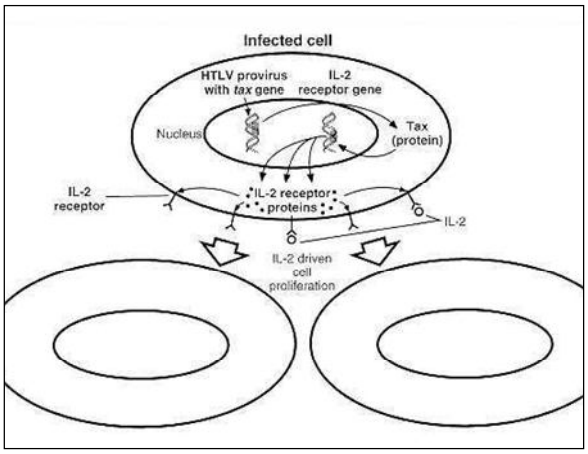
NFκB aktivasyonu



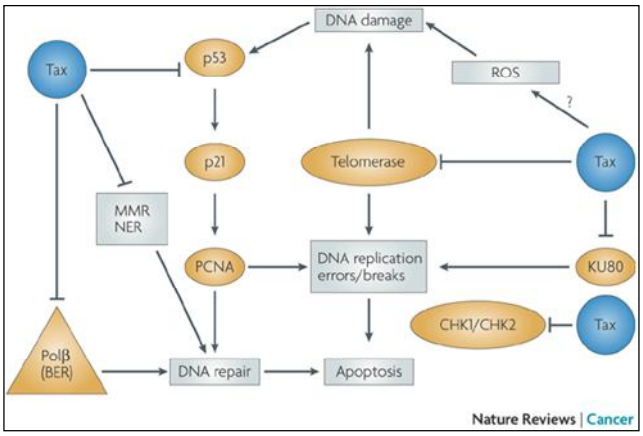
- Tax, NFκB'yi 2 yoldan aktive eder: 1) IKK kompleksi üzerinden RELA–p50 NFκB kompleksinin çekirdeğe göçü (standart yol), 2) IKK–p100 kompleksi üzerinden RELB–p52 NFκB kompleksinin çekirdeğe translokasyonu. (RELA, RELB, p100, p52, p50: NFκB protein ailesinin üyeleri; IKK: Inhibitor of NF-κB kinase)
- Tax ayrıca, fosfatidil-inositol 3-kinaz (PI3K)'ı doğrudan etkileyerek Akt sinyal yolağını da aktive eder.

Tax, T lenfosit proliferasyonunu artırır

- **IL-2 reseptör geni transkripsiyonunun aktivasyonu**
- **IL-2 geninin transaktivasyonu**



Tax, hücresel DNA harabiyetine yol açar



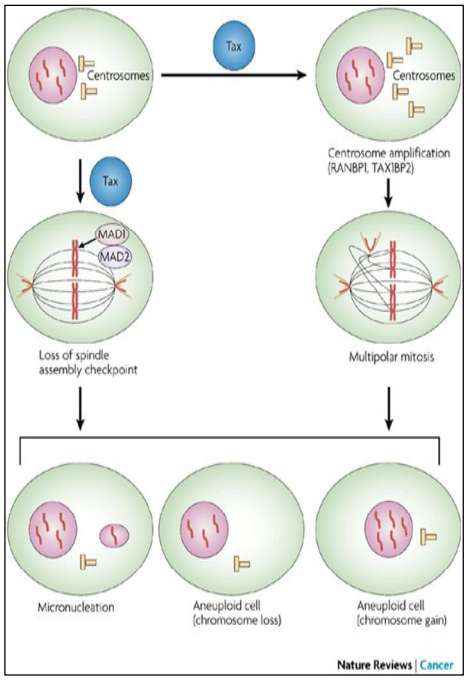
- Tax, p53 kontrolünün kaybına ve hücresel DNA onarımı yapan proteinlerin (NER, BER, MMR) fonksiyonlarının bozulmasına yol açar.
- Tax, telomeraz, CHK1/CHK2 ve KU80 aktivitelerini azaltarak DNA harabiyetine neden olur.

(NER: Nucleotide excision repair; BER: Base excision repair; MMR: Mismatch repair; CHK: Checkpoint kinase; KU80: Double strand break (DSB)-end protecting protein; ROS: reactive oxygen species; PCNA: Proliferating cell nuclear antigen; Pol: DNA polymerase)

Tax, mitoz hataları oluşturur

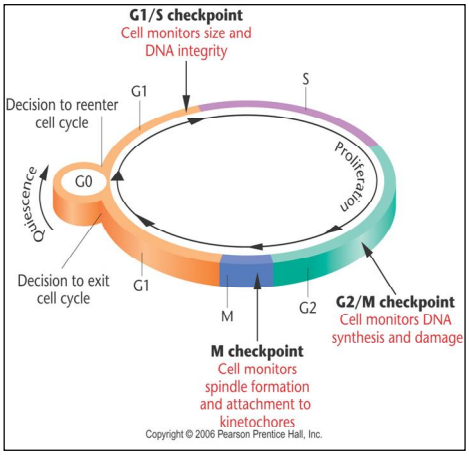
- Tax, TAX1BP2 ve RANBP1 proteinlerini etkileyerek sentrozomların amplifikasyonuna ve multipolar mitoza neden olur. Sonuçta kromozom kaybı veya artışı sonucu anöploid hücreler oluşur.
- Tax, MAD1 proteinine bağlanarak iğ iplikçiklerinin oluşumunu bozar. Bunun sonunda, hatalı ayrılan kromozomların oluşturduğu küçük kesecik (mikronükleus) meydana gelir.

(SAC: spindle assembly checkpoint; TAX1BP2: centrosome-associated protein; MAD: mitotic arrest-defective protein)



Tax, hücre döngüsünü bozar

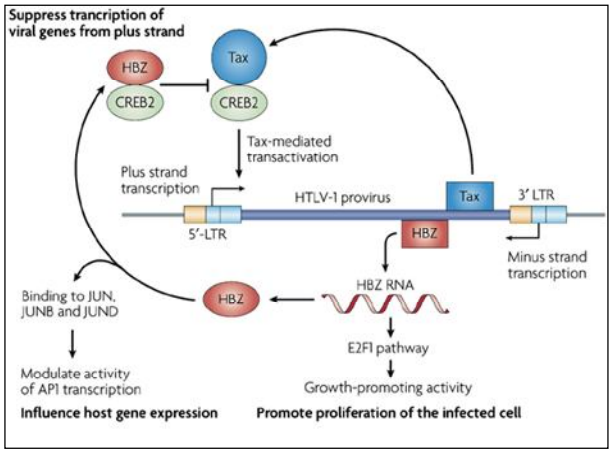
- p53 inaktivasyonu → G1/S kontrol noktasında sınırlamanın kalkması
- Siklin D, cdk-2,-4 ve -6 aktivasyonu → Rb fosforilasyonu→ G1/S geçişinin indüksiyonu
- MAD1'e bağlanma → hücre döngüsünde G2/M safhasının bozulması



HBZ proteini

- HTLV-1 bZIP (basic leucine zipper factor)
- Provirusun komplementer zinciri tarafından kodlanır (antisense-encoded gene).
- Tax ile ilişkili viral transkripsiyonu azaltır.
- Lösemili hücrelerde eksprese edilen tek regülatör proteindir. Bu nedenle onkogenezin geç safhalarında rol oynadığı düşünülmektedir.
- Yapılan çalışmalar HBZ proteininin, CD4+ T hücrelerinin proliferasyonundan ve in-vivo viral persistanstan sorumlu olduğunu göstermiştir.

Gaudray G, et al. J Virol. 2002;76:12813
Satou Y, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2006; 17;103:720
Mesnard JM, et al. Blood 2006; 108: 3979
Usui T, et al. Retrovirology 2008; 5: 34

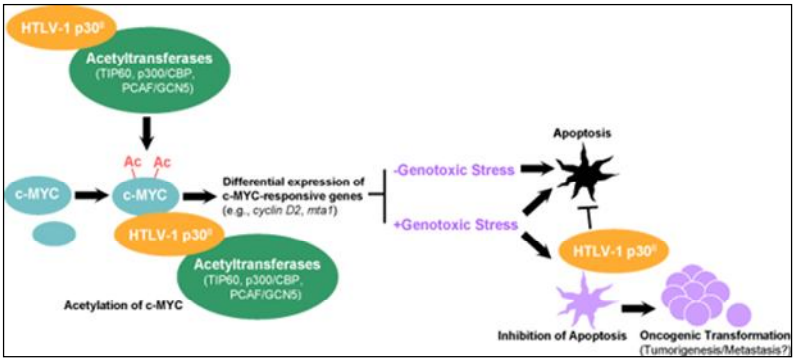


- HBZ RNA'sının E2F1 transkripsiyon faktörü üzerine etkisi ile enfekte hücrelerin proliferasyonu artar.
- HBZ proteini AP1 transkripsiyonunu artırarak konak genlerinin ekspresyonunu etkiler.
- HBZ proteininin, Tax'ın pozitif transkripsiyonel etkisi üzerinde antagonistik etki gösterdiği düşünülmektedir.

(CREB: cyclic AMP responsive element binding protein; AP: activating protein; HBZ: basic leucine zipper factor; E2F1: transcription factor)

$p30^{II}$ proteini

- HTLV-1'in aksesuar proteini
- C-MYC proteini ile etkileşerek c-MYC proliferatif yanıt genlerini transaktive eder ve transformasyonu indükler
- Apoptozisi inhibe ederek enfekte hücrelerin çoğalmasını sağlar



Awasthi et al. Mol Cell Biol 2005; 25:6178

Kaynaklar

- Maeda N, Fan H, Yoshikai Y. Oncogenesis by retroviruses: old and new paradigms. Rev Med Virol. 2008;18:387
- Burmeister T. Oncogenic retroviruses in animals and humans. Rev Med Virol. 2001;11:369-80
- Macnab JCM, Onions D. Tumor viruses. http://gsbs.utmb.edu/microbook/ch047.htm
- Matsuoka M, Jeang K-T. Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. *Nature Reviews Cancer 2007;* 7: 270
- Yasunaga J, Matsuoka M. Human T-cell leukemia virus type I induces adult T-cell leukemia: from clinical aspects to molecular mechanisms. Cancer Control. 2007;14:133

VİRUSLARDA LATENTLİK MEKANİZMALARI

DOÇ. DR. AHMET PINAR

22 HAZİRAN 2009, 16:50-17:20



SUNUM PLANI

- Viral Enfeksiyon Türleri
- Viral Persistans Stratejileri
- Viral Persistansın Önemi
- Latentlik Stratejileri
- Latent Enfeksiyona Neden Olan Viruslar



Viral Enfeksiyon Türleri



- Akut Enfeksiyon
- Persistan Enfeksiyon
  - Kronik Enfeksiyon
  - Latent Enfeksiyon
- Persistan enfeksiyon = Etken virusun bağışıklık sistemi tarafından temizlenememesi

Viral Enfeksiyon Türleri

- Kronik Enfeksiyon
  - Uzun süre enfeksiyöz virus atılımı ile karakterlidir. Virus düşük sayıda replikasyona ve gen ekspresyonuna devam eder.
  - Hastalık, virusun konak hücrelerinde oluşturduğu doğrudan hasar ya da virusla enfekte hücreler nedeniyle bağışıklık sisteminin oluşturduğu hasar sonucu ortaya çıkar.
  - Örnekler: Rubella ve CMV konjenital enfeksiyonları, HBV ve HCV kronik enfeksiyonları

VIROLOJI EGITIM GÜNLERI-SAFRANBOLU, 2009

Viral Enfeksiyon Türleri

- Latent Enfeksiyon
  - Viral gen ekspresyonu olmaksızın viral genomun konak hücre içinde kalıcı olması ile karakterlidir.
  - Reaktivasyonla ortaya çıkan hastalık, virus replikasyonu ve gen ekspresyonu sonucunda ortaya çıkan hücre hasarı ya da hücre kontrolünün kaybolması sonucu kanserleşmeye bağlıdır.
  - Örnekler: Herpes virus ve Retrovirus enfeksiyonları.

DOÇ. DR. AHMET PINAR

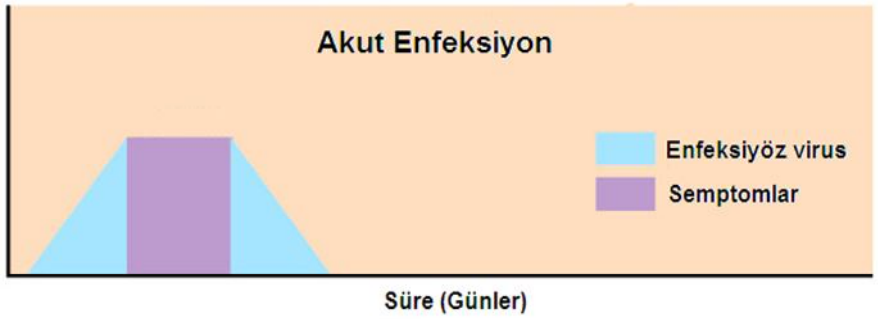
Viral Enfeksiyon Türleri

- Bazı viruslar için kronik ve latent enfeksiyon ayrımını yapmak mümkün değildir.
- Örnek: HIV
- Persistan enfeksiyon oluşturacak virusun bağışıklık sistemini alt etmesi ve kendi virulansını zayıflatacak mekanizmaları bulunması gereklidir.

VIROLOJI EGITIM GÜNLERI-SAFRANBOLU, 2009

Viral Enfeksiyon Türleri

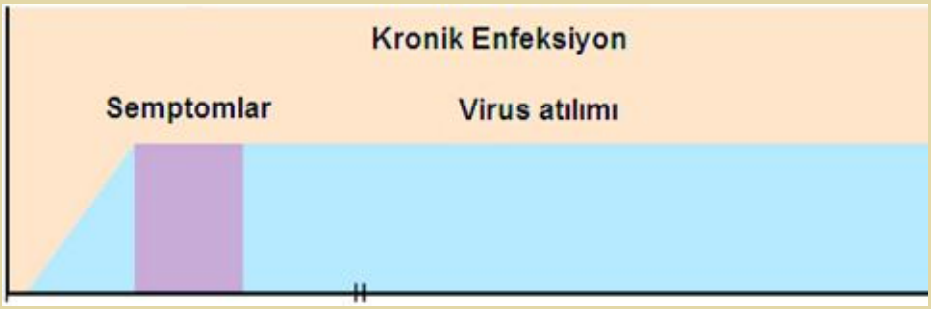
- Akut Enfeksiyon



DOÇ. DR. AHMET PINAR

Viral Enfeksiyon Türleri

- Kronik Enfeksiyon



Viral Enfeksiyon Türleri

- Latent Enfeksiyon



Viral Persistans Stratejileri

- İmmün sistemin kontrolünden uzak kalma
  - Nöral ganglionlar, MSS gibi



Viral Persistans Stratejileri

- Antijen farklılaşması

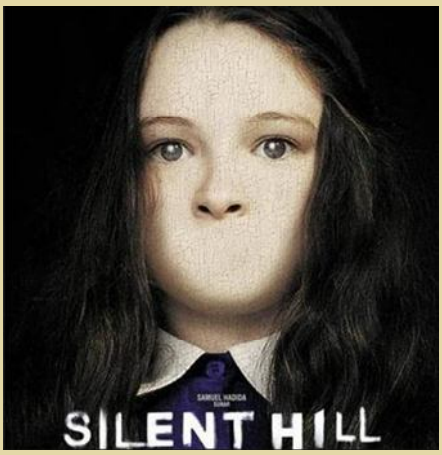






Viral Persistans Stratejileri

- Kısıtlı gen ekspresyonu



VIROLOJI EGITIM GÜNLERI-SAFRANBOLU, 2009

Viral Persistans Stratejileri

- İmmün sistemin baskılanması



DOÇ. DR. AHMET PINAR

Viral Persistans Stratejileri

- İmmün tolerans (kişisel genetik benzerlikler, prenetal enfeksiyon, moleküler taklit)







VIROLOJI EGITIM GÜNLERI-SAFRANBOLU, 2009

Viral Persistans Stratejileri

- İmmün sistem hücrelerinin doğrudan enfekte edilmesi



DOÇ. DR. AHMET PINAR

Viral Persistansın Önemi

- Persistan enfeksiyonlar, bir akut enfeksiyon sonrasında ortaya çıkan ikincil enfeksiyonlardır.
- Persistan enfeksiyonlar genellikle önemli bir akut viral hastalık nedeni değillerdir.

PERSİSTAN ENFEKSİYONLAR NEDEN ÖNEMLİDİR?

Viral Persistansın Önemi

- Enfeksiyon ajanı virusun toplumda kalıcılığına neden olur.
- Bağışıklık sisteminin baskılandığı durumlarda aktive olur.
- İmmünpatolojik hastalıklara neden olabilir.
- Kanserleşmeye neden olabilir.
- Bazıları bağışıklık sisteminin baskılanmasına neden olarak normalde zararsız başka ajanların hastalık oluşturmasına yol açabilir.

Latentlik Stratejileri

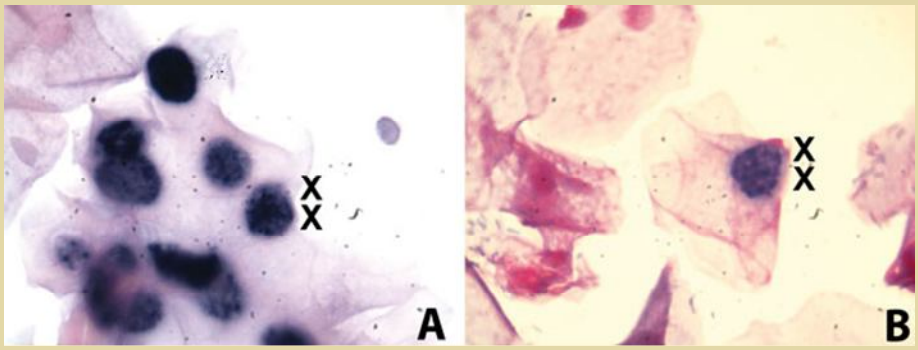
- Latent Kalabilen Viruslar İki Farklı Latentlik Durumundan Birisini Kullanır:
  - Epizomal Latentlik
  - Proviral Latentlik





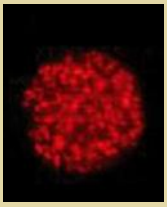
Latentlik Stratejileri

- Epizomal Latentlik
  - Viral genler sitoplazmada ya da çekirdekte serbest şekilde bulunurlar (epizomlar halinde)



Latentlik Stratejileri

- Epizomal Latentlik
  - Virus için Dezavantajı: Viral genlerin konak hücrenin yabancı nükleik asit yıkım mekanizmalarına daha duyarlı hale gelmesi.
  - Virus için Avantajı: Epizomların interferon uyarımını kısıtlaması.

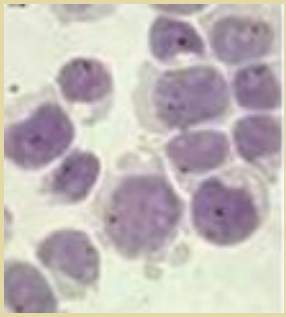


Latentlik Stratejileri

- Epizomal Latentlik
  - Örnekler:
    - Herpes simpleks, varicella zoster virusu: Viral genler nöron hücrelerinde epizomal kalır.
    - EBV: Viral genler immün sistem hücrelerinde epizomal kalır.

Latentlik Stratejileri

- Proviral Latentlik
  - Viral genomun konak genomuna integrasyonu ile gelişir.



VIROLOJI EGITIM GÜNLERI-SAFRANBOLU, 2009

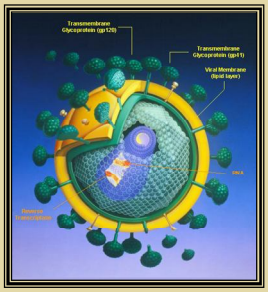
Latentlik Stratejileri

- Proviral Latentlik
  - Dezavantajı: Viral genomun çekirdeğe sokulma zorunluluğu ve latentliğin devam ettirilmesinin zorluğu.
  - Avantajı: Konak hücre bölünmesiyle viral genomun da replike olması ve konak hücre öldürülmeden viral genomdan kurtulmanın mümkün olmaması.

DOÇ. DR. AHMET PINAR

Latentlik Stratejileri

- Proviral Latentlik
  - Örnekler:
    - Retroviruslar: HIV, genomunu "long terminal repeats" (LTR) bölgeleri arasına integraz enzimi ile sokarak orada kalır.



Latentlik Stratejileri

- Latent Kalan Virusların Ortak Özellikleri
  - Virus replikasyonu olmadığından ya da konak hücre bölünmesi ile birlikte olduğundan hücre döngüsü latent enfeksiyondan etkilenmez.
  - Latent enfeksiyon bulunan hücrenin immün sistem tarafından farkedilmesi azaltılmış ya da ortadan kaldırılmıştır.

Latentlik Stratejileri

- Latent Kalan Virusların Ortak Özellikleri
  - Virusların akut enfeksiyonlarında kullandıkları genlerin ekspresyonları ortadan kaldırılmıştır.
  - Viral genom sağlam olduğu için bir süre sonra virus reaktivasyonu gelişerek başka konaklara bulaşma gerçekleşir

VIROLOJI EGITIM GÜNLERI-SAFRANBOLU, 2009

Latentlik Stratejileri

- Latent Kalan Virusların Ortak Stratejisi:
  - Latentliği devam ettirici genler bulundururlar.
  - Bu genlerin ekspresyonu ile viral genomun sindirilmesi ya da virusun immün sistem tarafından farkedilmesi engellenmektedir.

DOÇ. DR. AHMET PINAR

Latentlik Stratejileri

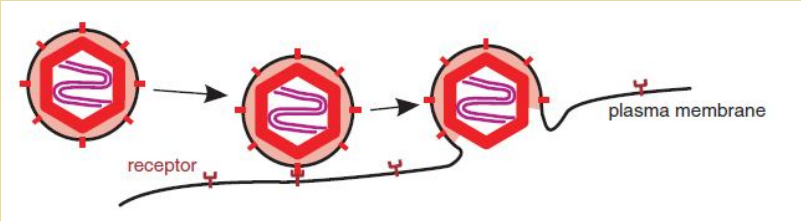
- Latent Kalan Virusların Ortak Stratejisi:
  - Bu genlerden bazıları apoptozu engelleyici etkiye sahiptir.
  - Bu genlerden bazıları hücre döngüsünü aktifleştirerek enfekte hücre sayısının artışına neden olur.

Latent Enfeksiyona Neden Olan Viruslar

Virus	Yerleşim	Bulaşıcılık	Hastalık
HSV	Dorsal kök ganglionları	-	Uçuk
VZV	Dorsal kök ganglionları	-	Zona
CMV	Lenfoid doku	-	Pnömoni, hepatit, transplasental
EBV	Lenfoid doku	-	Lenfoid ve nazofarenks tümörü
BK ve JC	Böbrek	-	Transplasental
*Kızamık	Beyin	±	SSPE
*HIV	Lenfosit, Makrofaj	+	Bağışıklık sistemi baskılanması

Latent Enfeksiyona Neden Olan Viruslar

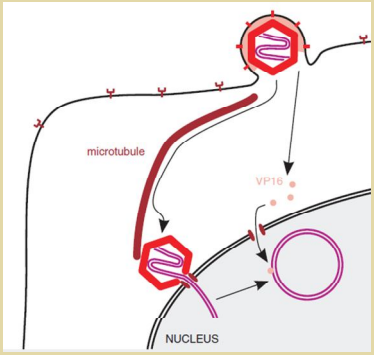
- Herpes simpleks virus (Primer akut enfeksiyon)
  - Tutunma
    1- Heparan sülfat → gB ve gC
    2- Ana hücre reseptörü (lektinler) → gD



VIROLOJI EGITIM GÜNLERI-SAFRANBOLU, 2009

Latent Enfeksiyona Neden Olan Viruslar

- Herpes simpleks virus (Primer akut enfeksiyon)
  - Hücreye giriş ve çekirdeğe gidiş

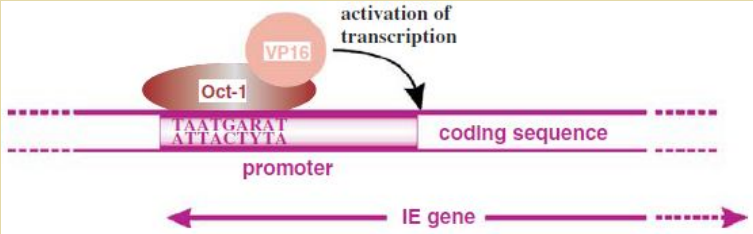


DOÇ. DR. AHMET PINAR

Latent Enfeksiyona Neden Olan Viruslar

- Herpes simpleks virus (Primer akut enfeksiyon)
  - Gen ekspresyonu

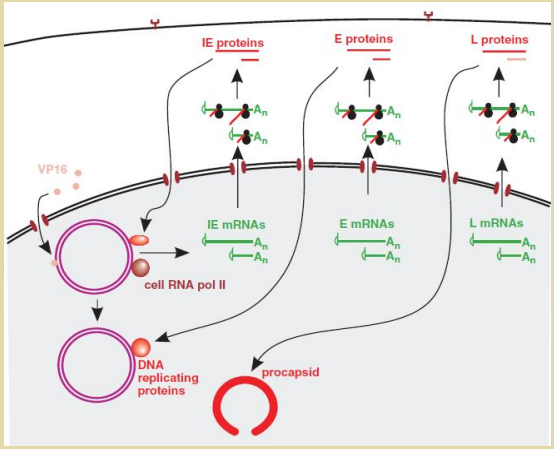




VIROLOJI EGITIM GÜNLERI-SAFRANBOLU, 2009

Latent Enfeksiyona Neden Olan Viruslar

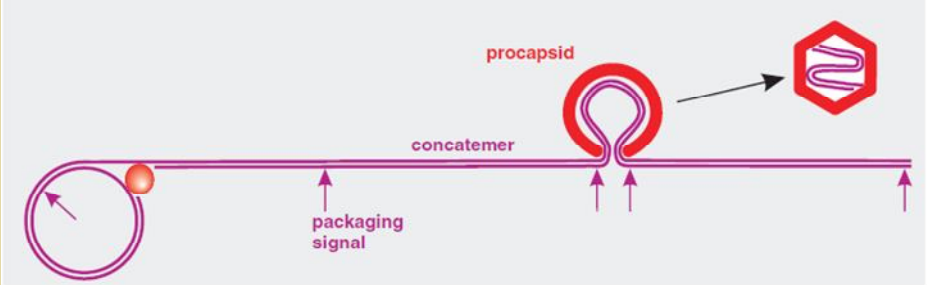
- Herpes simpleks virus (Primer akut enfeksiyon)
  - Gen ekspresyonu



DOÇ. DR. AHMET PINAR

Latent Enfeksiyona Neden Olan Viruslar

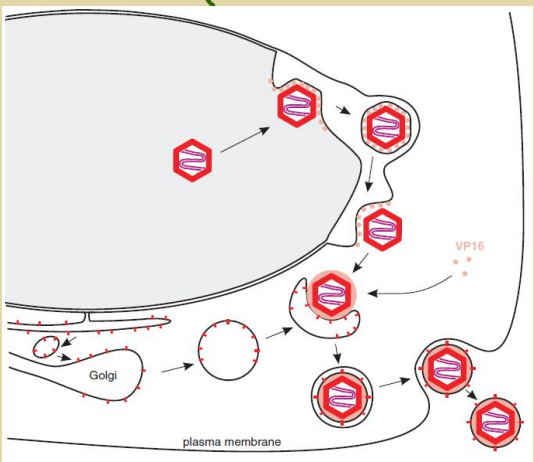
- Herpes simpleks virus (Primer akut enfeksiyon)
  - Paketleme



VIROLOJI EGITIM GÜNLERI-SAFRANBOLU, 2009

Latent Enfeksiyona Neden Olan Viruslar

- Herpes simpleks virus (Primer akut enfeksiyon)
  - Çıkış



DOÇ. DR. AHMET PINAR

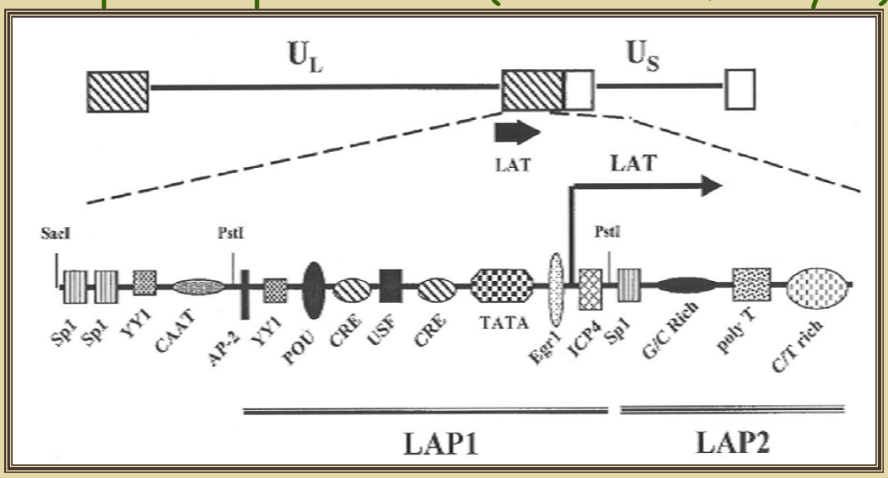
Latent Enfeksiyona Neden Olan Viruslar

- Herpes simpleks virus (Latent enfeksiyon)
  - Transkripsiyon ve translasyon sürerken LAT (Latency Associated Transcripts) de ortaya çıkar.
  - LAT translasyonu ile latentliği başlatıcı proteinler eksprese edilir.
  - Bu proteinler replikasyonu, yeni virus oluşumunu, genomun tümünün transkripsiyonunu baskılar.

VIROLOJI EGITIM GÜNLERI-SAFRANBOLU, 2009

Latent Enfeksiyona Neden Olan Viruslar

- Herpes simpleks virus (Latent enfeksiyon)



DOÇ. DR. AHMET PINAR

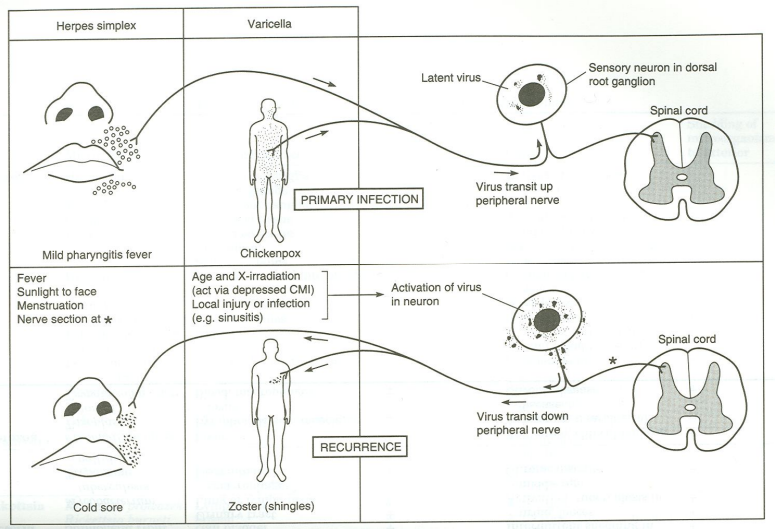
Latent Enfeksiyona Neden Olan Viruslar

- Herpes simpleks virus (Latent enfeksiyon)
  - Bölünmeyen hücrelerde (nöronlar) latent durumdaki virusun hiçbir proteininin eksprese edilmesine gerek yoktur.
  - Ancak latentliğin sürdürülmesi için LAT transkripsiyonu belli düzeyde devam etmelidir.
  - Transkripsiyon sonrası kesime uğrayan LAT'ın en az bir bölümü hücrede apoptozu engelleme görevi yapar.
  - Reaktivasyon için de bazı LAT bölümlerinin görev aldığı düşünülmektedir.

Latent Enfeksiyona Neden Olan Viruslar

- Herpes simpleks virus (Latent enfeksiyon)
  - Reaktivasyon uyarımları:
    - Soğuğa maruziyet
    - Menstruasyon
    - UV
    - Ateşli hastalıklar
    - Psikolojik faktörler
  - Reaktivasyon ile prodüktif enfeksiyon genleri eksprese olur.
  - Tekrar latentliğe dönmek için LAT ekspresyonu devam eder.

Latent Enfeksiyona Neden Olan Viruslar



Latent Enfeksiyona Neden Olan Viruslar

- Herpes simpleks virus (Latent enfeksiyon)

shed online ahead of print

Investigation of the Mechanism by Which Herpes Simplex Virus Type 1 LAT Sequences Modulate Preferential Establishment of Latent Infection in Mouse Trigeminal Ganglia

Running Title: LAT Sequence Regulation of Preferential Latent Infection

YUMI IMAI[1], KATHLEEN APAKUPAKUL[1], PHILIP R. KRAUSE[2], WILLIAM. P. HALFORD[3] and TODD P. MARGOLIS*[1,4]

1. F. I. Proctor Foundation, University of California San Francisco, San Francisco, CA
2. Center for Biologics Evaluation and Research, Food and Drug Administration, Bethesda, MD
3. Department of Microbiology and Immunology, Southern Illinois University School of Medicine, Springfield, IL
4. Department of Ophthalmology, University of California San Francisco, San Francisco, CA

Downloaded from jvi.asm.org at HACETTEPE

Latent Enfeksiyona Neden Olan Viruslar

- Herpes simpleks virus (Latent enfeksiyon)
  - HSV-1 : Galβ1-4 GlcNac ekspresyonu olan nöronlarda latentlik yapıyor.
  - HSV-2: Gala1-3Galβ1-Nac ekspresyonu olan nöronlarda latentlik yapıyor.
  - Latent enfeksiyon bulunan hücrelerin çekirdeğinde bol miktarda LAT birikimi gözleniyor.

VIROLOJI EGITIM GÜNLERI-SAFRANBOLU, 2009

Latent Enfeksiyona Neden Olan Viruslar

TABLE 46-3 Persistent Infections Primarily Associated with the Nervous System and Skin

Virus	Cells Harboring Virus	Virus Genome	Mechanism of Persistence	Reactivation Syndromes
HSV-1	Neurons	Episomal	Restricted viral gene expression by LATs	Skin, mucous membrane and cornea lesions, encephalitis
HSV-2	Neurons	Episomal	Same as HSV-1 on skin and mucous membranes of genitale	genital lesions, Meningitis
VZV	Neurons and Satellite cells	Episomal	Restricted viral gene expression by by LATs	Herpes zoster, AIDS-related syndromes
JC	Oligodendrocytes, and other cell types of CNS	Intergrated Episomal	?	Progressive multifocal leukoencephalitis
BK		?	?	Hemorrhagic cystitis
Measles	Neurons and supporting cells	Episomal	Restricted viral gene expression	Subacute scherosing panencephalitis

DOÇ. DR. AHMET PINAR

Latent Enfeksiyona Neden Olan Viruslar

TABLE 46-2 Persistent Virus Infections Primarily Associated with the Immune System

Virus	Cells Harboring Virus	Physical State of Virus Genome	Mechanism of Persistence	Reactivation Syndromes
HIV	$CD4^+$ T cells, monocytes/ macrophages	Integrated into cell DNA,	Antigenic variation and/or restricted by viral/cell factors	AIDS AIDS-related complex
EBV	B lymphocytes	Episomal	Decreased synthesis of viral and cellular molecules(ICAM-1,LFA-3)	Neoplasias, AIDS-related EBV-diseases
CMV	$CD4^+$, $CD8^+$ T cells interstitial mono-nuclear inflammatory cells	Episomal	Limited viral gene expression, altered expression of HLA, CD55, Fc receptors	Birth defects, various diseases associated with immunosuppression
HHV-6	$CD4^+$ T cells	Episomal	Restricted viral gene expression	Exanthem subitum, AIDS-related disorders
HHV-7	$CD4^+$ T cells	Episomal	Restricted viral gene expression	AIDS-related disorders
HTLV-1 and -2	T lymphocytes	Integrated	Down regulation of viral genes	Leukemia, neurologic disorders

Latent Enfeksiyona Neden Olan Viruslar

- EBV (Latent enfeksiyon)
  - Birincil enfeksiyon lenfoid ya da non-lenfoid çeşitli tipte hücrelerde gelişir.
  - Latentliği B lenfositler içinde sağlar.
  - Latentlikle ilgili genleri sayesinde B hücre proliferasyonuna neden olarak latent olarak enfekte ettiği hücre sayısını arttırır.
  - İmmün sistem tarafından kontrol edilmezse maligniteye yol açar (lenfoma)

Latent Enfeksiyona Neden Olan Viruslar

- EBV (Latent enfeksiyon)
  - Latentlik sırasında genomu büyük çoğunlukla episomal kalır. Ancak konak kromozomuna integre olduğu da gösterilmiştir.



Episomal İntegre Karışık

Latent Enfeksiyona Neden Olan Viruslar

- CMV (Latent enfeksiyon)
  - Hematopoetik progenitor hücrelerin bir kısmında latent kalır. Çekirdekte epizomal olarak 2-13 kopya genom bulundurur.
  - Dolaşımdaki monositler latentliğin devamını sağlar. Aktive olmuş makrofajlar ise reaktivasyona neden olur.
  - Genomun major IE bölgesinden CMV-latency-associated transcripts (CLTs) üretimi gerçekleşir.

Latent Enfeksiyona Neden Olan Viruslar

- HIV (Latent enfeksiyon)

Retrovirology BioMed Central

This Provisional PDF corresponds to the article as it appeared upon acceptance. Fully formatted PDF and full text (HTML) versions will be made available soon.

HIV interactions with monocytes and dendritic cells: viral latency and reservoirs

Retrovirology 2009, **6**:51 doi:10.1186/1742-4690-6-51

Christopher M. Coleman (ccoleman@mcw.edu)
Li Wu (liwu@mcw.edu)

VIROLOJI EGITIM GÜNLERI-SAFRANBOLU, 2009

Latent Enfeksiyona Neden Olan Viruslar

- HIV (Latent enfeksiyon)
  - HIV, uzun yaşam süresine sahip $CD4^+$ hafıza hücrelerinde, $CD16^+$ monositlerde ve bazı dendritik hücrelerde latent kalmaktadır.
  - Latent kalarak anti-retroviral tedavi baskısından da kurtuluyor.
  - Latentlik gelişiminde konak hücrenin de etkisi var.

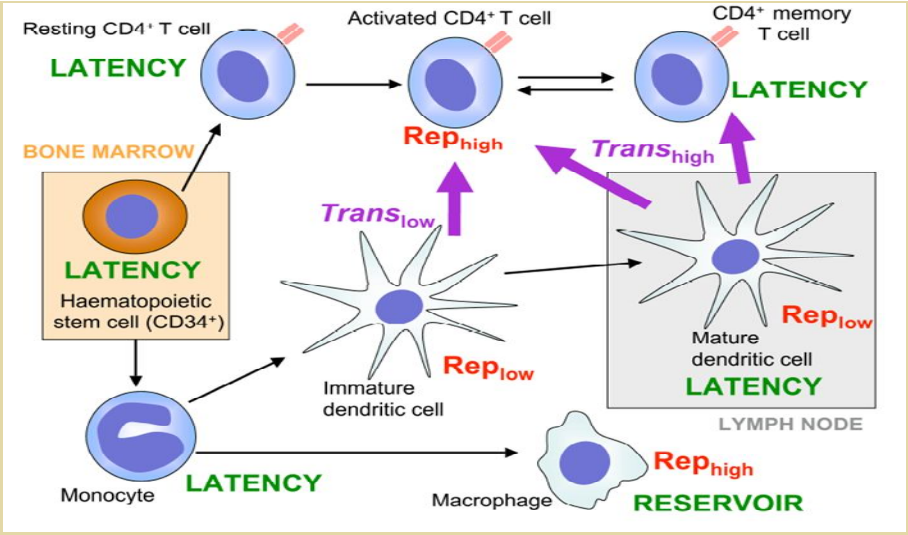
DOÇ. DR. AHMET PINAR

Latent Enfeksiyona Neden Olan Viruslar

- HIV (Latent enfeksiyon)
  - İntegre viral genomun transkripsiyonu için viral Tat proteini yanında hücresel "cyclin T1" ve "cyclin-dependent kinase 9" gibi ko-faktörlere gereksinim var (Toplu olarak "positive transcription elongation factor b" adı veriliyor).
  - Normal şartlarda konak hücrede bunların ekspresyonu düşük olduğundan virus latent kalıyor.

VIROLOJI EGITIM GÜNLERI-SAFRANBOLU, 2009

Latent Enfeksiyona Neden Olan Viruslar



DOÇ. DR. AHMET PINAR

SONUÇ

- Virusların latentlik mekanizmalarının tümünün açığa çıkarılması için daha çok yolumuz var.
- Latentlik virusların çok önemli virulans faktörlerinden birisi.
- Latentlik mekanizmaları çözüldüğünde tedavide de büyük gelişmeler beklenebilir.

VIROLOJI EGITIM GÜNLERI-SAFRANBOLU, 2009



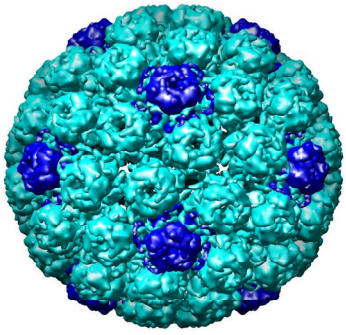
DOÇ. DR. AHMET PINAR

YENİ İNSAN POLYOMA VİRUSLARI

Y. DOÇ. DR. KORAY ERGÜNAY

23 HAZİRAN 2009, 10:20-10:50

Yeni Polyoma Virusları ve Hastalıklarla İlişkisi



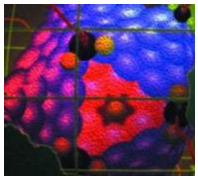
Yrd. Doç. Dr. Koray Ergünay

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi

Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD. Viroloji Ünitesi

Polyomaviridae Genel Özellikler -1 :

- poly - oma : Birçok farklı tümör oluşturan....



~ 40-45 nm büyüklüğünde, ikozahedral kapsidli, çıplak viruslar

Çift iplikli, çembersel DNA genomu, 4700 – 5400 bç

3 yapısal, 2 veya 3 erken protein

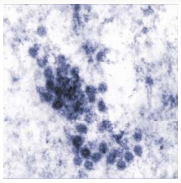
SV40 grubu: büyük T (LT) ve küçük T (ST)

Murine Polyoma grubu:

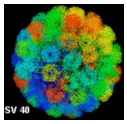
büyük T (LT), orta T (MT) ve küçük T (ST) antijenleri

Polyomaviridae Tarihçe :

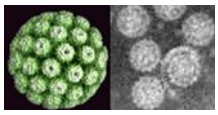
1953 - İlk polyomavirusun keşfi (L. Gross)

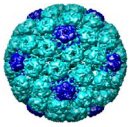


1960 - SV40



1971 - JC ve BK viruslarının saptanması





2007 - KI polymavirus (Allender et al.)

2008 - WU ve MC polyomaviruslar (Gaynor et al.; Feng et al.)

Polyomavirus

Eski Sınıflandırma :

***Papovaviridae* :** **Pa**pilloma, **Po**lyoma, "**Va**cuolating" viruslar

**** Yeni Sınıflandırma :***

Family 00.047. *Polyomaviridae*

Taxonomic Structure of the Family

Family	**00.047.** ***Polyomaviridae***
Genus	**00.047.0.01.** ***Polyomavirus***
Type/Species	**00.047.0.01.001.** ***Simian Virus 40***

** Classification and Nomenclature of Viruses, 8th ICTV Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Fauquet, CM, Mayo, MA, Maniloff, J, Desselberger, U, and Ball, LA (EDS) (2005) Elsevier/Academic Press, pp. 1259.*

Polyomaviridae Genel Özellikler -2 :

İnsan ve hayvanların ayrı polyoma virusları bulunur....

Hayvan Polyomavirusları: **Genellikle duyarlı türlere özgül, yaşam boyu devam eden enfeksiyonlar**

Çoğunlukla subklinik, immün baskılanma durumunda belirti veren enfeksiyonlar

İstisnalar: Bazı Kuş Polyomavirusları



Genç kuşlarda sistemik bulgular ve mortalite
Hemorajik nefrit, enterit vb.

Hiçbirisi kendi konağı ya da heterolog türlerde tümör oluşturmaz!!!

Virus (Kısaltma)	Konak	Genom (bç)	İlk izolasyon
Simian virus 40 (SV40)	Rhesus monkey	5243	Sweet and Hilleman, 1960
Simian virus 12 (SA12)	Vervet monkey, Chacma baboon	5230	Malherbe and Harwin, 1963
Baboon polyomavirus 2 (PPyV)	Baboon	?	Gardner *et al.*, 1989
B-lymphotropic polyomavirus (LpyV)	African green monkey	5270	zur Hausen and Gissmann, 1979
Squirrel monkey polyomavirus (SqulPyV)	Squirrel monkey	5075	Verschoor *et al.*, 2008
Chimpanzee polyomavirus (ChPyV)	Chimpanzee	?	Johne *et al.*, 2005
Bovine polyomavirus (BpyV)	Cattle	4697	Shah *et al.*, 1977
Rabbit kidney vacuolating virus (RKV)	Rabbit	?	Ito *et al.*, 1966
Hamster polyomavirus (HaPyV)	Hamster	5366	Graffi *et al.*, 1967
Rat polyomavirus (Rat-PyV)	Rat	?	Ward *et al.*, 1984
Murine polyomavirus (MPyV)	Mouse	5297-5307	Gross, 1953
Murine pneumotropic polyomavirus (MPtV)	Mouse	4754	Kilham and Murphy, 1953
Finch polyomavirus	Finch	5278	Johne *et al.*, 2006
Budgerigar fledgling polyomavirus (BFPyV)	Budgerigar	4981	Bernier *et al.*, 1981 Bozeman *et al.*, 1981
Goose hemorrhagic polyomavirus (GHPyV)	Goose	5256	Guerin *et al.*, 2000
Crow polyomavirus (CpyV)	Crow	5079	Johne *et al.*, 2006

ZurHausen H. Novel human polyomaviruses - Re-emergence of a well known virus family as possible human carcinogens. Int J Cancer; 123(2):247-50, 2008

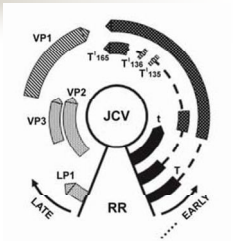
İnsan Polyomavirusları (2007'ye kadar):

Virus	Genom (bç)	Majör Klinik Sendrom	İlk izolasyon
BK virus	5133	Hemorajik sistit	Gardner *et al.*, 1971
JC virus	5130	Progresif multifokal lökoensefalopati (PML)	Padgett *et al.*, 1971

Toplumda çok yaygın olarak bulunurlar...

Erişkin popülasyonda seropozitivite oranı: % 72-98

JC Virus:



Primer enfeksiyon; asemptomatik/hafif bulgular

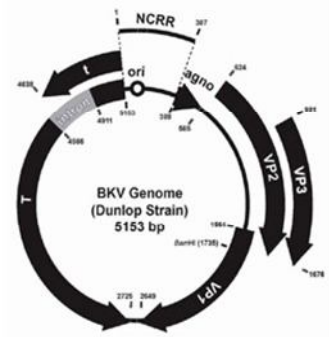
Böbrekler, B lenfositleri, merkezi sinir sisteminde persistans

İmmün baskılanma durumlarında:
Progresif multifokal lökoensefalopati (PML)

İnsanlarda karsinogenez ile ilişkisi BELİRSİZ!!!

- *Bazı glioblastoma ve astrositoma olgularında tümör hücrelerinde T antijeni*
- *Deneysel MSS inokülasyonunda farelerde beyin tümörü*

BK Virus:



Primer enfeksiyon genellikle çocuklukta, hafif solunum yolu bulguları

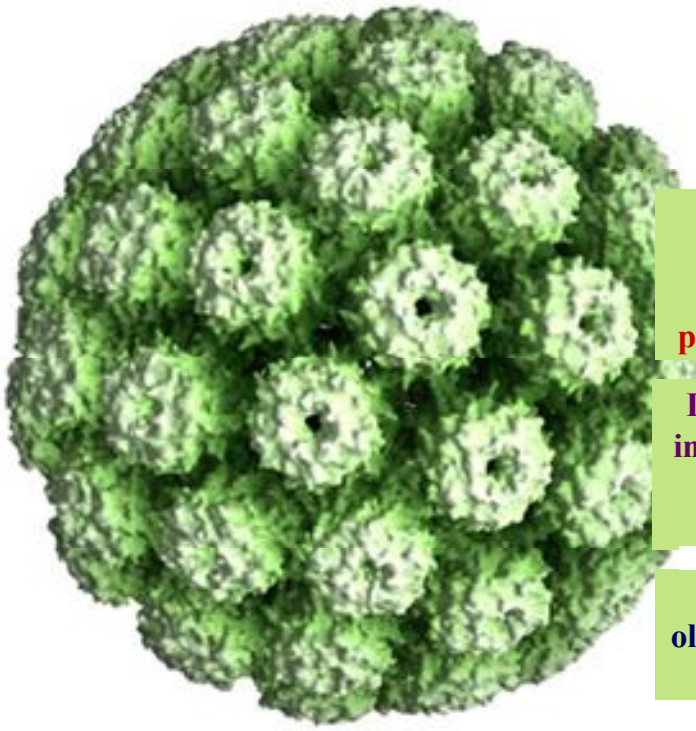
Yaşamboyu süren virus persistansı

Reaktivasyon: Hamilelik, immün baskılanma

İdrarda virus atılımı; Hemorajik sistit / Nefropati

İnsanlarda karsinogenez ile ilişkisi GÖSTERİLEMEDİ!!!

- *Yenidoğan hayvanlara inokülasyon sonucu beyin tümörleri, osteosarkom, fibrosarkom izlenir*
- *Rodent ve maymun hücrelerini immortalize eder*



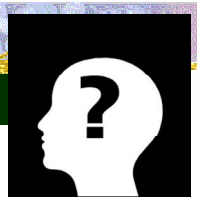
Simian Virus 40

Rhesus maymunlarında asemptomatik persistan enfeksiyon

In vitro koşullarda insan hücreleri dahil birçok hücreyi immortalize eder

İnsanda tümör oluşturma potansiyeli olabilir mi?

SV40 ve İnsan kanserleri -1 :

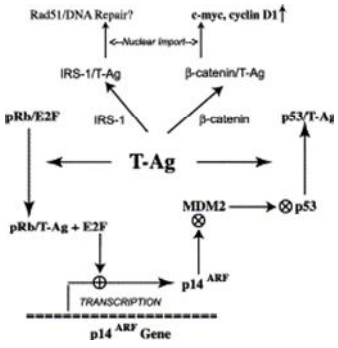


Bazı insan tümör dokularında LT ve SV40 DNA'sı...

Mezotelioma, beyin tümörleri, lenfomalar...

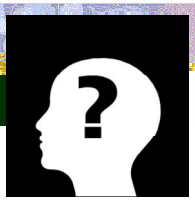
Nonpermisif hücre kültürlerinde abortif enfeksiyon veya transformasyon....

İncelenen muhtemel mekanizmalar...



White MK, Khalili K. Polyomaviruses and human cancer: Molecular mechanisms underlying patterns of tumorigenesis. Virology 2004; 324:1-16

SV40 ve İnsan kanserleri -2 :



Bazı insan tümör dokularında LT ve SV40 DNA'sı...

Bulgular yeni çalışmalarla doğrulanamadı...

SV40 LT ve hücresel DNA arasında homoloji...

Epidemiyolojik veriler ilişkiyi desteklemiyor...

İnsanda karsinogenez ile ilişkisi GÖSTERİLEMEDİ!!!

Poulin DL, DeCaprio JA. Is there a role for SV40 in human cancer? J Clin Oncol 2006;24:4356–65.
zur Hausen H. SV40 in human cancers—an endless tale? Editorial. Int J Cancer 2003;107:687.

İnsan Polyomavirusları (2007'ye kadar):

Virus	Genom (bç)	Majör Klinik Sendrom	İlk izolasyon
BK virus	5133	Hemorajik sistit	Gardner *et al.*, 1971
JC virus	5130	Progresif multifokal lökoensefalopati (PML)	Padgett *et al.*, 1971

KI Virus:

JOURNAL OF VIROLOGY, Apr. 2007, p. 4130–4136 Vol. 81, No. 8
0022-538X/07/$08.00+0 doi:10.1128/JVI.00028-07
Copyright © 2007, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Identification of a Third Human Polyomavirus[▽]

Tobias Allander,[1]* Kalle Andreasson,[2] Shawon Gupta,[1] Annelie Bjerkner,[1] Gordana Bogdanovic,[1,2] Mats A. A. Persson,[3] Tina Dalianis,[2] Torbjörn Ramqvist,[2] and Björn Andersson[4]

Nasofarinks aspiratlarının taranması

↓

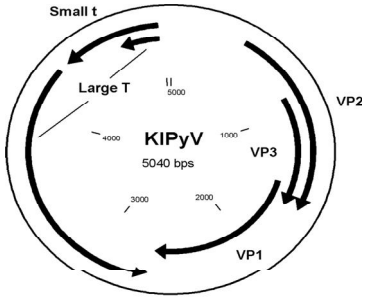
Randomize PZR- cDNA kütüphanesi – dizi analizi

↓

SV40 VP1 dizisine yakınlık gösteren bir DNA dizisi

↓

Tüm genom dizi analizi ve tanımlanması



WU Virus:

OPEN ACCESS Freely available online PLoS PATHOGENS

Identification of a Novel Polyomavirus from Patients with Acute Respiratory Tract Infections

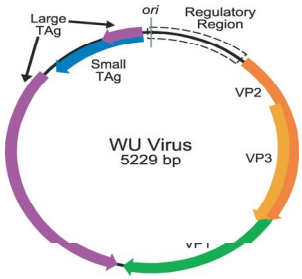
Anne M. Gaynor[1], Michael D. Nissen[2], David M. Whiley[2], Ian M. Mackay[2], Stephen B. Lambert[2], Guang Wu[1], Daniel C. Brennan[3], Gregory A. Storch[4], Theo P. Sloots[2], David Wang[1,5]*

May 2007 | Volume 3 | Issue 5 | e64

3 yaşında, pnömoni olgusu, nasofarinks aspiratı

↓

Randomize PZR- cDNA kütüphanesi – dizi analizi



KI ve WU Polyomavirular:

Yaygın coğrafi dağılım (Asya, Amerika, Avustralya vb...)

Genellikle çocuklarda...

Solunum yolu örnekleri, dışkı, serum, tonsil dokusu (WU) nda saptanır...

Birlikte / tek başlarına solunum yolu enfeksiyonlarında etyolojik ilişki ???

Norja P, Ubillos I, Templeton K, Simmonds P. No evidence for an association between infections with WU and KI polyomaviruses and respiratory disease. J Clin Virol 2007;40:307–11.

Kantola K et al. J Clin Virol 2009; Bialasiewicz S et al. J Clin Virol 2007; Ren L et al. J Clin Virol 2008, Lin F et al. J Clin Virol 2008; zur Hausen H. Int J Cancer, 2008

MC Polyomavirus:

Clonal Integration of a Polyomavirus in Human Merkel Cell Carcinoma

Huichen Feng, Masahiro Shuda, Yuan Chang,* Patrick S. Moore*

Merkel cell carcinoma (MCC) is a rare but aggressive human skin cancer that typically affects elderly and immunosuppressed individuals, a feature suggestive of an infectious origin. We studied MCC samples by digital transcriptome subtraction and detected a fusion transcript between a previously undescribed virus T antigen and a human receptor tyrosine phosphatase. Further investigation led to identification and sequence analysis of the 5387–base-pair genome of a previously unknown polyomavirus that we call Merkel cell polyomavirus (MCV or MCPyV). MCV sequences were detected in 8 of 10 (80%) MCC tumors but only 5 of 59 (8%) control tissues from various body sites and 4 of 25 (16%) control skin tissues. In six of eight MCV-positive MCCs, viral DNA was integrated within the tumor genome in a clonal pattern, suggesting that MCV infection and integration preceded clonal expansion of the tumor cells. Thus, MCV may be a contributing factor in the pathogenesis of MCC.

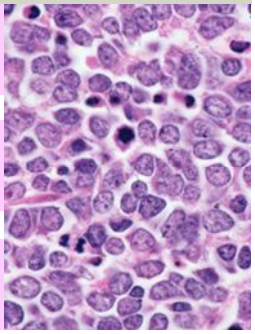
22 FEBRUARY 2008 VOL 319 SCIENCE

Merkel Hücreli Karsinom :



Nöroektodermal kökenli
Merkel Hücrelerinin nadir bir tümörü

İmmün sistemi baskılanmış kişiler ve
ileri yaş grubunda daha sık izlenir.



Son 2 onyılda insidansı 3 katına çıkmıştır
(1500 olgu/yıl; ABD verileri)

Derinin en agresif seyirli tümörleri arasındadır
(olguların %50'si 9 ay içerisinde kaybedilir).

Clonal Integration of a Polyomavirus in Human Merkel Cell Carcinoma

Huichen Feng, Masahiro Shuda, Yuan Chang,* Patrick S. Moore*

4 Merkel Hücreli Karsinom dokusu

↓

"Digital Transcriptome Substraction" (DTS) yöntemi

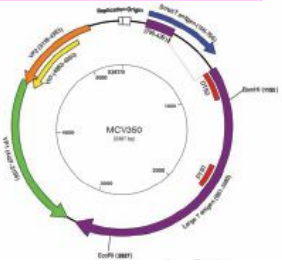
↓

cDNA kütüphanesinin oluşturulması

↓

Yüksek kapasiteli dizi analizi (pyrosequencing)

Yeni bir polyomavirus ait diziler...
MC Virus

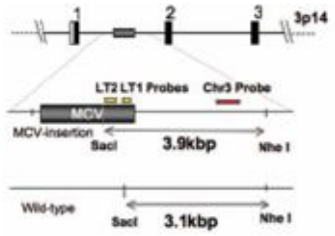


Farklı çalışmalarda birçok Merkel Hücreli Karsinom olgusunda saptandı...

Kanser dokusu kromozomuna integrasyonu ve LT ekspresyonu saptandı...

İnsan kanserleri ile ilişkili yeni bir virus!!!

Tümör oluşturan polyomavirus!!!



Int. J. Cancer: **00**, 000–000 (2009)
© 2009 UICC

FAST TRACK

Human Merkel cell polyomavirus infection II. MCV is a common human infection that can be detected by conformational capsid epitope immunoassays

Yanis L. Tolstov[1], Diana V. Pastrana[2], Huichen Feng[1], Jürgen C. Becker[3], Frank J. Jenkins[4], Stergios Moschos[5], Yuan Chang[1]*, Christopher B. Buck[2]* and Patrick S. Moore[1]*

Merkel cell polyomavirus (MCV) is a newly-discovered human tumor virus found in ~80% of Merkel cell carcinoma (MCC). The rate of MCV infection among persons without MCC is unknown. We developed a MCV virus-like particle (VLP) enzyme-linked immunoassay (EIA) that does not cross-react with human BK or murine polyomaviruses. Peptide mapping of the MCV VP1 gene and immunoblotting with denatured MCV VLP are less sensitive than the MCV EIA in detecting MCV antibodies suggesting antibody reactivity in this assay primarily targets conformational but not linear epitopes. Among MCC patients, all 21 (100%) patients tested with MCV-positive tumors had high serum MCV IgG but not high MCV IgM levels. Only 3 of 6 (50%) MCC patients with MCV-negative tumors were positive for MCV antibodies. Sera from most adults, including 107 of 166 (64%) blood donors, 63 of 100 (63%) commercial donors and 37 of 50 (74%) systemic lupus erythematosus patients, show evidence for prior MCV exposure. Age-specific MCV prevalence was determined by examining a cross-sectional distribution of 150 Langerhans cell histiocytosis (an unrelated neoplasm) patient sera. MCV prevalence increases from 50% among children age 15 years or younger to 80% among persons older than 50 years. We did not find evidence for vertical transmission among infants. Although past exposure to MCV is common among all adult groups, MCC patients have a markedly elevated MCV IgG response compared with control patients. Our study demonstrates that MCV is a widespread but previously unrecognized human infection.

© 2009 UICC

Int. J. Cancer: **00**, 000–000 (2009)
© 2009 UICC

FAST TRACK

Human Merkel cell polyomavirus infection I. MCV T antigen expression in Merkel cell carcinoma, lymphoid tissues and lymphoid tumors

Masahiro Shuda[1], Reety Arora[1], Hyun Jin Kwun[1], Huichen Feng[1], Ronit Sarid[2], María-Teresa Fernández-Figueras[3], Yanis Tolstov[1], Ole Gjoerup[1], Mahesh M. Mansukhani[4], Steven H. Swerdlow[5], Preet M. Chaudhary[6], John M. Kirkwood[7], Michael A. Nalesnik[5], Jeffrey A. Kant[5], Lawrence M. Weiss[8], Patrick S. Moore[1]* and Yuan Chang[1,5]*

Merkel cell polyomavirus (MCV) is a recently discovered human virus closely related to African green monkey lymphotropic polyomavirus. MCV DNA is integrated in ~80% of Merkel cell carcinomas (MCC), a neuroendocrine skin cancer linked to lymphoid malignancies such as chronic lymphocytic leukemia (CLL). To assess MCV infection and its association with human diseases, we developed a monoclonal antibody that specifically recognizes endogenous and transfected MCV large T (LT) antigen. We show expression of MCV LT protein localized to nuclei of tumor cells from MCC having PCR quantified MCV genome at an average of 5.2 (range 0.8–14.3) T antigen DNA copies per cell. Expression of this putative viral oncoprotein in tumor cells provides the mechanistic underpinning supporting the notion that MCV causes a subset of MCC. In contrast, although 2.2% of 325 hematolymphoid malignancies surveyed also showed evidence for MCV infection by DNA PCR, none were positive at high viral copy numbers, and none of 173 lymphoid malignancies examined on tissue microarrays expressed MCV LT protein in tumor cells. As with some of the other human polyomaviruses, lymphocytes may serve as a tissue reservoir for MCV infection, but hematolymphoid malignancies associated with MCC are unlikely to be caused by MCV.
© 2009 UICC

İnsan Polyomavirusları (2009 Mayıs):

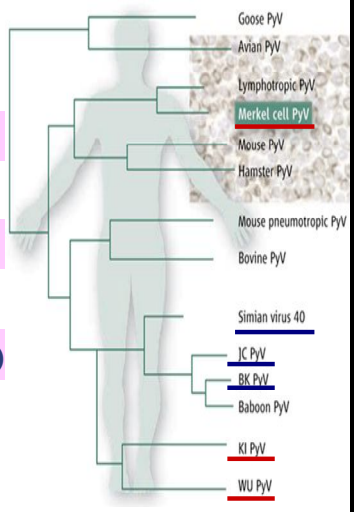
Virus	Genom (bç)	Majör Klinik Sendrom	İlk izolasyon
BK virus	5133	Hemorajik sistit	Gardner *et al.*, 1971
JC virus	5130	Progresif multifokal lökoensefalopati (PML)	Padgett *et al.*, 1971
KI virus	5040	?	Allander *et al.*, 2007
WU virus	5229	?	Gaynor *et al.*, 2007
MC virus	5387	?	Feng *et al.*, 2008

Yeni Polyomaviruslar (KI,WU, MC):

Yaygın enfeksiyon (hastalıkla ilişki???)

Solunum yoluyla bulaşma (diğer yollar???)

Dokuda persistans (tonsil/lenfoid doku???)



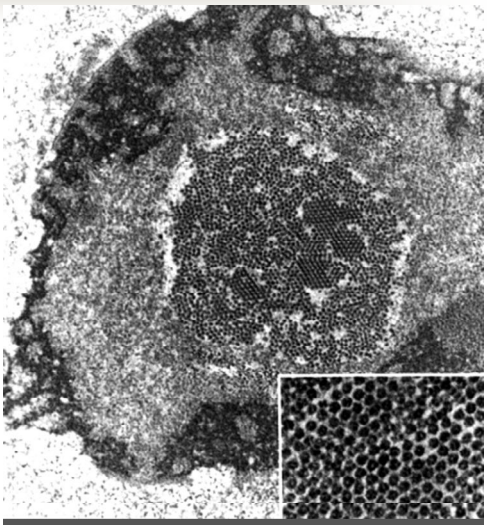


Başka Polyomaviruslar ???

Neden son 2 yılda ???

Başka Polyomaviruslar ?

İmmün sistemi baskılanmış kişilerde deride trikodisplazi lezyonlarında Polymavirus benzeri partiküller...



Sperling LC, Tomaszewski MM, Thomas DA. Viral-associated trichodysplasia in patients who are immunocompromised. J Am Acad Dermatol 2004;50:318–22.

Osswald SS, Kulick KB, Tomaszewski MM, Sperling LC. Viral-associated trichodysplasia in a patient with lymphoma: a case report and review. J Cutan Pathol 2007;34:721–5.

Neden son iki yılda ?

- 1953 - İlk polyomavirusun keşfi (L. Gross)
- 1960 - SV40
- 1971 - JC ve BK viruslarının saptanması
- 2007 - KI polymavirusun saptanması
- 2008 - WU ve MC polyomavirusların saptanması



Adding pathogens by genomic subtraction

Laura MacConaill & Matthew Meyerson

Two studies report the application of high-throughput sequencing technologies to discover infectious agents associated with diseased human tissues. These findings herald a breakthrough in the field of pathogen discovery.

VOLUME 40 | NUMBER 4 | APRIL 2008 | NATURE GENETICS

Doku örnekleri

↓

Nükleik asit saflaştırması (DNA/RNA)

↓

Tüm parçaların dizi analizi

↓

Elde edilen dizilerin referans dizilerle karşılaştırılması

↓

Enfeksiyon etkeninin izinin saptanması

↓

Etkenin genomik özelliklerinin ortaya çıkarılması

↓

Diğer olgular için tarama sistemlerinin geliştirilmesi



2900 Nucleic Acids Research, Vol. 20, No. 11 © 1992 Oxford University Press

A random-PCR method (rPCR) to construct whole cDNA library from low amounts of RNA

Patrick Froussard
Département des Rétrovirus, Institut Pasteur, 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France

Yeni olan nedir ?

↓

Adding pathogens by genomic subtra

Laura MacConaill & Matthew Meyerson

Two studies report the application of high-throughput sequencing technologies t
associated with diseased human tissues. These findings herald a breakthrough i



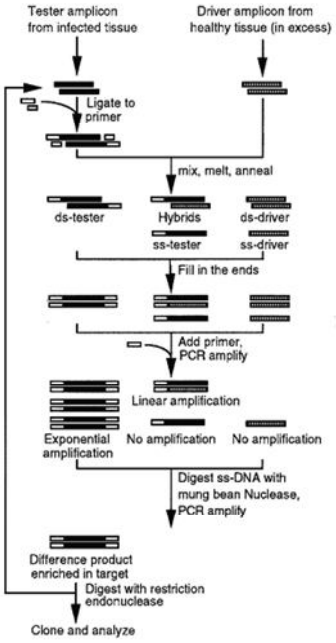
RESEARCH ARTICLE

Cloning the Differences Between Two Complex Genomes

Nikolai Lisitsyn, Natalya Lisitsyn, Michael Wigler

The analysis of the differences between two complex genomes holds promise for the discovery of infectious agents and probes useful for genetic studies. A system was developed in which subtractive and kinetic enrichment was used to purify restriction endonuclease fragments present in one population of DNA fragments but not in another. Application of this method to DNA populations of reduced complexity ("representations") resulted in the isolation of probes to viral genomes present as single copies in human DNA, and probes that detect polymorphisms between two individuals. In principle, this system, called representational difference analysis (RDA), may also be used for isolating probes linked to sites of genomic rearrangements, whether occurring spontaneously and resulting in genetic disorders lopment.

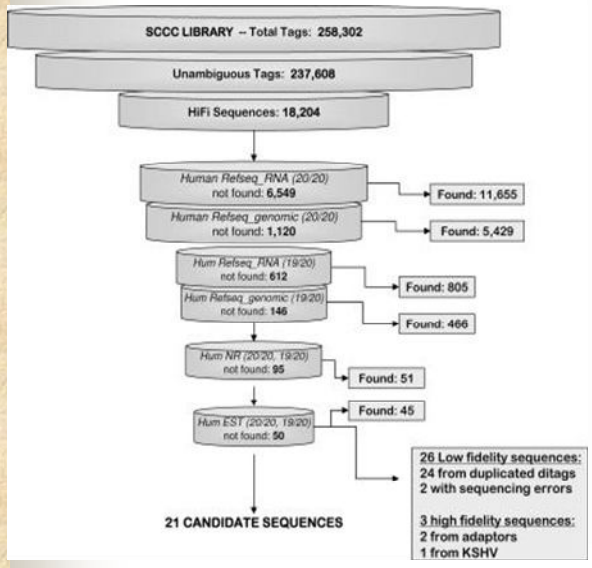
SCIENCE • VOL. 259 • 12 FEBRUARY 1993

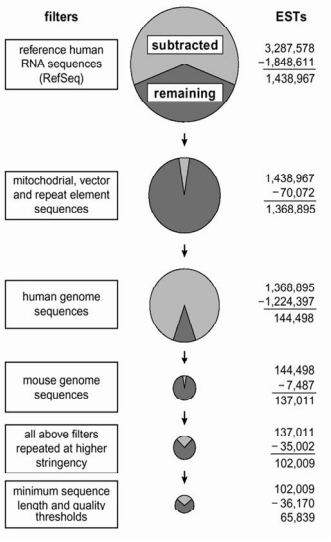


JOURNAL OF VIROLOGY, Oct. 2007, p. 11332–11340
0022-538X/07/$08.00+0 doi:10.1128/JVI.00875-07
Vol. 81, No. 20
Copyright © 2007, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Human Transcriptome Subtraction by Using Short Sequence Tags To Search for Tumor Viruses in Conjunctival Carcinoma[▽]

Huichen Feng,[1] Jennifer L. Taylor,[1] Panayiotis V. Benos,[2] Robert Newton,[3] Keith Waddell,[4] Sebastien B. Lucas,[5] Yuan Chang,[1]* and Patrick S. Moore[1]*





PLOS BIOLOGY

Viral Discovery and Sequence Recovery Using DNA Microarrays

David Wang[1], Anatoly Urisman[1], Yu-Tsueng Liu[2], Michael Springer[1], Thomas G. Ksiazek[3], Dean D. Erdman[3], Elaine R. Mardis[4], Matthew Hickenbotham[4], Vincent Magrini[4], James Eldred[4], J. Phillipe Latreille[4], Richard K. Wilson[4], Don Ganem[2], Joseph L. DeRisi[1*]

We have previously described a prototype DNA microarray designed for highly parallel viral detection with the potential to detect novel members of known viral families (Wang et al. 2002). This microarray contained approximately 1600 oligonucleotides representing 140 viruses. Building upon this foundation, a more comprehensive second-generation DNA microarray consisting of 70mer oligonucleotides derived from every fully sequenced reference viral genome in GenBank (as of August 15, 2002) was constructed. The most highly conserved 70mers from each virus were selected as described by Wang et al. (2002) to maximize the probability of detecting unknown and unsequenced members of existing families by cross-hybridization to these array elements. On

OPEN ACCESS Freely available online

PLOS PATHOGENS

Identification of a Novel Gammaretrovirus in Prostate Tumors of Patients Homozygous for R462Q *RNASEL* Variant

Anatoly Urisman[1☯], Ross J. Molinaro[2,3☯], Nicole Fischer[4☯], Sarah J. Plummer[2], Graham Casey[2], Eric A. Klein[5], Krishnamurthy Malathi[2], Cristina Magi-Galluzzi[6], Raymond R. Tubbs[6], Don Ganem[4,7,8], Robert H. Silverman[2*], Joseph L. DeRisi[1,8*]

Ribonuclease L (RNase L) is an important effector of the innate antiviral response. Mutations or variants that impair function of RNase L, particularly R462Q, have been proposed as susceptibility factors for prostate cancer. Given the role of this gene in viral defense, we sought to explore the possibility that a viral infection might contribute to prostate cancer in individuals harboring the R462Q variant. A viral detection DNA microarray composed of oligonucleotides corresponding to the most conserved sequences of all known viruses identified the presence of gammaretroviral sequences in cDNA samples from seven of 11 R462Q-homozygous (QQ) cases, and in one of eight heterozygous (RQ) and homozygous wild-type (RR) cases. An expanded survey of 86 tumors by specific RT-PCR detected the virus in eight of 20 QQ cases (40%), compared with only one sample (1.5%) among 66 RQ and RR cases. The full-length viral genome was cloned and sequenced independently from three positive QQ cases. The virus, named XMRV, is closely related to xenotropic murine leukemia viruses (MuLVs), but its sequence is clearly distinct from all known members of this group. Comparison of *gag* and *pol* sequences from different tumor isolates suggested infection with the same virus in all cases, yet sequence variation was consistent with the infections being independently acquired. Analysis of prostate tissues from XMRV-positive cases by in situ hybridization and immunohistochemistry showed that XMRV nucleic acid and protein can be detected in about 1% of stromal cells, predominantly fibroblasts and hematopoietic elements in regions adjacent to the carcinoma. These data provide to our knowledge the first demonstration that xenotropic MuLV-related viruses can produce an authentic human infection, and strongly implicate RNase L activity in the prevention or clearance of infection in vivo. These findings also raise questions about the possible relationship between exogenous infection and cancer development in genetically susceptible individuals.

HBV S GENİ MUTASYON ANALİZLERİ VE ANLAMI

PROF. DR. SELDA ERENSOY

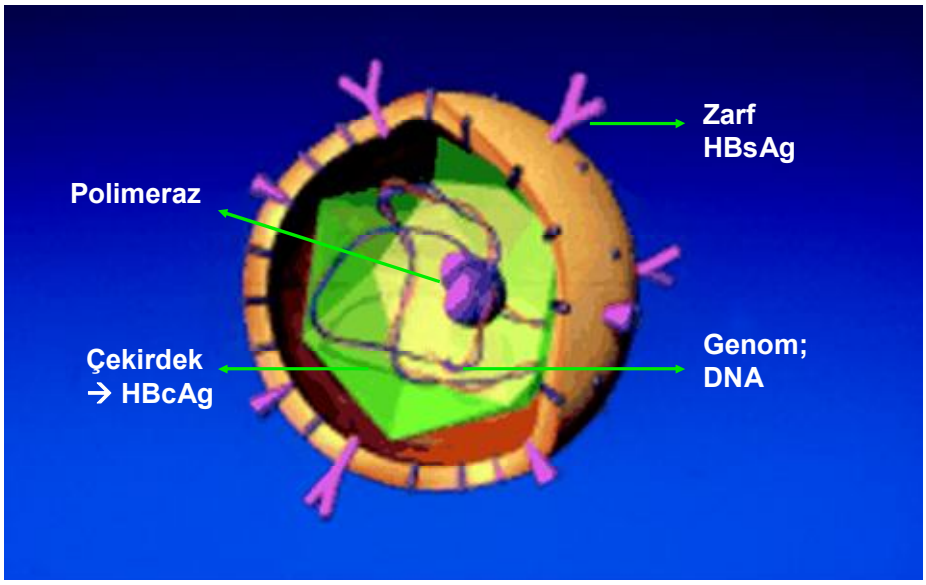
23 HAZİRAN 2009, 11:20-12:00

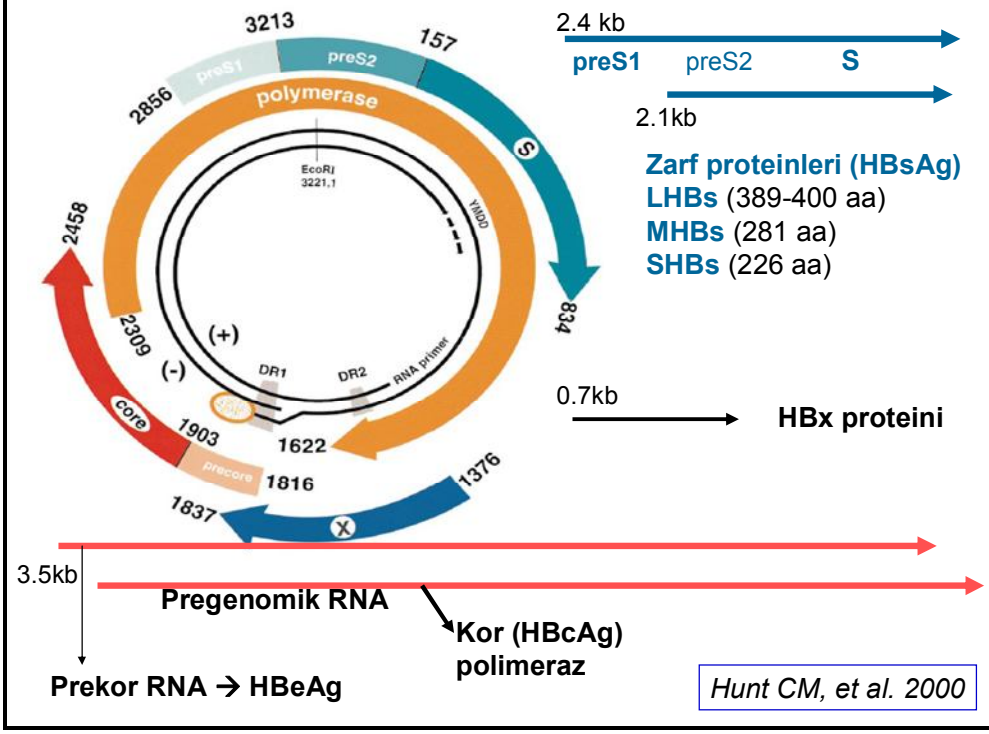
Hepatit B Virüsü S Mutasyonları ve Klinik Anlamı

Prof. Dr. Selda Erensoy
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, İzmir

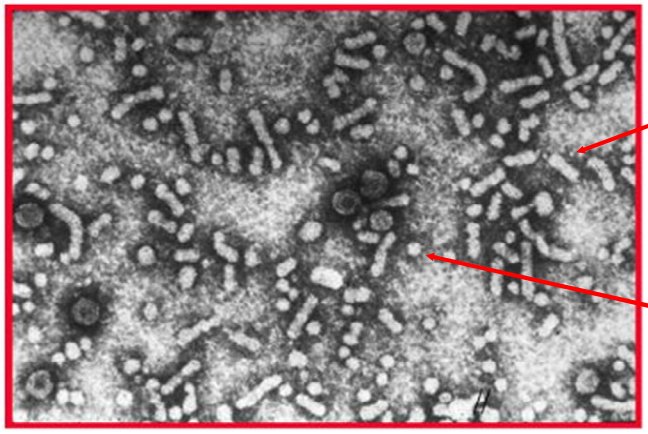
selda.erensoy@ege.edu.tr

Viryon – Dane partikülü; 42 nm





Hepatitis B Virus



Tübüler: L,M,S

Küresel: M,S

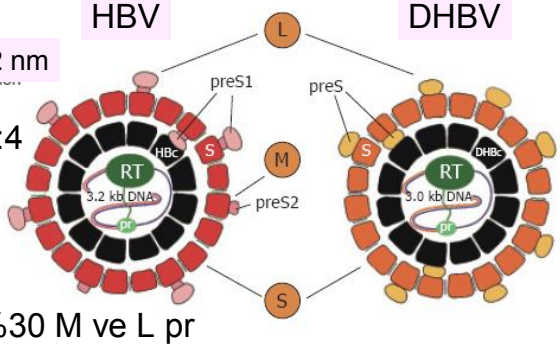
%70 S proteini + %30 M ve L proteinleri

HBV

DHBV

Viryon: 42 nm

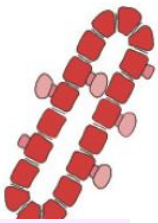
L:M:S=>1:1:4



%70 S pr + %30 M ve L pr

Virüs alt partikülleri

tübüler

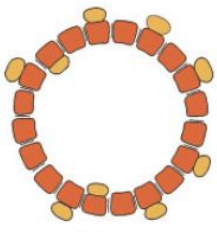


Çap: 22 nm (17-25)
Uzunluk: 50-500 nm

küresel



Çap: 22 nm (17-25)



Spheres

Glebe D, Urban S; 2007

HBsAg

- Reseptöre bağlanma
- Virüsün paketlenmesi (“assembly”)
- Korunma
  - ✓Anti-HBs : Nötralizan antikor
  - ✓Aktif / pasif bağışıklama
- Tanı

HBV’nin hepatositlere girişi; Viral ve hücresel faktörler

❖ HBV’nin hepatositlere girişi:

* LHBs’de preS1 (21-47. aa önemli)

*Heparan sülfat proteoglikanların (**HSPG**) glikozamin (**GAG**) yan zincirleri

→L- viral zarf proteininin pre-S bölgesi

Hepatositlerde özgün heparan sülfat yapısı (sülfat ↑)

HSPG – **Pre-S1** ilk 77 amino asit (9-18) gerekli (bağlanma reseptörleri)

HBV’nin yüksek afiniteli reseptörü ?

Schulze A, Gripon P, Urban S; 2007,
Leistner CM, Gruen-Bernhard, Glebe D; 2007

HBV'nin genetik değişkenliği

8 GENOTİP (A-H)

→Tüm genomda nükleotid dizisinde grup içinde >%8 farklılık

(S geninde > %4 farklılık)

Alt grup: Subgenotip (A1,2; B1-4; C1-4; D1-4; F1,2)

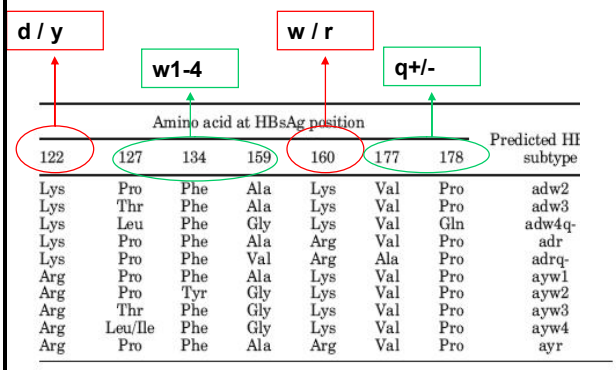
→Tüm genomda %4 - %8 farklılık

"Clade" (topluluk; küme) (F)

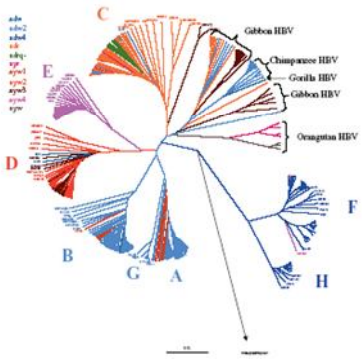
→Tüm genomda <%4 farklılık

Popülasyonda yıllar süren seçicilik → Stabil virüs

Serotip - Genotip



"a" determinantı ortak



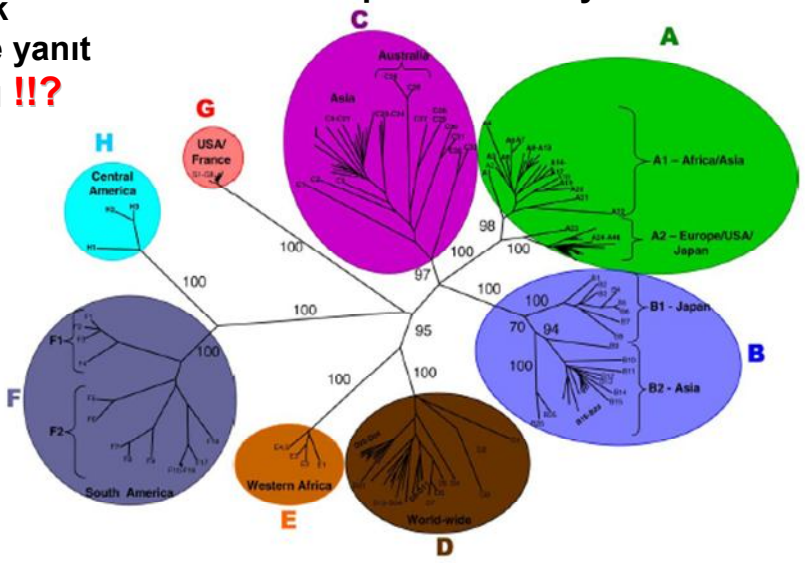
Tüm genom >%8

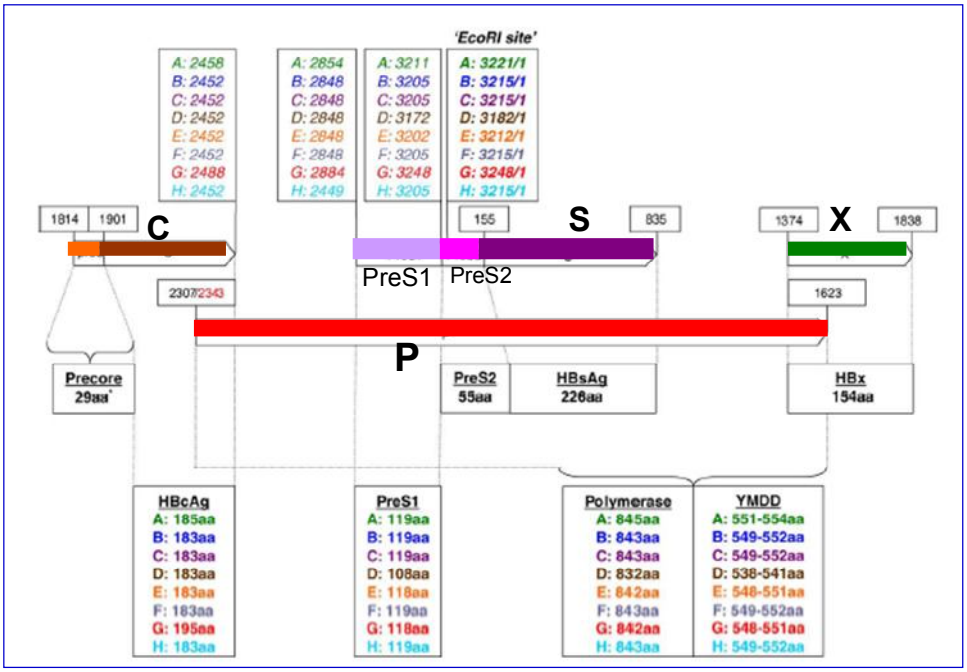
Echevarria JM, JCV 2006

Genotipler, alt genotipler, alt serotipler

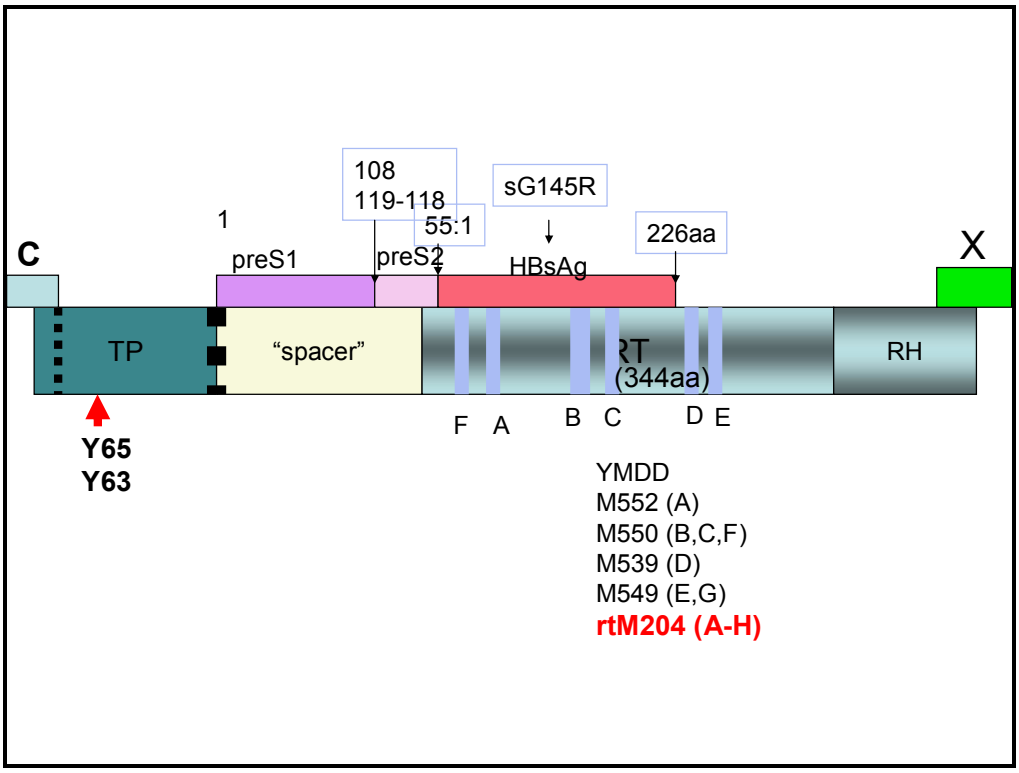
Klinik
Patojenik
Tedaviye yanıt
Farkları !!?

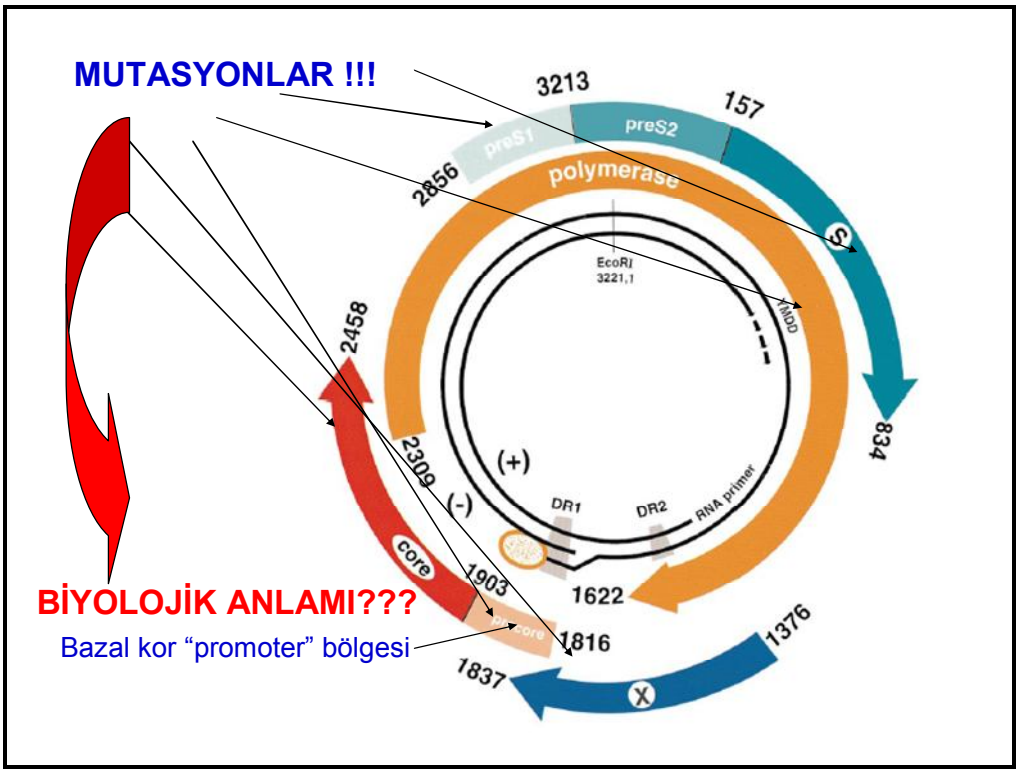
Karışık alt genotip enfeksiyonları
Genotip rekombinasyonları





Kramvis, Kew, François, 2005

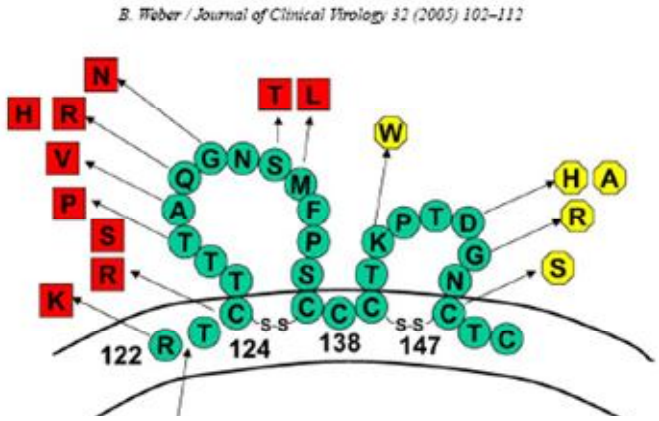

108
119-118
55:1
sG145R
1
226aa
C
preS1
preS2
HBsAg
X
TP
"spacer"
RT
(344aa)
RH
F A B C D E
Y65
Y63
YMDD
M552 (A)
M550 (B,C,F)
M539 (D)
M549 (E,G)
rtM204 (A-H)


MUTASYONLAR !!!
3213
157
preS2
preS1
2856
polymerase
S
EcoRI
3221,1
YMDD
2458
834
2309
(+)
(-)
DR1
DR2
RNA primer
core
1903
1622
1816
1376
1837
X
BİYOLOJİK ANLAMI???
Bazal kor "promoter" bölgesi

- İmmün tolerans döneminde immünolojik seleksiyon Ø / ↓↓
- İmmün dominant epitoplara ait mutasyonlar
- İmmünolojik temizleme ile immün baskı + seleksiyon ↑

→S geni ve pre-kor geni →

❖ **Tedavi, aşılama, tanı sorunları ↑ ↑**



Major hidrofilik bölge (MHR): 100-160 aa

HBs1 : ------120

HBs2 : 120-123

HBs3 : 124-137

HBs4 : 139-147 } "a" determinantı

HBs5 : 148-169

(S Protein)
Yüzey Gen mutasyonları

- Aşı kaçak mutantları
- HBIG seçici baskısı sonucu

→ Aşı etkinliği ↓ (İmmün kaçak)

→HBsAg testleri saptayamıyor (tanısal kaçak)

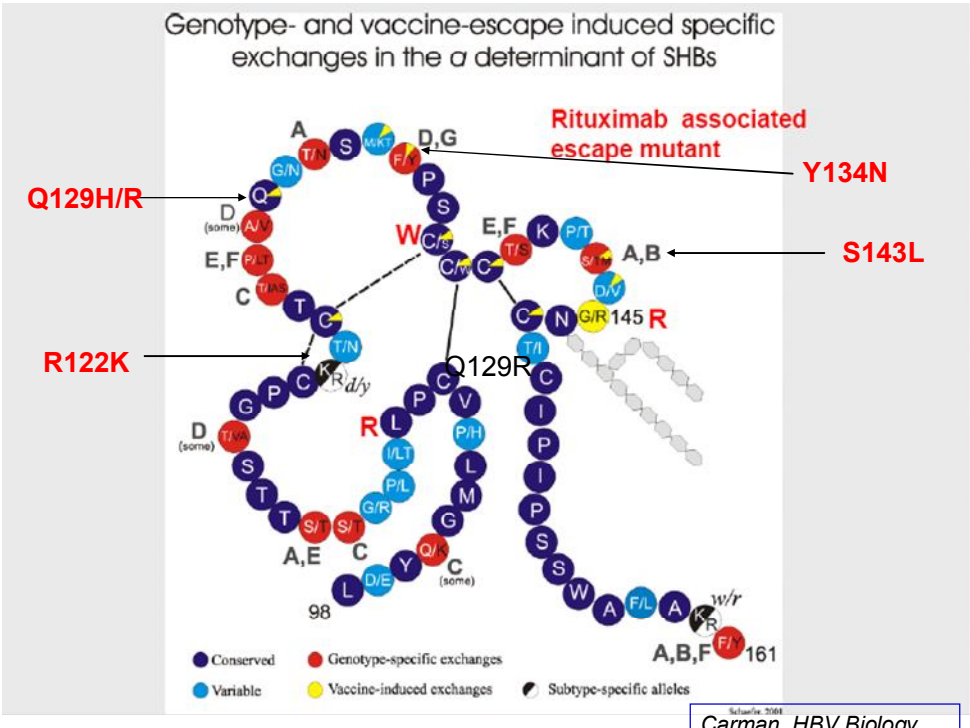
→Fulminan hepatit

❑ aa s121 – 149 : "a" determinantı

❑ aa s139 – 147 : "a" det. 2. ilmeği

(anti-HBs'in major immün hedefi)

(sG145R)



Carman, HBV Biology

S mutasyonu – Aşı

- 7 yaş - erkek hasta
- YD döneminde aşı → HBsAg (-) Anti-HBs (+)
- ALL tanısı ile tedavi
  - İzlemde HBsAg (+), HBeAg (+), Anti-HBs 146 mIU/ml, HBV DNA 229 pg/ml
  - 10 klon
    - 8 klon → G145A
    - 1 klon → P142S
    - 1 klon → P142S + T143 stop kodon

Kutlu T et al. J Clin Virol, 2006

- ***The first identified hepatitis B virus vaccine escape mutation in Turkey.***

Aşılılarda "a" mutasyonu

Percentage of HBV infection and "a" determinant variants after infant immunoprophylaxis in different countries

Country	HBV infection (%)[a]	"a" determinant variants	Immunisation	Reference
Indonesia	24/1717 (1.4%)[b]	ND	Vaccine (<7 days)	[11][c]
	20/656 (3%)	ND	Vaccine (>7 days)	
Hong Kong	14/124 (11.3%)[d]	ND	HBIG/vaccine	[27]
	15/63 (23.8%)	ND	Vaccine	
Singapore	41/345 (11.9%)	16/41 (39%)	HBIG/vaccine	[12]
Taiwan	27/455 (5.9%)	6/27 (22%)	HBIG/vaccine	[32]
1984	115/1200 (9.6%)	8/103 (7.8%)	Before vaccine	[33]
1989	52/1134 (4.6%)	10/51 (19.6%)	Vaccine	[33]
1994	20/1515 (1.3%)	9/32 (28.1%)	Vaccine	[33]
England and Wales	20/321(6.2%)	2/17 (11.8%)	HBIG/vaccine	[34]
USA	94/1092 (8.6%)	22/94 (23.4%)	HBIG/vaccine	[39]
Czech Republic	1/402 (0.25%)	1/1 (100%)	HBIG/vaccine	[40]
Japan	2/29 (6.9%)	1/2 (50%)	HBIG/vaccine	[41]
China (Shanghi)	42/340 (12.4%)	4/24 (16.7%)	Vaccine	[42]
Netherlands	8/705 (1.1%)	ND	HBIG/vaccine	[44]
Gambia	32/358 (9%)	1/3 (33.3%)	Vaccine	[45]
India	(14.2%)[d]	ND	HBIG/vaccine	[46]
	(25%)	ND	Vaccine	

%0.25 - 25 **%8-100**

Basuni AA et al. Vaccine, 2004

Aşılama – Mutant prevalansı

HEPATOLOGY Vol. 30, No. 5, 1999

Changes of Hepatitis B Surface Antigen Variants in Carrier Children Before and After Universal Vaccination in Taiwan

HONG-YUAN HSU,[1,2] MEI-HWEI CHANG,[2] SHWU-HUEY LIAW,[3] YEN-HSUAN NI,[2] AND HUEY-LING CHEN[2]

Hepatology ,1999 ve Gut, 2004

TABLE 1. Prevalence of HBV With Surface Gene Mutation in the a Determinant in Serum Samples From Children With Various Serologic HBV Markers During Seroepidemiologic Surveys in the Years 1984, 1989, and 1994

	1984 Survey							1989 Survey							1994 Survey							1999
HBsAg	+	+	+	−	−	−	−	+	+	+	−	−	−	−	+	+	+	−	−	−	−	
Anti-HBs	+	−	−	−	+	+	−	+	−	−	−	+	+	−	+	−	−	−	+	+	−	
Anti-HBc	+	+	−	+	+	−	−	+	+	−	+	+	−	−	+	+	−	+	+	−	−	
							(total)							(total)							(total)	
No. of children found during the survey	44	71	5	14	210	45	811	(1,200)	8	44	1	15	101	302	663	(1,134)	5	15	0	2	48	1,140	305	(1,515)	1357
No. of children whose sera were analyzed for HBV DNA by PCR	44	58	5	8	33	NP	NP	(148)	8	38	1	9	35	NP	NP	(91)	5	15	0	2	39	4‡	NP	(65)	71
No. of children seropositive for HBV DNA	44	58	1	0	0			(103)*†	8	38	0	1	4			(51)†	5	15	0	0	8	4		(32)*	13
No. of children who harbored a determinant mutants	3	5	0	0	0			(8)*‡	2	7	0	1	0			(10)*‡	1	4	0	0	2	2		(9)*	3

S 110-160 aa **%7.8** **%19.6** **%28.1** **%23.1**

DNA (+) çocuklarda a mutasyonu oranı aşılılarda daha fazla (p<0,001)

Mutasyonlar: 125-129 aa / **140-149** aa

Kr taşıyıcı ve enfeksiyon oranları düşük

S mutasyonu - KC tx

- HBV'ye bağlı KC tx
  - Profilaksi yok → %80 re-enfeksiyon
  - HBIG + antiviral → <%10
- Uzun süre HBIG kullanımında %10-20 "a" mutantı

Mahonty SR et al. J Clin Gastroenterol, 2005

- **Pre-S bölgesi mutasyonları**

Pre-S2 içinde S promoter (destekleyici) bölgesinde CCAAT-kutusu

→S- transkripsiyonunu düzenleyici

"promoter "

➢ CCAAT-kutusu mutasyonu

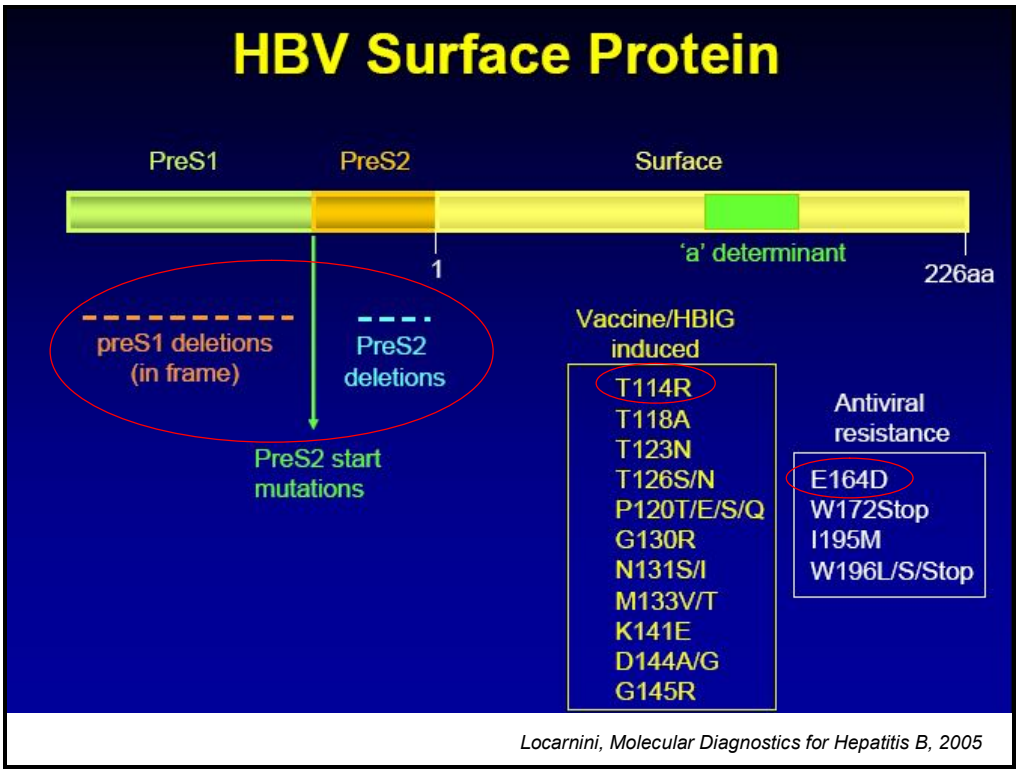
→S protein < L protein

→L protein depolanması → sitopatik etki (fibrozan kolestatik hepatit)

→M protein translasyonunu engeller

→ S proteinin nükleokapside bağlanmasını azaltır.

(Pollicino, Trautwein, Le Seyec, Ishwawa, Kalinina)



Locarnini, Molecular Diagnostics for Hepatitis B, 2005

Mutations in HBV POL Associated with LMV, TDF, ABC FCV Resistance

LMV Mutations		HBsAg Mutations
rtI53S	F-A inter-domain	sA45S
rtL80I/V	A Domain	no change
rtL82I/V	A Domain	no change
rtF169L	B Domain	A157D
rtV173L	B Domain	E164D
rtL180M/V	B Domain	no change
rtA200V	C Domain	sL192F
rtM204I	C Domain	W196S, W196I
rtM204V	C Domain	I195M
rtV207I	C Domain	M198I/W199S
rtS219P	C-D inter-domain	S210R
rtL229V	C-D inter-domain	sF220L

TDF Mutations		HBsAg Mutations
rtA194T	B-C inter-domain	no change

ABC Mutations		HBsAg Mutations
rtH234Y	C-D inter-domain	no change

FCV Mutations		HBsAg Mutations
rtH90N/Y	A Domain	no change
rtV173L	B Domain	E164D
rtP177L	B Domain	no change
rtL180M/V	B Domain	no change
rtT184S	B-C inter-domain	sV176L
rtV207I	C Domain	W199 Stop/no change
rtR243K	D Domain	After end HBsAg

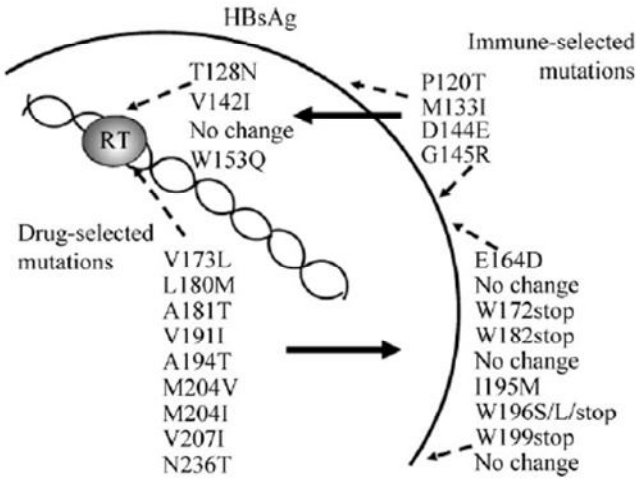
Locarnini, 2005

Journal of Antimicrobial Chemotherapy (2008) **61**, 766–768

Hepatitis B virus escape mutants induced by antiviral therapy

Julie Sheldon and Vincent Soriano*

Department of Infectious Diseases, Hospital Carlos III, Madrid, Spain



HBsAg testleri

- HBsAg >10^4 HBV virionu
- 0.5ng HBsAg/ml ≈ 10^8 HBsAg/ml

→ ≈ 10^4 HBV/ml

*0.1ng HBsAg/ml serum ≈ 2 x 10^7 HBsAg/ml

→ ≈ 2000 HBV/ml

*** 0.2ng/ml HBsAg ≈ 0.05 IU/ml HBsAg**

→≈ 4000 HBV/ml

** IU Dünya Sağlık Örgütü standardına göre*

Deguchi M, et al. Quantitation of hepatitis B surface antigen by an automated chemiluminescent microparticle immunoassay. J Virol Methods 2004; 115:217

HBsAg testlerinin duyarlığı

- ✓ Kullanımdaki HBsAg testlerinin saptama süreleri arasında **9 -14 gün** fark olabilir (Scheiblauer H, 2006, Biswas R, 2003)
- ✓ Serokonversiyon duyarlılığı ile analitik duyarlılık arasında genelde tutarlılık var (istisnalar da var)
- ✓ Yeni testlerin analitik duyarlılığı 10 kat artırılmış

HBsAg kantitasyonu

- ✓ HBsAg konsantrasyonu HBV ile enfekte hastalarda HBV'nin aktivitesi hakkında ALT yükselmesinden önce bilgi verir.
- ✓ IFN tedavisinin başarısızlığına ait ön veri?
- ✓ HBsAg → serokonversiyonu ile ilişkili
- ✓ cccDNA miktarı ile ilişkili

HBV yüzey antijeni mutantlarına bağlı HBsAg negatifliği

* HBsAg "a" determinantındaki amino asit değişikliği → Yapısal değişikler → nötralizan antikorların (anti-HBs) bağlanmasını etkileyebilir

- ➢ İmmün-kaçak mutantlar
- ➢ Tanıdan kaçan mutantlar
- • HBsAg negatif – HBV DNA pozitif
- • HBsAg tarama testleri: Yakalama antikoru + saptama antikoru
- ❑ Monoklonal – poliklonal / polivalan anti-HBs

Carman et al. Lancet 1990;336:325-9, Molecular variants of hepatitis B virus. J Viral Hepatitis 1996;4:S11-20. Echevarria JM, Avellon A. Echevarria JM, Avellon A. Hepatitis B virus genetic diversity. J Med Virol 2006;8:S36
Weber B. Diagnostic impact of the genetic variability of the hepatitis B virus surface antigen gene. J Med Virol 2006; 78:S59

	HBsAg test indeks: S/CO ve vahşi tipe oranı (%)									
	Test A		**Test B**		**Test C**		**Test D**		**Test E**	
	İndeks	%	İndeks	%	İndeks	%	İndeks	%	İndeks	%
Vahşi tip adw2	5.1		8.6		4.0		15.0		7.8	
T126S	4.2	(82)	11.8	(137)	3.6	(88)	13.0	(87)	8.6	(111)
Q129H	**3.7**	**(73)**	11.6	(135)	3.2	(80)	12.0	(92)	7.2	(93)
M133L	4.2	(82)	13.3	(155)	**3.1**	**(76)**	11.0	(92)	7.0	(90)
D144A	**3.3**	**(64)**	8.8	(102)	**2.3**	**(57)**	**5.0**	**(45)**	**5.4**	**(69)**
G145R	**3.3**	**(65)**	**5.6**	**(65)**	**2.5**	**(61)**	**3.0**	**(60)**	**0.5**	**(6)**
T126S+G145R	**3.1**	**(60)**	**4.8**	**(56)**	**2.3**	**(57)**	**2.2**	**(15)**	**0.5**	**(6)**
P142L+G145R	**3.4**	**(67)**	8.4	(98)	**2.7**	**(66)**	**2.7**	**(18)**	**0.5**	**(6)**
P142S+G145R	**3.6**	**(70)**	6.7	(78)	**2.9**	**(72)**	**3.7**	**(25)**	**0.5**	**(6)**
D144A+G145R	**2.9**	**(57)**	**1.7**	**(20)**	**1.7**	**(41)**	**0.7**	**(5)**	**0.5**	**(6)**

Weber B. Diagnostic impact of the genetic variability of the hepatitis B virus surface antigen gene. J Med Virol 2006; 78:S59-S65

Scheiblauer H, et al. Evaluation of 17 CE-marked HBsAg assays with respect to clinical sensitivity, analytical sensitivity, and hepatitis B virus mutant detection. J Med Virol 2006; 78:S66-S70 (B)

Mutasyon (rekombinan)	S/CO 2	S/CO 3	S/CO 5	S/C 6	IU/ml 7	S/CO 11	S/CO 13	S/CO 16	S/CO 17
D144A/L186T (1/10)	20.2	8.2	12.8	8.7	0.4	3.3	0.5	4.6	2.3
D144A/L186T	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	8.4	Yok	Yok
M133T	29.2	12.9	21.1	22.4	1.1	7.8	7.2	7.0	7.3
M133T/M163F	16.1	4.8	14.4	9.5	0.3	1.7	2.2	3.1	2.3
T123N	26.9	Yok	4.5	23.1	Yok	Yok	**0.8**	4.8	2.0
Y100C/P120T	**0.6**	Yok	32.9	46.6	Yok	Yok	27.8	14.5	6.7
T143L (1/10)	47.1	24.6	36.3	82.4	5.2	24.5	**-0.1**	22.2	16.1
T143L	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	**0.6**	Yok	Yok
S143L (1/10)	49.4	28.5	>>>	>>>	15.6	157.7	**0.0**	34.6	47.4
S143L	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	1.2	Yok	Yok
S38P/M198T	12.7	Yok	10.0	6.9	Yok	Yok	5.5	2.9	1.8
C76Y/R169H	36.3	6.9	27.0	35.7	1.7	11.7	43.7	12.8	6.9
S53L/I126N/S210N	20.3	4.1	8.0	14.7	0.6	4.0	19.3	6.3	2.1
C76Y/T143M/F219S (1/10)	6.5	2.3	5.2	5.3	0.3	1.8	**0**	2.3	**0.8**
C76Y/T143M/F219S	yok	yok	yok	yok	yok	yok	yok	yok	13.6

Scheiblauer H, et al. Evaluation of 17 CE-marked HBsAg assays with respect to clinical sensitivity, analytical sensitivity, and hepatitis B virus mutant detection. J Med Virol 2006; 78:S66-S70 (B)

Mutasyon (rekombinan)	S/CO 2	S/CO 3	S/CO 4	S/CO 5	S/CO 6	S/CO 8	S/CO 11	S/CO 12	S/CO 16
T126S	14.1	12.73	8.64	10.32	10.42	20.17	3.56	3.74	3.84
Q129H	11.26	16.31	8.61	8.90	8.76	20.21	3.22	4.08	30.90
M133L	12.09	12.41	8.58	9.95	8.42	12.72	3.06	4.17	3.13
D144A	11.06	12.31	6.55	8.45	3.58	6.47	2.30	3.16	1.94
G145R	**0.80**	11.03	**0.56**	8.80	4.21	**0.10**	2.47	3.20	2.06
T126S+ G145R	**0.82**	9.21	**0.56**	6.56	4.06	**0.10**	2.29	2.35	1.58
P142L+ G145R	**0.72**	10.48	**0.56**	8.37	3.76	**0.10**	2.67	3.26	2.54
P142S+ G145R	1.69	10.57	**0.56**	8.81	4.09	**0.10**	2.90	3.10	2.39
D144A+ G145R	2.63	10.71	**0.56**	8.40	3.33	**0.10**	1.67	2.61	1.52

Scheiblauer H, et al. Evaluation of 17 CE-marked HBsAg assays with respect to clinical sensitivity, analytical sensitivity, and hepatitis B virus mutant detection. J Med Virol 2006; 78:S66-S70 (B)

Doğal mutantlar	S/CO 2	S/CO 3	S/CO 4	S/CO 5	S/CO 6	IU/ml 7	S/CO 11	S/CO 13	S/CO 16	S/CO 17
G129H	17.81	8.40	10.02	11.38	13.12	0.60	4.65	10.73	4.05	2.91
M133T	16.65	7.27	10.28	10.67	12.27	0.53	4.18	9.47	4.27	3.17
G145R	0.75	4.88	**0.42**	9.25	7.06	0.28	2.67	**0.03**	3.15	2.13
T143L *	47.38	>>	56.91	>>>	>>>	>250	1823.52	**0.20**	35.61	>>>
L110R/R122K/Y/F134S/P142L/D144A**	50.92	38.99	1.08/0.86	33.15	yok	44.62	yok	**0.29**	75.61	49.67

**Levicnic-Stezinar S. Hepatitis B surface antigen escape mutant in a first time blood donor potentially missed by a routine screening assay. Clin Lab 2004;50:49-51.*
***Westhoff TH, et al. Fatal hepatitis B virus reactivation by an escape mutant following rituximab therapy. Blood 2003;102:1930.*

İzole anti-HBc pozitifliği

- Akut HBV enfeksiyonu pencere dönemi
- İyileşmiş HBV enfeksiyonu (anti-HBs saptanamayan düzeye düşmüş)
- Kronik HBV enfeksiyonu (Gizli – "occult")
  - Düşük düzeyde HBsAg
  - Mutasyonlara bağlı HBsAg negatifliği
  - HCV, HDV, HIV ko-enfeksiyonlarına bağlı HBsAg baskılanması
  - İmmün baskılanma
  - HBsAg – anti-HBs immün kompleksleri

Journal of Medical Virology 80:405–410 (2008)

Naturally Occurring MHR Variants in Turkish Patients Infected With Hepatitis B Virus

A. Arzu Sayiner,[1]* Ayla Özcan,[2] and Aylin Sengonul[1]
[1]Department of Clinical Microbiology, Dokuz Eylul University School of Medicine, Izmir, Turkey
[2]Department of Clinical Microbiology, Akdeniz University School of Medicine, Antalya, Turkey

ayw4 by encoding Leu127. MHR variants were detected in 22 of the 81 (27.2%) isolates. The prevalence was significantly higher in the chronic hepatitis B group (42.5%) compared to inactive HBsAg carriers (12.2%). Twenty-two samples had a total of 26 amino acid substitutions involving 14 positions. The majority of the patients had a single variation. Most of the amino acid substitutions

Sample code	Amino acid variation	Vitros (sample/cutoff)	Architect (IU/ml)
A16	Pro142 Thr	Positive (8780)	Positive (>250)
B14	Thr125Met	Positive (3830)	Positive (>250)
B17	Thr118Ala, Pro127Ala	Positive (6360)	Positive (>250)
B18	Ser143Leu	Low positive (68)	Positive (>250)
B35	Asp144Glu	Positive (5150)	Positive (>250)
B38	Thr140Ile	Positive (1440)	Positive (>250)

Grup (mutasyonlu örnek/sayı)	PreS1 (ortalama)	PreS2 (ortalama)	S (ortalama)	Toplam (ortalama)
Kr. HBV enf. (17/22)	**1-5 (1.2)**	**1-5 (2.1)**	**1-4 (2)**	**1-10 (4.2)**
Kr. Hep B; immüntolerans (1/3)	2	3	1	6
Kr. Hep. B, HBeAg + (5/5)	1-5 (3)	1-3 (1.6)	1-4 (2.5)	1-10 (4.4)
İnaktif HBV taşıyıcısı (6/8)	2	1-5 (2.4)	3-4 (3.5)	1-9 (4.7)
Kr. Hep. B, HBeAg - (5/6)	1	1-3 (2.3)	1	2-5 (3.2)

preS1 33- S 162 amino asitler

Grup (mutasyonlu örnek/sayı)	PreS1 (ortalama)	PreS2 (ortalama)	S (ortalama)	Toplam (ortalama)
Alışılmış dışı serolojik profil (24/26)	**1-4 (1.8)**	**1-5 (2.1)**	**1-15 (3.1)**	**1-24 (5.2)**
İzole anti-HBc pozitif (1)	4	5	15	24
HBsAg – anti-HBc + anti-HBs + (1)*	0	2	6	8
HBsAg ve anti-HBs pozitif (8/8)*	1-2 (1.3)	1-4 (2.1)	1-5 (2.3)	1-9 (4.6)
HBsAg +/- (4/4)	1-4 (3)	1-4 (3)	1-2 (1.3)	3-9 (6.5)
HBsAg + anti-HBc - (10/12)	1-2 (1.7)	1-3 (1.3)	1-6 (2.4)	1-6 (2.9)

Grup (mutasyonlu örnek/sayı)	PreS1 (ortalama)	PreS2 (ortalama)	S (ortalama)	Toplam (ortalama)
Kc. tx+HBV re-enf. **(5/5)**	**1-4 (2.6)**	**2-5 (3.2)**	**3-5 (3.6)**	**8-13 (9.4)**
Akut HBV enf. Pencere dönemi **(2/3)**	**2**	**3-5 (4)**	**1**	**6-7 (6.5)**

İzolatların tümü (58) genotip D

Serotipler:
2 ayw1, 46 ayw2, 6 ayw3, 2 karışık

Eylem Karataş; IUMS, 2008

PreS ve S gen bölgelerinde sık mutasyon rastlanan (>5) kodonlar ve mutasyonları

Bölge	Mutasyonlar	Kronik HB	Atipik	KC Tx reenf	Akut HB	Aşılı Hemodiyaliz	Toplam
PreS1	L85I	2 (9)	7 (29)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	9
	L85M	0 (0)	0 (0)	1 (20)	0 (0)	0 (0)	1
	A90T	4 (18.2)	4 (17)	1 (20)	1 (33.3)	0 (0)	10
	A90V	1 (4.5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1
	N114D	5 (22.7)	2 (8)	2 (40)	1 (33.3)	0 (0)	10
	N114E	0 (0)	0 (0)	1 (20)	0 (0)	0 (0)	1
PreS2	R18K	1 (4.5)	3 (13)	2 (40)	1 (33.3)	0 (0)	7
	F22L	1 (4.5)	1 (4)	1 (20)	1 (33.3)	0 (0)	4
	F22S	0 (0)	1 (4)	1 (20)	0 (0)	0 (0)	2
	V39A	3 (13.6)	5 (21)	1 (20)	0 (0)	0 (0)	9
	P41H	12 (54.5)	14 (58)	3 (60)	1 (33.3)	1 (50)	31
	P41L	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (33.3)	0 (0)	1
	P52L	2 (9)	0 (0)	1 (20)	2 (66.6)	0 (0)	5
S	F8L	2 (9)	2 (8)	1 (20)	0 (0)	0 (0)	5
HBs1	T118A	2 (9)	2 (8)	1 (20)	0 (0)	0 (0)	5
	T118K	0 (0)	0 (0)	1 (20)	0 (0)	0 (0)	1
HBs3	Q129H	0 (0)	2 (8)	1 (20)	0 (0)	0 (0)	3
	Q129R	0 (0)	1 (4)	0 (0)	0 (0)	1 (50)	2

Karataş E; IUMS, 2008

	Alt bölge	Mutasyonlar	Kr HB (22)	Atipik (24)	Kc Tx reenf (5)	Akut (3)	Aşılı hemodiyaliz (2)	Toplam
PreS2	**Başlama kodonu**	M1V	1	0	0	0	0	1
S	**T lenfosit epitopu**		**3**	**5**	**1**	**1**	**0**	**10**
		N40S	2	0	0	0	0	2
		C76Y	0	0	1	0	0	1
	MHR		**2**	**14**	**5**	**0**	**2**	**23**
	HBs1	L109I	0	1	0	0	0	1
		T115I	0	1	0	0	0	1
	HBs2	P120T	0	1	1	0	0	2
		P120A	0	1	0	0	0	1
		T123A	0	1	0	0	0	1
	"a" det		**0**	**9**	**2**	**0**	**2**	**13**
	HBs3	T126I	0	0	1	0	0	1
		Q129H	0	2	1	0	0	3
		Q129R	0	1	0	0	1	3
		T131N	0	2	0	0	0	2
		M133T	0	1	0	0	0	1
		Y134N	0	2	0	0	0	2
	HBs4	S143L	0	1	0	0	0	1
		S143M	0	1	0	0	0	1
		S143T	0	0	1	0	0	1
		D144E	0	0	0	0	1	1
		G145R	0	0	1	0	0	1
		G145A	0	1	0	0	0	1

Karataş E; IUMS, 2008

Sonuçlar

- ✓ Toplumumuzda okült HBV enfeksiyonu, immün ve tanısal kaçak mutantlar bulunmaktadır.
- ✓ HBsAg ile ilgili alışılmış dışı serolojik profillere ait mutantlarda sıklıkla HBV S geni, MHR ve "a" determinantı mutasyonlar bulunur.
- ✓ HBsAg testlerinin performans ve mutant saptama kapasitelerinin değerlendirilmesi gerekir.
- ✓ Farklı popülasyonlarda amino asit değişikliklerinin analizi ve bildirilmesi önemlidir.
- ✓ Mutasyonların klinik ve tanısal anlamının değerlendirilmesi değerlidir.

KLİNİK MİKROBİYOLOG GÖZÜYLE HBV VE KARACİĞER TRANSPLANTASYONU

PROF. DR. ARZU SAYINER

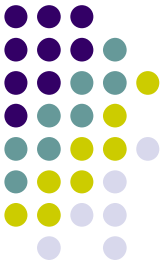
23 HAZİRAN 2009, 12:00-12:40

KLİNİK MİKROBİYOLOG GÖZÜYLE HBV ve KARACİĞER TRANSPLANTASYONU

Prof. Dr. A.Arzu Sayıner

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD. İzmir

(arzu.sayiner@deu.edu.tr)



HBV ve karaciğer transplantasyonu

- HBV'ye bağlı karaciğer yetmezliği, transplantasyon gerektiren nedenler arasında önemli bir yer tutmaktadır.
- HBV ile enfekte alıcıda, transplantasyon öncesi profilaksi uygulanmazsa, HBV enfeksiyonunun yineleme riski %80; 5 yıllık yaşam şansı %40-60'dır.
- Risk, büyük ölçüde, alıcıda transplantasyon sırasında replikatif HBV enfeksiyonu varlığı ile ilişkilidir.
- Replikasyon, duyarlılığı $\leq 10^{2-3}$ kopya/ml olan bir yöntem ile değerlendirilmelidir.

Profilaksi

- Uygun profilaksi ile HBV yineleme riski iki yıllık dönem için %10'nun altına indirilebilir.
- Profilakside, HBIG ve/veya antiviral nükleoz(t)id analogları kullanılmakta, kombinasyon tedavisi yeğlenmektedir.
- IV HBIG'nin pahalı olması ve kullanım güçlüğü nedeniyle, kısa süreli IV HBIG kullanımı veya IM olarak düşük dozda kullanımı yönünde çalışmalar bulunmaktadır.
- HBIG tek başına kullanıldığında, dozun yetersiz kalması, erken dönemde nükse; S antijeni (özellikle "a" determinantı) mutasyonları ise geç dönemde nükse yol açabilir.



HBIG uygulaması

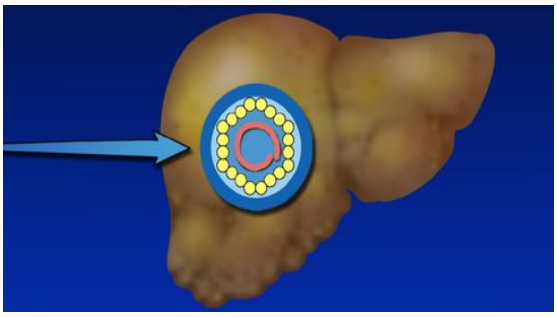
- HBIG'ne olan gereksinim, transplantasyon öncesi virus yükü ile ilişkilidir.
- Transplantasyon öncesi (doğal veya antiviral tedavi ile) HBV-DNA PCR negatif veya düzeyi 10^{2-3} kopya/ml altında olan olgularda, kısa süreli IV HBIG kullanımının ardından IM yolla uygulanan düşük doz antikor tedavisi yeterli olabilmektedir.
- Transplantasyon öncesi HBV viral yükünün önemi nedeniyle, nakilden önce antiviral ajanlarla HBV-DNA miktarının azaltılması, saptanamaz düzeye indirilmesi önerilir.
- Transplantasyondan birkaç ay önce başlanacak antiviral tedavi ile virus replikasyonu baskılanmalı, transplantasyondan sonra HBIG + antiviral kombinasyonu ile profilaksi sürdürülmelidir.
- Kullanılacak antiviral ajan ve süresi; HBIG dozu, veriliş şekli ve kullanım süresi; tedaviyi yönlendirecek HBV-DNA eşik değerleri ve alternatif tedaviler (HBV aşısı, vb) konularında henüz yanıtlanmamış sorular bulunmaktadır.

İzlem

- HBsAg negatif, anti-HBc pozitif alıcıda, solid organ (karaciğer, böbrek, kalp) transplantasyonunun ardından HBV reaktivasyonu gelişebilir.
- İzlem, HBsAg ve HBV-DNA ile yapılmalıdır. Normal koşullar altında, 3 aylık aralarla HBsAg, anti-HBs ve HBV-DNA PCR izlemi önerilmektedir.
- İzlemde %24 olguda serumda, %30 olguda karaciğerde HBV-DNA pozitifliği saptanmaktadır.
- Olguların izleminde kullanılacak HBV-DNA testinin duyarlılığı önemlidir.

- HBV-DNA'da beklenen yanıtın alınamaması durumunda, tedavinin düzgün kullanılmaması ile ilaç direnci olasılıklarının ayrılması gereklidir.
- Bu amaçla, antiviral ajanlara direnç gelişimini belirleyecek mutasyon analizleri yapılmalıdır.
- HBV nüksü saptanan olgularda tedavi, giderek artan antiviral seçenekleri ile daha kolay düzenlenebilmektedir.
- Transplantasyon sonrası profilaksinin, bir süre sonra kesilip kesilemeyeceği bilinmemektedir. Bu kararın verilmesinde karaciğer dokusunda HBV-DNA ve/veya cccDNA'nın araştırılması yol gösterici olabilir.

HBV ile enfekte verici ve karaciğer transplantasyonu



Anti-HBc (+) verici ve transplantasyon



- Alıcının HBV bağışıklığı taşımaması, vericinin anti-HBc +/- , anti-HBs pozitif olması durumunda, karaciğer nakliyle HBV bulaşma riski %33-100 arasında bildirilmektedir.
- Verici karaciğerinde HBV DNA'nın bulunması durumunda risk yükselmektedir.
- Plazmada HBV DNA'nın saptanamaması, karaciğer dokusunda virus bulunmadığının kanıtı değildir.
- Alıcının anti-HBs pozitif olması durumunda risk azalmaktadır.
- Genellikle dokuda HBV-DNA testi yapılamadan transplantasyon gerçekleştirildiği için seronegatif transplant adaylarının aşılanması ve anti-HBs yanıtının gösterilmesi önemlidir.
- Nakil, öncelikle HBsAg (+) alıcıya, ikinci sırada anti-HBs (+) alıcıya, son seçenek olarak profilaksi altında anti-HBc (-) alıcıya yapılabilir.



- Transplantasyon sonrası uygulanacak profilaksi konusunda uzlaşılmış bir öneri bulunmamaktadır.
- Söz konusu vericilerin, karaciğer dışı solid organ transplantasyonunda sorun oluşturmadığı, klinik ve biyokimyasal HBV gelişmediği gösterilmiştir. Yine de alıcının HBV'ye karşı doğal bağışık veya aşılı olması ve aşılı olgularda transplantasyona yakın anti-HBs kontrolü önerilir.

HBsAg (+) verici ve karaciğer transplantasyonu



- Bu tür bir vericinin karaciğeri sadece HBsAg pozitif alıcılarda kullanılabilir.
- Karaciğerde hasarın minimal olması ve vericide viral yükün 10^{2-3} kopya/ml'nin altında olması durumunda kullanılması önerilir.
- Vericide HCV ve HDV koenfeksiyonu olmamalıdır.
- Transplantasyon sonrası uygulanan HBIG + lamivudin ile HBV'nin baskılandığı ancak ciddi HDV enfeksiyonu geliştiğine ilişkin olgu sunumu vardır.

Kaynaklar



- Donataccio D, Roggen F, Reyck CD, et al. Use of anti-HBc positive allografts in adult liver transplantation: toward a safer way to expand the donor pool. Transpl Int 2006,19: 38-43.
- Franchello A, Ghisetti V, Marzano A, et al. Transplantation of hepatitis B surface antigen–positive livers into hepatitis B virus–positive recipients and the role of hepatitis delta coinfection. Liver Transpl 2005,11: 922-8.
- Knoll A, Pietrzyk M, Loss M, et al. Solid-organ transplantation in HBsAg-negative patients with antibodies to HBV core antigen: Low risk of HBV reactivation. Transplantation 2005;79: 1631-3.
- Marzano A, Lampertico P, Mazzaferro V, et al. Prophylaxis of Hepatitis B virus recurrence after liver transplantation in carriers of lamivudine-resistant mutants. Liver Transpl 2005; 11: 532-8.
- Terrault N, Roche B, Samuel D. Management of the hepatitis B virus in the liver transplantation setting: A European and an American perspective. Liver Transpl 2005;11: 716-32.
- Viral hepatitis guidelines in hemodialysis and transplantation. Am J Transplant 2004, 4:72-82.

POST TRANSPLANT LENFOPROLİFERATİF HASTALIKLARDA VİRUSLARIN ROLÜ

PROF. DR. MERAL GÜLTEKİN

23 HAZİRAN 2009, 14:00-14:40

Post Transplant Lenfoproliferatif Hastalıklarda (PTLH)

Virusların Rolü



Prof.Dr.Meral Gültekin

Post Transplant Lenfoproliferatif Hastalıklarda (PTLH)

Virusların Rolü

Sunum planı

- Giriş,tanımlar
- PTLH-EBV birlikteliği
- Epidemiyolojik veriler,risk faktörleri
- Patofizyoloji
- Primer EBV inf.,reaktivasyon,latent inf…
- Latent nükleer antijenler
- Klinik-ayırıcı tanı
- Önlem ve tedavi yaklaşımları
- Aşı
- EBV ve immün sistem monitörizasyonu
- Anti viraller

Prof.Dr.Meral Gültekin

Lenfoproliferatif hastalıklar

- *Otoimmün Lenfoproliferatif Sendrom*
- *Multicentrik Castleman Hastalığı*
- *Anjioimmunoblastik Lenfadenopati*
- *İmmün yetmezliklere eşlik eden LPH*
  - *Konjenital immün yetm .*
  - *AIDS le birlikte*



PTLH

- 1968 Doak ve ark.böbrek tx..lenfoma
- 1984 Starzl ve ark.PTLH tanımını yapıyorlar..
- Organ tx'in iyatrojenik bir komplikasyonudur.
- Mortalite oranı % 30- 60

PTLH sınıflama

- **Hiperplastik PTLH 'erken lezyonlar'**
  Reaktif plazmositik hiperplazi
  İnfeksiyöz mononükleoz
  Atipik lenfoid hiperplazi

poliklonal

- **Polimorfik PTLH**

- **Lenfomatöz PTLH (monomorfik)**
  B hücreli lenfoma
  Diffüz büyük B hücreli lenfoma
  Burkitt / Burkitt benzer lenfoma
  Maltoma
  T hücreli lenfoma
  Periferal T hücreli lenfoma
  Anaplastik büyük hücreli lenfoma
  Hepatosplenik gamma-delta T lenfoma

monoklonal

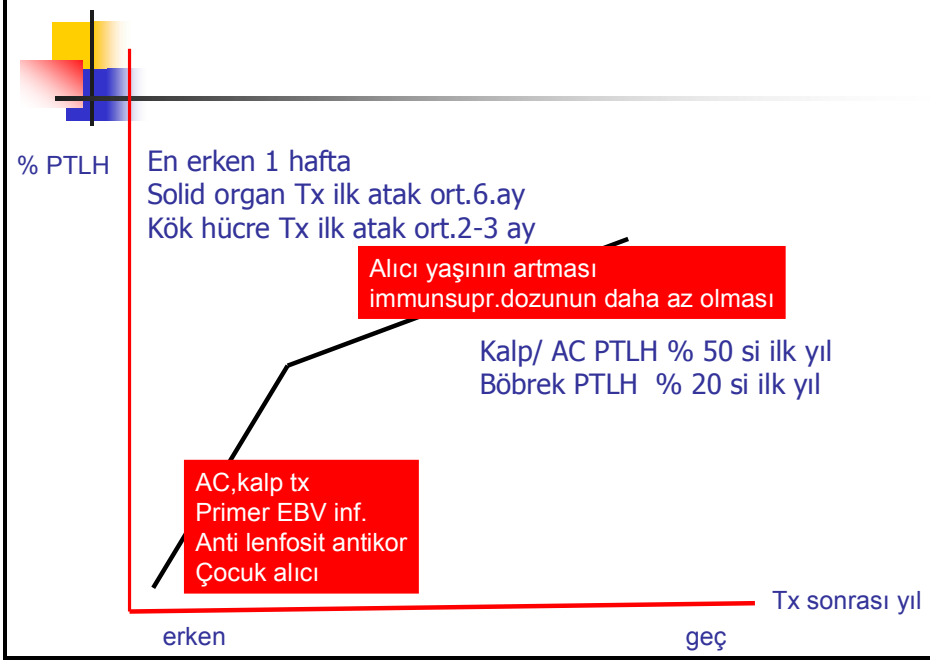
- **Diğer**
  Plazmositom
  Miyeloma

PTLH gelişme oranı ?

- Barsak tx % 20
- Kalp / AC tx %5-20
- KC tx % 2-8
- Böbrek tx % 1-10
- T hc.depleted Kİ % 24
- **ort : % 0.8 - 32**

Etkileyen en önemli faktörler
1-Tx türü
2-İmmünsüpresif ilaç türü / dozu

PTLH : Ne zaman ?



PTLH risk faktörleri

Solid organ ve Kİ nakil olgularında farklılıklar gösterir.
Temel olarak :

Yaş : 18 Y dan küçük olanlarda RR : 2.81
1 Y dan küçük olanlarda RR : 10.37

Beyaz ırkta daha fazla
EBV immün durumu : seronegatiflerde rsk fazla
CMV inf.
Özgül anti lenfosit tedavi
HLA uyumsuzluğu
T hücre deplesyonu

PTLH risk faktörleri : İmmünsüpresif kullanımı

En önemli risk faktörüdür.

İndüksiyon ve rejeksiyon tedavisinde kullanılan immunsüpresyon..
Özellikle OKT3,ATG kullanımı…. Takrolimus,siklosiporin..PTLH riski artıyor..

AC / kalp tx hastalarnda erken dönemde daha fazla görülmesinin en önemli nedeni..

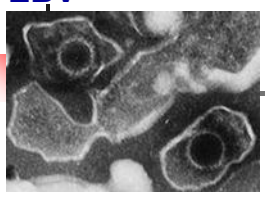
Il2 antikor kullanımı artışa neden olmadı

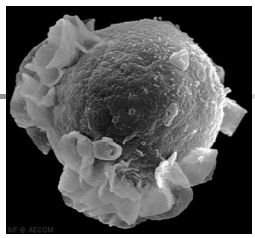
Mycophenolate mofetil ? Artış gözlenmedi ancak CMV inf ve BK virus nefropatisi arttı

Rapamisin inhibitörleri –veri yeterli değil-

Konumuzun Kahramanları

EBV

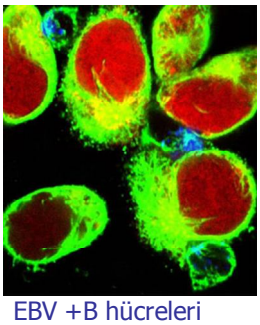




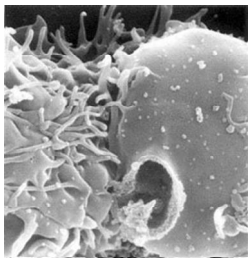
B lenfositleri EBV nin en önemli rezervuarıdır

CD 21 : EBV reseptörü
aynı zamanda C3d reseptörü



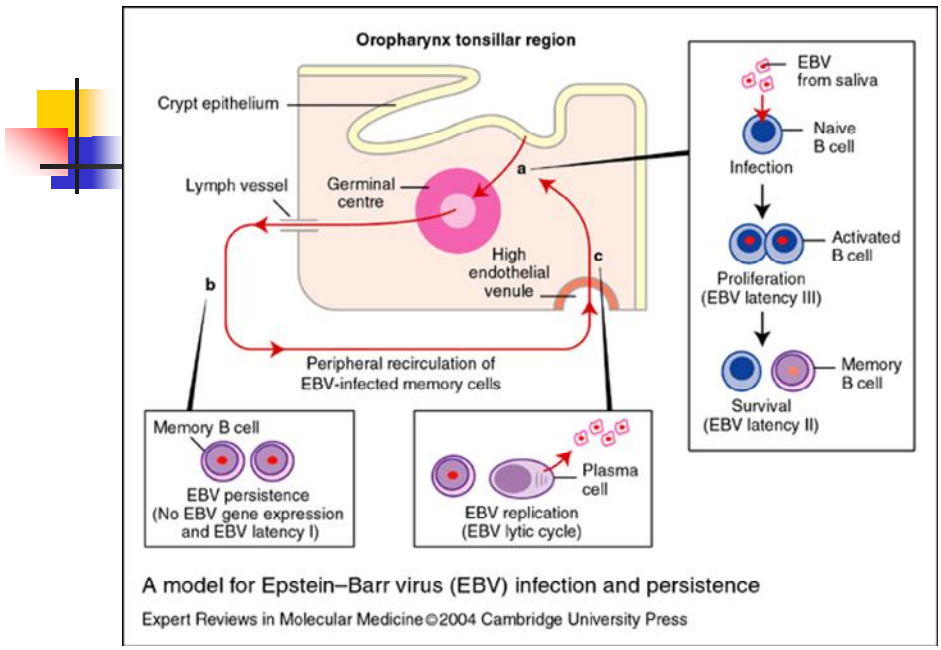


EBV +B hücreleri



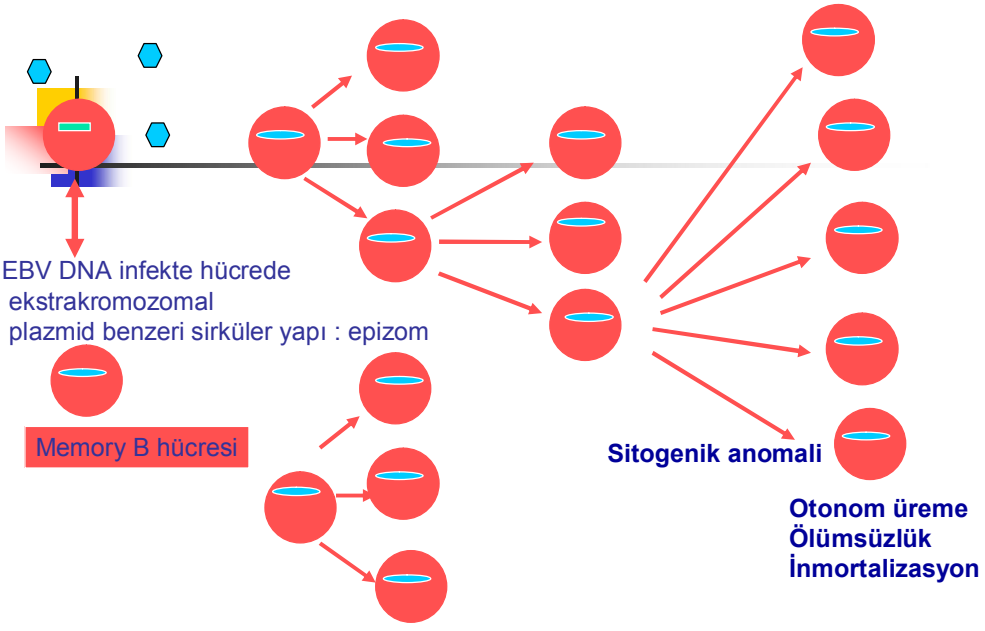
Sitotoksik T lenfosit : CTL

EBV spesifik CTL lerin kontrolundedir



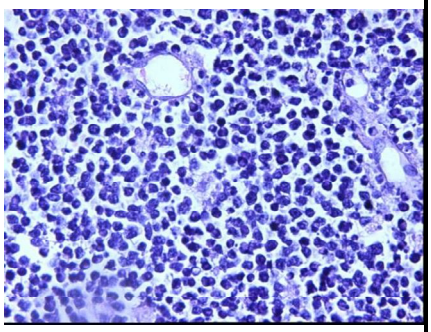
A model for Epstein–Barr virus (EBV) infection and persistence

Expert Reviews in Molecular Medicine ©2004 Cambridge University Press



EBV ile ilişkili maligniteler

- Burkitt lenfoma
- SSS lenfoma
- B hücreli lenfoma
- T hücreli lenfoma
- Pr.effüzyon lenfoma
- Hodgkin 's
- Nazofarengeal karsinoma
- Düz kas tümörü
- **PTLH**



EBV antijenleri

Litik : *Membran Ag MA*
Erken Ag EA-D, EA-R
Viral kapsid Ag VCA

Latent : *EB Nükleeer Ag' ler EBNA 1*
EBNA 2
EBNA 3 (3a)
EBNA 4 (3b)
EBNA 5 (LP)
EBNA 6 (3c)
Latent membran Protein LMP1
Terminal Proteinler LMP2A7B

EBV latent genlerin ekspresyonu

Latent tip	EBER	EBNA-1	EBNA-2	EBNA-3	LMP1	LMP2	BARTs	
I	+	+	-	-	-	-	+	*Burkitt L.*
II	+	+	-	-	+	+	+	*HL,T cell L PEL*
III	+	+	+	+	+	+	+	*PTLH,IM*
IV	+	+,-	-	-	-	-	?	*Sağlıklı taşıyıcı*

Latent fazda en erken beliren ag

EBNA 1 Esas görevi ,EBV episomunun devamlılığını sağlamaktır.
B lenfomada EBNA 1 inhibisyonu apopitozisi indükler..

EBNA 2 proteinini aktive eder..
Apopitozisi spesifik olarak bloke eder..
Nur 77 (nükleer hormon reseptörü) üzerinden mitokondriden sitoplazmaya translokasyon..sitokrom c salınımı indüklenir

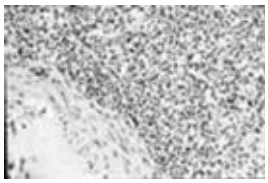
LMP 1
Hücreler arası adezyon moleküllerini stimüle eder
Sinyal iletimini etkiler
NF alfa B aktivasyonu çok sayıda anti apopitotik geni (bcl 2,md 1,c/AP 2 vb.) ekspre eder.
Apopitozisi engeller
Onkogendir.B hc transformasyonunu sağlar ..

LMP 2A B hücresinin yaşam süresini arttırır
Ras / P / 3K / Akt sinyal yolu üzerinden
Sinyal iletiminde rolu olan tirozin kinazları inhibe eder

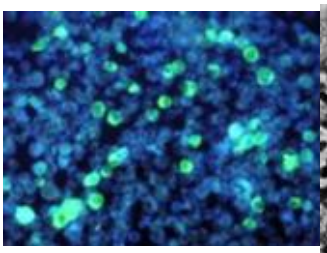
1- Apopitozisin engellenmesi

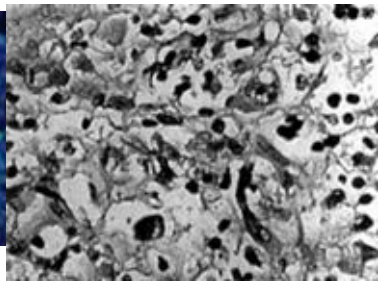
2-T h süpresyonu sonucu CD 8+ T hc..artması …

3-İmmunsüpresyonda CTL ler baskılanması ….



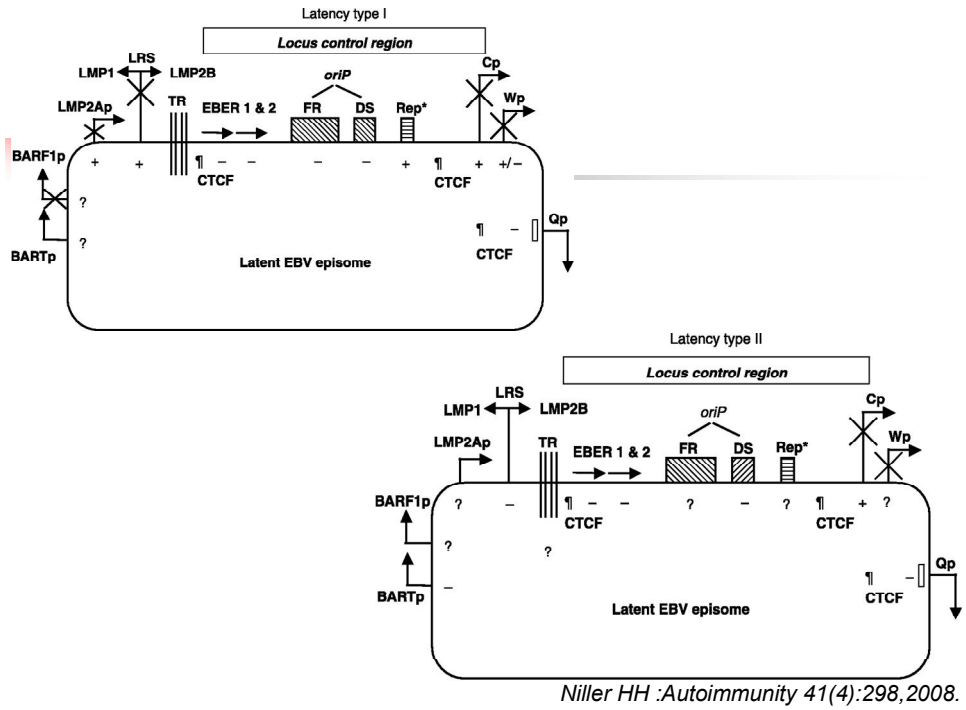
B hücre proliferasyonu



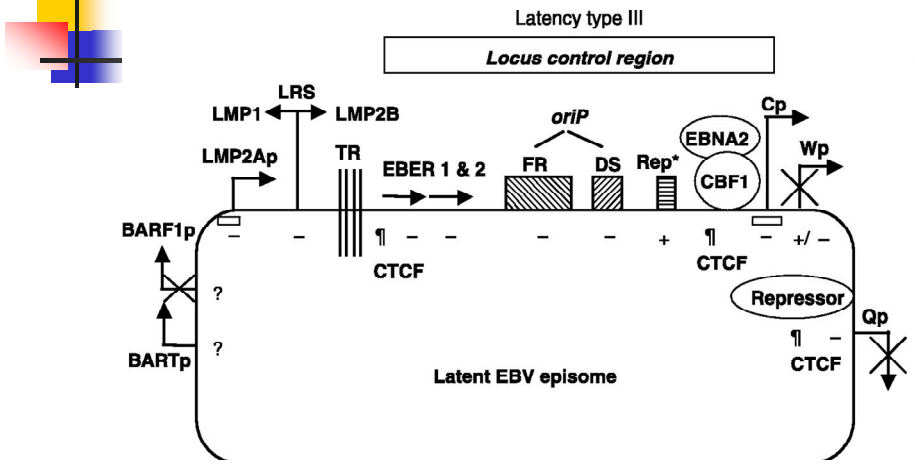


Büyük hücreli
B cell lenfoma

B hücre immortalizasyonu…
Lenfomagenez başlar

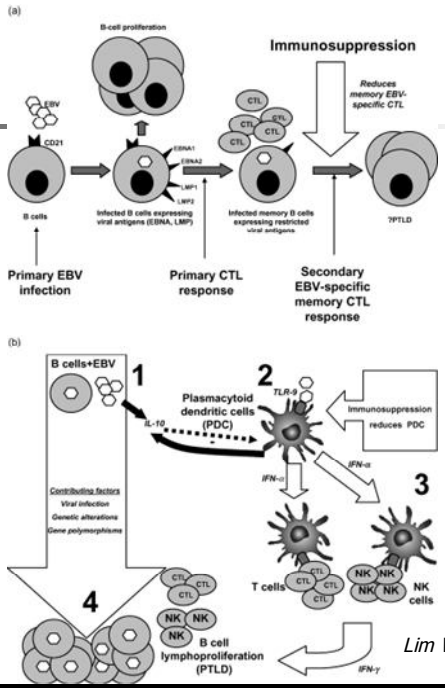


Niller HH :Autoimmunity 41(4):298,2008.



Niller HH :Autoimmunity 41(4):298,2008.

PTLH Patogenez



Lim WH,Nephrology 11:355,2006.

Klinik

- En sıklıkla allograft….
- İlk yıl gelişen PTLH gnl allogratta
- GIS
- Sinonazal kavite
- Deri…
- SSS
- izole lenf nodları
- Vaskülit

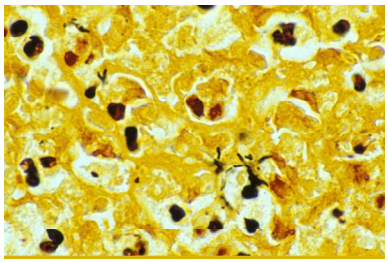
ŞÜPHELEN !!!

Organ disfonksiyonu
Nedeni açıklanamayan ateş
Diare,GIS kanama
Kilo kaybı
Adenopati
Kitle lezyonu
Nazal hava yolu obst.
SSS yakınmaları

PTLH Ayırıcı Tanı

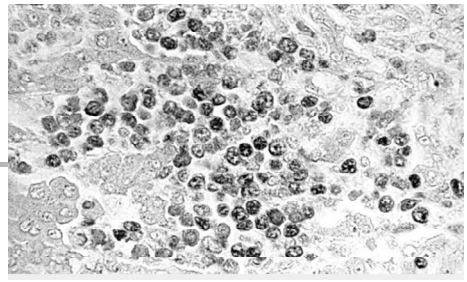
Organ rejeksiyon epizodu
İnfeksiyonlar..
Aspergillus
CMV..
Kedi ısırığı hastalığı

Bartonella henselae
Kedi ısırığı öyküsü
B.henselae IgM
Steiner boyama…



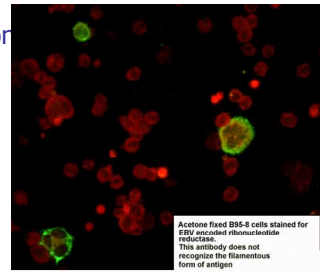
Tanı

Altın standart : Patoloji
Doku eksizyonal biyopsisi
İğne aspirasyonu tercih edilmez

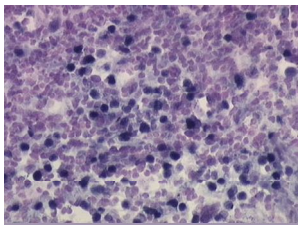


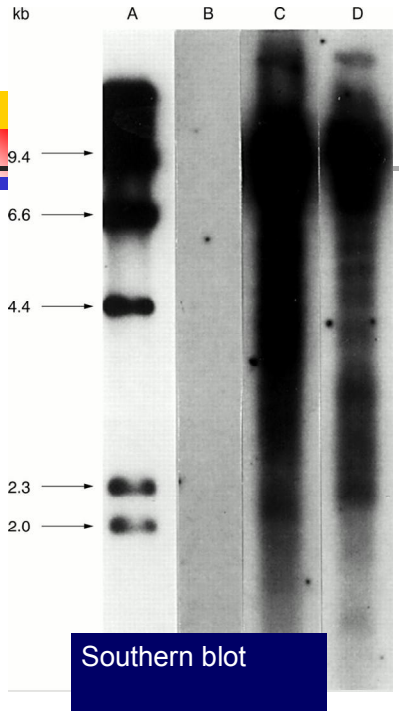
KC dokusunda lenfoma hücreleri EBV encoded RNA 1 (EBER 1

Floresan insitu hibridizasyon



İmmunohistokimya





Southern blot

İmmunfenotip belirlenmesi

LDH düzeyi

Seroloji ?

EBV DNA PCR

Radyolojik görüntüleme

EBV serolojisi : nerede ? Tx öncesi durumu belirlemede yararı var

	VCA IgG	VCA IgM	EA IgG	EBNA
Duyarlı	-	-	-	-
Primer inf.	+	+	- / +	-
Geçirilmiş inf.	+	-	- / +	+
Reaktivasyon	++	-	++	++

EBV viral yük izlemi

Çeşitli çalışmalar : % 60 -100 duyarlı
% 71-100 özgül

- Gruplar standardize değil
- Örnek : Plazma ? ,tam kan ? , mononükleer hc ?
- Prediktif değer ? 10 000 kopya / ml plazma ?
- Alıcının izlemi önemli..
  - Seronegatif alıcı,seropozitif donör
  - T hücre deplesyonu
  - HLA uyumsuz kök hücre nakli

EBV DNA – PTLH …
Daha geç gözlenir
Prognoz daha kötü

- EBV DNA ve EBV CTL birlikte değerlendirilirse daha duyarlı ve özgül sonuçlar alınır..
- PTLH olmaksızın EBV CTL yanıtı düşük olabilir..
- Tx öncesi genetik yatkınlığı olanların araştırılması ??
  BCL 6 mutasyonu : prognostik belirleyici.. tedaviye yanıtı ve klinik gidişi belirlemede ..
- Lenfosit apopitozisinde bozukluk : Fas proteinini kodlayan TNFRSF6 geninde mutasyon var mı?
- IL 10 izlemi

  •EBV transforme B lenf için büyüme faktörüdür.

Tedavi yaklaşımları

- İmmünsüpresyonun azaltılması
- Monoklonal anti B lenfosit tedavisi
- Adoptif immunoterapi
- EBV spesifik T hücreleri
- Antiviral tedavi
- Il-6 monoklonal ab.
- Alfa interferon
- Sitotoksik kemoterapi
- Cerrahi rezeksiyon
- Radyoterapi
- NF-alfa beta inhibitörü : Simvastatin
- Proteosom inhibitörü : Bortezomib

İmmünsüpresyonun azaltılması

- İlk kez 1984 Starzl ve ark.
- İmmünsupresyonun azaltılmasına yanıtsızlık nedenleri :
  - *Serum LDH 2.5 x*
  - *Organ disfonksiyonu*
  - *Çok sayıda iç organ tutulumu*
- EBV DNA – ise bu yaklaşımda başarı şansı az..

Anti CD 20 monoklonal antikor

- B hücre ekspresyonunu nötralize eder
- insan / fare monoklonal anti CD 20 ak.(Rituximab)
- Iyot 131 bağlı anti-CD 20 ak (tositumomab)
- Yıttrıum 90 bağlı anti-CD 20 ak (ibrutumomab)
- Viral yük azalmasına karşın tümör progresyonu göstermeyen olgular da var !!
  - Klonal anti-CD 20 mutantları tanımlandı

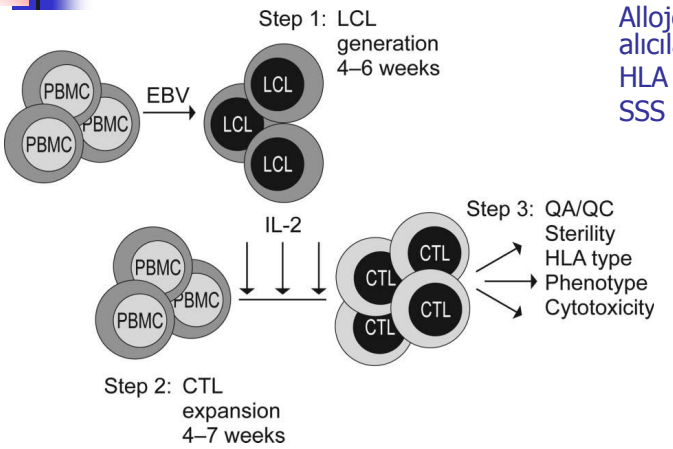
- SOT : otolog lenfokinle aktive edilmiş öldürücü hücreler (LAK)..

- Anti viraller : Latent fazda etkisiz ancak litik fazda virus olasılığı nedeni ile ?
- Anti sitokinler : Anti IL 6 ak…..
  IL 10 baskılanması :Rapamycin
- INF alfa..
- Sitotoksik kemoterapi..
- LMP1 ve LMP2 latent genlerin spesifik olarak baskılanması
- Sinyal üretimi üzerine etki….(Simvastatin)

EBV spesifik CTL uygulaması

A-ex vivo EBV CTL
B-donör EBV CTL

Kimlerde ?
Allojeneik kök hücre alıcıları,
HLA uyumsuz AC tx ,
SSS PTLH



- EBV spesifik CTL tedavisinde ex ..EBNA 3 B de delesyon….

Tedaviye yanıtı etkileyen faktörler

- Multipl organ tutulumu
- SSS tutulumu
- Geç PTLH
- Monoklonal olması
- T veya NK PTLH
- EBV – PTLH
- Alıcı kökenli olması
- Proto onkojen ya da tümör süpresör genlerin varlığı

Yanıt aranmaya devam edilen noktalar

- Retransplantasyon ? Prognoz ? PTLH rekürrensi olmadı
- EBV seronegatif alıcı..tx öncesi immunizasyon ? Dendritik hücre bazlı aşılar
- Tx öncesi kan nakli ile serokonversiyon oluşturulması ???
- İyatrojenik EBV inf…Etik sorunlar ? Riskli ..
- EBV viral yük izleminde protokoller çeşitli !!

Kaynaklar

Antiga LD,Lıver Transplant 13:343,2007.
Adhikary D,JVI 82:3903,2008.
Babel N,Transplant Infectious Dis 7:133,2005.
Bakker NA,Transplantation 83:433,2007.
Carpentier L,JID 188:1853,2003.
Dhardnidharka V,Ped Nephrology 2007.
Greenfield HM,Pediatr Blood Cancer 47 :200,2006
Joost W ,Blood 99:4364,2002.
Lee T, Am J Transplant 5:2222,2005.
Lim WH,Nephrology 11:355,2006.
Niller HH,Autoimmunity 41:298,2008.
Preiksaitis JK ,Clin Infect Dis 33:38,2001.
Suzuki T,Pediatr Transplant 11:749 2007
Thomas F,Clin Infect Dis 45:1056 2007
Timurağaoğlu A,T J Hematol 22:197,2005.
Wu JF,Transplantation 87:758,2009.
Yağdı T,TKD 32:208 2004.

YENİ ANTİ-HIV AJANLAR; MARAVIROC VE RALTEGRAVIR

PROF. DR. DÜRDAL US

23 HAZİRAN 2009, 15:50-16:20

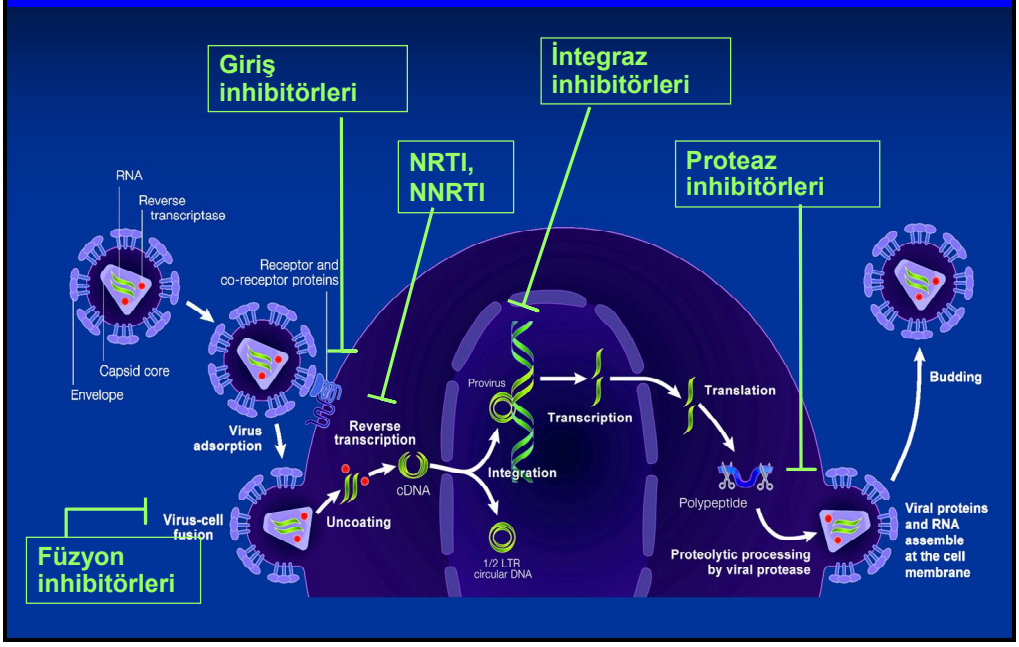
Yeni Anti-HIV Ajanlar: Maraviroc ve Raltegravir

Prof.Dr.Dürdal Us
Hacettepe Üni. Tıp Fak. Mikrobiyoloji ve Klin. Mik. AD. Ankara

Kısaltma ve Açıklamalar

- ARV → Antiretroviral
- HAART → Highly Active Anti-Retroviral Therapy
- RT → Revers transkriptaz
- NRTI → Nükleozid/nükleotid RT inhibitörü
- NNRTI → Non-nükleozid RT inhibitörü
- PI → Proteaz inhibitörü
- IN → İntegraz
- TE (“Treatment-experienced”) → Daha önce (≥6 ay) NNRTI, NRTI ve PI tedavileri almasına rağmen viral yükü >1.000 kopya/mL olan ve/veya bu 3 ilaç sınıfından en az birine karşı genotipik/fenotipik direncin saptandığı hastalar
- TN (“Treatment-naive”) → Daha önce hiç ARV tedavisi almamış hasta
- OBT (“Optimized Background Therapy”) → TE hastalarda genotipik/fenotipik olarak virusun duyarlı olduğu saptanan ilaçlarla uygulanan tedavi protokolü

HIV replikasyon döngüsü ve ARV ajanların hedefleri



Bazı ilk'ler

- 1981 → İlk AIDS olgusu
- 1983 → HIV'in tanımlanması
- 1987 → İlk ARV ilaç olan zidovudin'in onayı
- 1995 → İlk PI ilaç olan saquinavir'in onayı
- 1996 → İlk NNRTI ilaç olan nevirapin'in onayı
- 1996 → HAART uygulamasının başlaması
- 2003 → İlk füzyon inhibitörü enfuvirtid'in onayı
- 2007 →
  - İlk giriş inhibitörü maraviroc'un onayı
  - İlk integraz inhibitörü raltegravir'in onayı

Thayer A. Chemical&Engineering News 2008; 86: 29

DRUG THERAPIES

Antiretrovirals emerging over the past two decades have changed HIV therapy

PRODUCT	GENERIC NAME	MANUFACTURER	APPROVED
Nucleoside/Nucleotide Reverse Transcriptase Inhibitors			
Retrovir	Zidovudine (AZT)	GlaxoSmithKline	1987
Videx	Didanosine (ddI)	Bristol-Myers Squibb	1991
Hivid[a]	Zalcitabine (ddC)	Roche	1992
Zerit	Stavudine (d4T)	Bristol-Myers Squibb	1994
Epivir	Lamivudine (3TC)	GlaxoSmithKline	1995
Combivir	Lamivudine, zidovudine	GlaxoSmithKline	1997
Ziagen	Abacavir	GlaxoSmithKline	1998
Trizivir	Abacavir, zidovudine, lamivudine	GlaxoSmithKline	2000
Viread	Tenofovir	Gilead Sciences	2001
Emtriva	Emtricitabine	Gilead Sciences	2003
Epzicom	Abacavir, lamivudine	GlaxoSmithKline	2004
Truvada	Tenofovir, emtricitabine	Gilead Sciences	2004
Nonnucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors			
Viramune	Nevirapine	Boehringer Ingelheim	1996
Rescriptor	Delavirdine	Pfizer	1997
Sustiva	Efavirenz	Bristol-Myers Squibb	1998
Intelence	Etravirine	Tibotec	2008
Protease Inhibitors			
Invirase	Saquinavir	Roche	1995
Crixivan	Indinavir	Merck	1996
Norvir	Ritonavir	Abbott Laboratories	1996
Viracept	Nelfinavir	Agouron Pharmaceuticals/Pfizer/Roche	1997
Agenerase[a]	Amprenavir	GlaxoSmithKline	1999
Kaletra	Lopinavir, ritonavir	Abbott Laboratories	2000
Lexiva	Fosamprenavir	GlaxoSmithKline	2003
Reyataz	Atazanavir	Bristol-Myers Squibb	2003
Aptivus	Tipranavir	Boehringer Ingelheim	2005
Prezista	Darunavir	Tibotec	2006
Entry and Fusion Inhibitors			
Fuzeon	Enfuvirtide	Roche/Trimeris	2003
Selzentry	Maraviroc	Pfizer	2007
Integrase Inhibitors			
Isentress	Raltegravir	Merck	2007
Multiclass Combination			
Atripla	Efavirenz, emtricitabine, tenofovir	Gilead Sciences/Bristol-Myers Squibb	2006

[a] Discontinued by manufacturer. SOURCE: U.S. Food & Drug Administration

HIV/AIDS Tedavisi

- 1990'larda ARV ilaçların kullanılmaya başlaması HIV enfeksiyonunun tedavisinde önemli bir adım olmuştur.
- Tedavi ile virusun vücuttan tamamen elimine edilmesi mümkün değildir.
- Tedavinin hedefleri:
  - Viral yükün etkin olarak ve uzun süreli baskılanması
  - İmmünolojik işlevlerin düzeltilmesi ve/veya korunması
  - HIV ile ilişkili morbidite ve mortalitenin azaltılması
  - Yaşam kalitesinin artırılması
  - Vertikal HIV bulaşının önlenmesi
- Gelişmiş ülkelerin protokollerinde, CD4+ hücre sayısı $\leq 350/mm^3$ olan hastalara viral yük dikkate alınmaksızın tedavinin başlanması önerilmektedir.
- HAART uygulaması, HIV/AIDS hastalarının standart tedavisini teşkil etmektedir.

HAART

- HIV/AIDS için minimum 3 ilaçla uygulanan kombinasyon (kokteyl) tedavisi
- 1996 yılında başlayan uygulama ile
  - Plazma viral yükünde azalma,
  - CD4 hücre sayısında yükselme,
  - Lenf nodu yapısının restorasyonu,
  - AIDS'e bağlı ölüm oranlarında dramatik azalma sağlanmıştır.
- Tedavi verilen hastalarda, virusun duyarlı olduğu sürece çok sayıda olası protokolün uygulanma seçeneği vardır.
- Tedavinin virolojik başarısı, uyum oranının yüksek olmasına bağlıdır. Optimal virolojik süpresyon için uyumun ≥%95 olması gereklidir.

Updated IAS-USA Guidelines: When to Start😐

Year	Recommendation to Begin Immediate Therapy	Recommendation to Consider Immediate Therapy
2006	• Active AIDS • No history of active AIDS, but CD4+ cell count ≤ 200 cells/mm^3	• No history of active AIDS, but CD4+ cell count from 200-350 cells/mm^3 • CD4+ cell count > 350 cells/mm^3 but rapid CD4+ cell count decline, HIV-1 RNA > 100,000 copies/mL, high CV risk patients, other non-AIDS risk factors*
2008	• Active AIDS • No history of active AIDS, but **CD4+ cell count < 350 cells/mm^3**	• CD4+ cell count ≥ 350 cells/mm^3 but rapid CD4+ cell count decline (> 100 cells/mm^3/year), HIV-1 RNA > 100,000 copies/mL, high CV risk patients, other non-AIDS risk factors*

*Non-AIDS risk factors include HIV-associated nephropathy, hepatitis C, hepatitis B

Hammer SM, et al. JAMA 2008;300:555

😐 Slaytın orijinalliğinin bozulmaması için özellikle Türkçe'leştirilmemiştir.

HAART başlangıç tedavisi için önerilen protokol

Construct regimen by choosing one component from Column A and one component from Column B

Column A		Column B
NNRTI **Efavirenz**	**PI** **Atazanavir + Ritonavir** **Fosamprenavir + Ritonavir** **Lopinavir/ritonavir (*Kaletra*)**	**2-NRTI** **Tenofovir/Emtricitabine (*Truvada*)** **Abacavir/Lamivudine (*Epzicom*):** for patients who test negative for HLA-B5701

ARV Therapy Guidelines. DHHS (Department of Health & Human Services) Guidelines. www.aidsinfo.nih.gov , Jan.2008

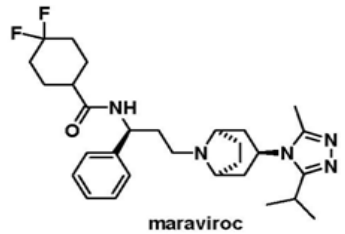
HAART : Sınırlayıcı faktörler

- Tedaviye uyumsuzluk :
  - Çok sayıda ilaç kullanımı → HAART uygulamasının ilk yıllarında hastaların aldığı tablet sayısı günde 25-30 iken, günümüzde bu sayı, Truvada (Emtricitabin+tenofovir), Combivir (Retrovir+lamivudin) ve Atripla (Efavirenz+Emtricitabin+ tenofovir) gibi kombine ilaçların kullanıma girmesiyle 2-4'e düşmüştür.
  - Beslenme ve saklama koşullarına bağımlılık
- İlaçlar arasındaki etkileşimler
- Ciddi yan etkiler → Nörolojik, neoplastik, iskelet/eklem, kardiovasküler, endokrinolojik, metabolik yan etkiler
- Çoklu ilaç direncine ve/veya çapraz dirence sahip mutantların ortaya çıkması → Birçok hastada, tedavinin ilk 3 yılı içinde en az bir kez antiretroviral tedavi rejimi modifiye edilmektedir
- Yaşam kalitesinin azalması
- Maliyet (~1500 $/ay)
- "First line" HAART ile başarısızlık ortaya çıktığında, tedavi rejimi değişikliği ≤6 ay içinde yapılmalıdır. Bu sürenin uzaması, yeni tedavi rejimlerinin başarısızlık oranını ve mortalite riskini artırmaktadır. (Petersen M, et al. CROI 2008. Abstract 798.)

Yeni ARV ilaç gereksiniminin nedenleri

- Günümüzde onay almış çok sayıda (~30) ARV ajan olmasına karşın, hızlı direnç gelişimi ve ciddi yan etkileri, bu ilaçların klinik etkinliklerini ciddi olarak sınırlandırmaktadır.
- HAART uygulamasında yeni hedefler:
  - Kullanımı kolay ilaçların/protokollerin geliştirilmesi
    - Günlük doz sayısı az (günde bir veya iki kez),
    - Toksik etkisi az
    - İlaçlar arası etkileşimi az
  - Mevcut ilaçların farmakodinamik özelliklerinin optimize edilmesi
  - Çapraz direnç gösteren mutantlara karşılı etkili modifiye NRTI, NNRTI, PI ilaçların geliştirilmesi
  - Virusun farklı replikasyon safhalarını hedef alan yeni sınıf ilaçların geliştirilmesi
    - Füzyon inhibitörleri
    - Kemokin antagonistleri
    - İntegraz inhibitörleri
    - TAT proteini ve CD4 antagonistleri
    - İmmünostimülanlar

Maraviroc



maraviroc

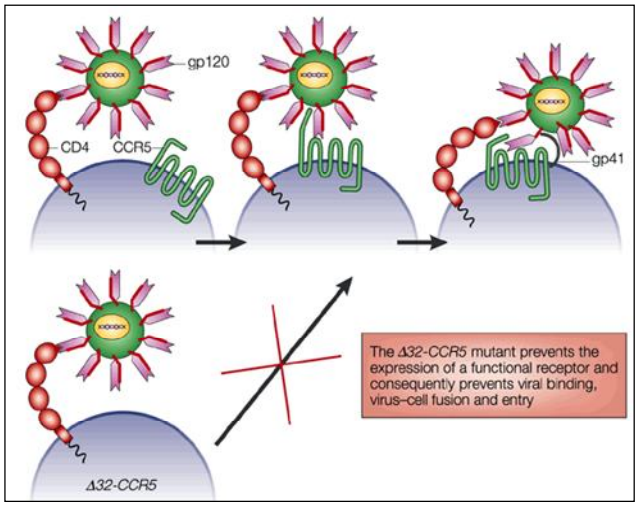
- Ticari adı → Selzentry, Celsentri
- Ürün kodu → UK 427857
- Üretici firma→ Pfizer
- FDA onayı → Ağustos 2007 (ABD), Eylül 2007 (Avrupa)
- Yapı → İmidazopiridin; küçük molekül yapılı CCR5 ligandı
- Etki → CCR5 ko-reseptör blokajı
- Preparat → Oral tablet (150 mg ve 300 mg)

Ko-reseptör inhibitörlerinin gelişimi

- 1984 → HIV reseptörü olarak CD4 molekülünün tanımlanması
  - Dalgleish AG, et al. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. Nature 1984
- 1996 → HIV majör ko-reseptörü olarak CCR5 molekülünün tanımlanması ve CCR5-delta32 mutasyonu olan kişilerin HIV enfeksiyonuna doğal direnç gösterdiğinin saptanması
  - Dragic T, et al. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. Nature 1996
  - Dean M, et al., Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CCR5 structural gene, Science 1996

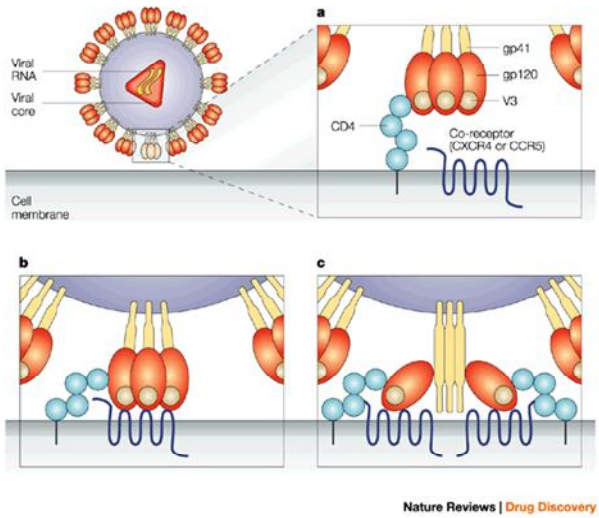
- 1997 → HIV-1 izolatlarının farklı ko-reseptörleri kullandığının saptanması
  - Björndal A, et al. Coreceptor usage of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates varies according to biological phenotype. J Virol 1997
- 1997-1999 → Kemokin reseptörü antagonistlerinin terapötik potansiyeli
  - Schols D, et al. Inhibition of T-tropic HIV strains by selective antagonization of the chemokine receptor CXCR4. J Exp Med 1997
  - Zhang YJ, Moore JP. Will multiple coreceptors need to be targeted by inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 entry? J Virol 1999
  - De Clercq E, Schols D. Inhibition of HIV infection by CXCR4 and CCR5 chemokine receptor antagonists. Antivir Chem Chemother 2001

CCR5 delta32 homozigot mutasyonu olan bireylerin HIV/AIDS'e doğal dirençli olduğunun anlaşılması ile CCR5 reseptörünün anti-viral tedavide hedef olabileceği ile ilgili çalışmalar yoğunlaşmıştır.



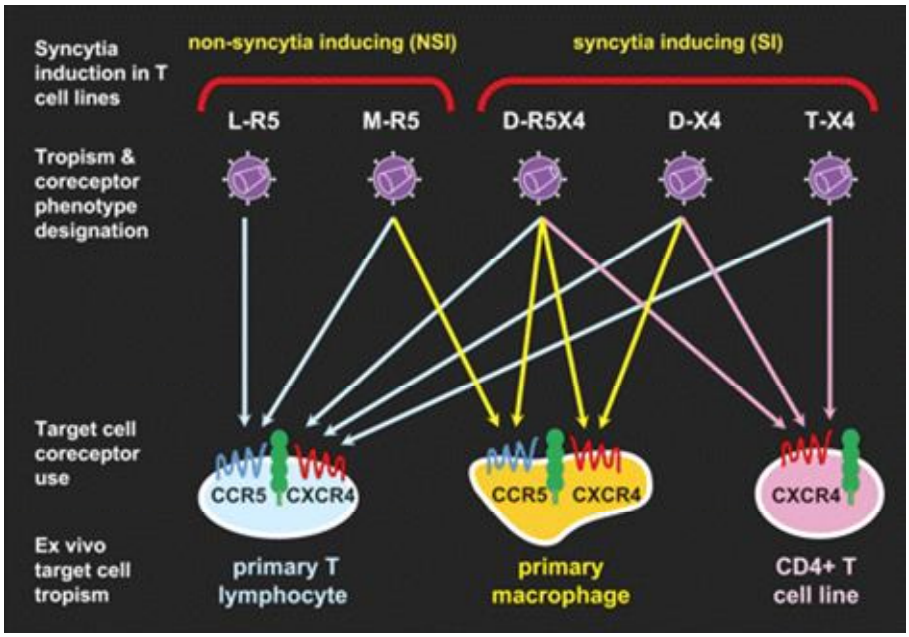
HIV'in hücreye tutunması

a) Viral zarf proteini gp120, V1 ve V2 kangallarıyla CD4 reseptörüne bağlanır
b) Oluşan konformasyonel değişiklik ile V3 bölgesi CCR5/CXCR4 ko-reseptörüne bağlanır
c) Viral zarf proteini gp41'de konformasyonel değişiklik olur, füzyon peptidi hücre membranına gömülür; viral zarf ve hücre membranı kaynaşır



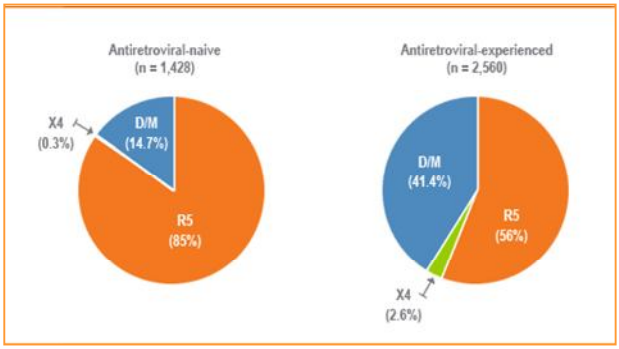
HIV'in ko-reseptör seçimi ve tropizmi

- R5 tropik HIV → Sadece CCR5 ko-reseptörünü kullanır
  - Makrofaj (M) - tropik
  - "Nonsyncytium-inducing" (NSI) virus
  - Düşük replikasyon kapasitesi
  - Hedef hücre aralığı sınırlı (aktive T hüc.)
  - Hastalığın erken döneminde predominant
- X4 tropik HIV→ Sadece CXCR4 ko-reseptörünü kullanır
  - CD4+ hücre (T) –tropik
  - "Syncytium-inducing" (SI) virus
  - Yüksek replikasyon kapasitesi
  - Hedef hücre aralığı geniş (naif, dinlenen, bellek T hüc.)
  - Hastalığın geç döneminde dominant
  - CD4 sayısında düşüş, HIV-RNA artışı ve kötü prognoz ile ilişkili
- "Dual"- tropik (R5X4) HIV → Her iki ko-reseptörü de kullanabilir
- "Mixed" - tropik HIV → R5 + X4 + R5X4 HIV popülasyonu; her iki ko-reseptörü de kullanabilir



Hastalarda HIV-1 tropizminin dağılımı

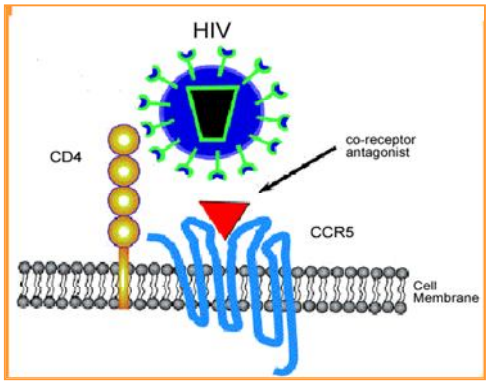
- Enfeksiyonun erken safhalarında hastaların >%80'inde R5-HIV saptanır.
- Hastalık ilerledikçe CXCR4 kullanan virusların sayısı artmaya başlar. Bu dönüşüm, doğrudan saf X4 virusların oluşumundan ziyade her iki reseptörü de kullanabilen "dual-tropik" virusların ortaya çıkmasıyla karakterizedir.
- Saf X4-HIV popülasyonunun ortaya çıkışı oldukça nadir olup, daha önce tedavi almamış (naif) hastalarda <%1, daha önce tedavi almış hastalarda ise %3-4 oranındadır.



Brumme ZL, et al. *J Infect Dis.* 2005; Moyle GJ, et al. *J Infect Dis.* 2005; Wilkin TJ, et al. *Clin Infect Dis.* 2007; Coakley E, et al. Second International Workshop on Targeting HIV Entry; Oct 20–21, 2006.

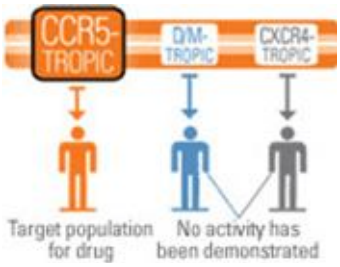
Maraviroc: Etki mekanizması

- Maraviroc, CCR5 reseptörüne bağlanarak molekülde konformasyonel değişikliğe neden olur.
- Viral gp120 proteininin V3 kangalının bağlanması bloke edilir.



HIV tropizm testi

- **Maraviroc tedavisi verilecek olan hastalarda virusun ko-reseptör kullanımının bilinmesi gerekli olduğundan tedaviye başlamadan önce HIV tropizm testi yapılmalıdır.**
- **Trofile™ Assay → Hastada bulunan HIV suşunun R5, X4 veya D/M tipi olup olmadığını belirlemek için kullanılan ticari moleküler bir yöntem (Tek döngülü rekombinant virus yöntemi)**



www.trofileassay.com/what_is_trofile

Trinh L, et al. www.natap.org/2008/ResisWksp/ResisWksp_57.htm

Tedavi almış hastalarda Maraviroc

- MOTIVATE 1 & 2 → Çok merkezli, randomize, plasebo kontrollü Faz III çalışmaları
  - "Efficacy and Safety of Maraviroc Plus Optimized Background Therapy (OBT) In Viraemic, Antiretroviral Treatment-Experienced Patients Infected with CCR5-Tropic HIV-1"
- Viral yük ≥5.000 kopya/mL , CD4 sayısı ort. 170 hücre/mm^3 olan 1076 hasta
- 48 hafta sonunda
  - Viral yük <50 kopya/mL olan hasta oranı (istatistiksel olarak anlamlı)
    - OBT+Plasebo grubunda %16
    - OBT+Maraviroc grubunda %44
  - CD4+ hücre sayısındaki artış (istatistiksel olarak anlamlı)
    - OBT+Plasebo grubunda ~ +60 hücre/mm^3
    - OBT+Maraviroc grubunda ~ +120 hücre/mm^3

Hardy D, et al. www.natap.org/2008/CROI/croi_43.htm

Tedavi naif hastalarda Maraviroc

- MERİT → Tedavi-naif hastalarda yapılan randomize çift-kör çalışma
  - A Multicenter, Randomized, Double-Blind, Comparative Trial of a Novel CCR5 Antagonist, Maraviroc Versus Efavirenz, both in Combination with Combivir (Zidovudine/Lamivudine), for the Treatment of Antiretroviral-Naive Subjects Infected with R5 HIV 1
- Başlangıç viral yükü ≥2.000 kopya/mL, CD4+ sayısı <200/mm^3 olan ve R5-HIV ile enfekte 721 hasta
- Combivir + Maraviroc ile Combivir + Efavirenz tedavileri karşılaştırılmıştır.
- 48 hafta sonunda
  - Viral yük <50 kopya/mL olan hasta oranı (istatistiksel olarak anlamlı değil)
    - Maraviroc grubunun %65'i
    - Efavirenz grubunun %69'u
  - CD4+ sayısında artış (istatistiksel olarak anlamlı)
    - Maraviroc grubunda %79
    - Efavirenz grubunda %71

Saag M, et al. www.natap.org/2007/IAS/IAS_15.htm
Lazzarin A. www.natap.org/2008/ICAAC/ICAAC_56.htm

D/M veya X4-tropik HIV-1 ile enfekte hastalarda maraviroc

- DM veya X4-tropik HIV-1 ile enfekte 186 hasta ile yapılan çalışmada, maraviroc, viral yük üzerinde önemli bir azalma sağlamamıştır.
- Buna karşın maraviroc, bu hastalarda CD4+ hücre sayısında artışa neden olmuş ve hastalığın progresyonu üzerine herhangi bir ters etki yapmamıştır.

Goodrich JM, et al. www.natap.org/2007/IDSA/IDSA_06.htm

Farmakokinetik özellikler

- Absorpsiyon süresi (Tmax) → 1-4 saat
- Eliminasyon yarı ömrü→ 10.6±2.7 saat
- Biyoyararlanım → 100 mg için %23, 300 mg için %33
- 10 günlük monoterapide viral yükteki azalma → ortalama 1.42 log10
- Atılım → ~%75'i feçes, ~%20'si idrar ile; ~ %30'u değişmeden, geri kalanı inaktif metabolitler olarak
- Hafif/orta düzey böbrek veya karaciğer bozukluğu olanlar için doz ayarlaması gerekli değil
- Beslenme durumuna (aç-tok) bağımsız etki
- CYP3A ve p-glikoproteini için substrat olduğundan bunların inhibitörleri (örn.ketokonazol, lopinavir+ritonavir, ritonavir, saquinavir) ya da indükleyicileri (rifampin, efavirenz) tarafından farmakokinetiği değişir.

Yan etkiler ve güvenilirlik

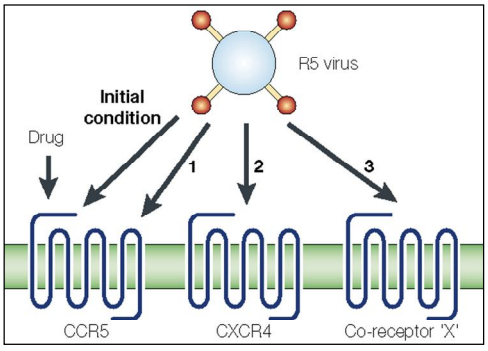
- Klinik çalışmalarda maraviroc genellikle iyi tolere edilmiştir.
- En sık saptanan yan etkiler;
  - Üst solunum yolu enf
  - Ateş
  - Öksürük
  - Deri döküntüsü
  - Kas-iskelet yakınmaları
  - GİS yakınmaları ve karın ağrısı
  - Baş dönmesi
  - İştahsızlık
  - Uykusuzluk
- Maraviroc verilen gruplarda saptanan yan etkiler ve ilacın güvenilirliği (karaciğer toksisitesi, malignansi gelişimi, oportunistik enfeksiyon sıklığı, AIDS'e progresyon) plasebo ile benzer bulunmuştur.

Endikasyon

- Daha önce optimize ARV tedavi alan ancak yanıtsız ve/veya çok ilaca dirençli, R5-tropik HIV-1 ile enfekte adölesan/yetişkin hastalarda en az 2 aktif antiviral ilaçla kombine olarak kullanılmalıdır.
- Tedavi almamış naif yetişkinlerde ve pediatrik hastalardaki etkinliği ve güvenilirliği açık değildir.

Direnç mekanizmaları

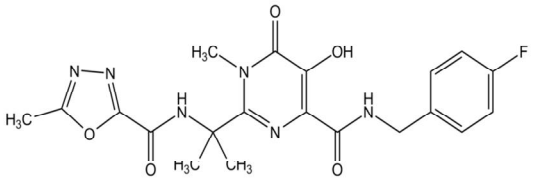
1. CCR5 ko-reseptörünün ilaçtan etkilenmeyen başka bir bölgesine bağlanmayı sağlayan mutasyonlar
2. CXCR4 ko-reseptörünün kullanımını sağlayan mutasyonlar (tropizm değişikliği)
3. Bilinmeyen/özgül olmayan başka bir ko-reseptörün kullanımını sağlayan mutasyonlar



•Maraviroc direnci gösteren klinik HIV suşlarının gp120 V3 kangalında aa değişiklikleri (en sık 13. ve 26. pozisyonlarda) saptanmıştır

Moore JP, Stevenson M, Nature Rev Mol Cell Biol, Oct 2000; 1: 40
Mori J, et al.www.natap.org/2007/ResisWksp/ResisWksp_52.htm

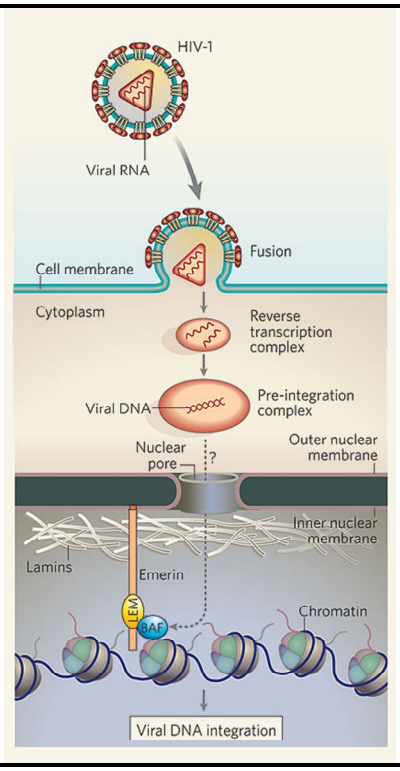
Raltegravir



- Ticari adı → Isentress
- Ürün kodu → MK-0518
- Üretici firma→ Merck
- FDA onayı → Ekim 2007
- Yapı → Pirimidin karboksamid
- Etki → HIV integraz inhibisyonu
- Preparat → Oral tablet (400 mg)

HIV integrasyonu-1

- Virusun hücreye girişinden sonra HIV-1 RNA'sı revers transkriptaz (RT) enzimi tarafından çiDNA'ya (complementary DNA; cDNA) çevrilir.
- İntegraz (IN) enzimi, sitozolde cDNA'nın LTR bölgelerine bağlanarak 3' uçlarından GT dinükleotidini keser ("3'-processing" olayı)
- cDNA'ya bağlı olarak kalan IN, çeşitli viral ve hücresel proteinlerle birlikte büyük ve stabil "pre-integration" kompleksini (PIC) oluşturur.
- PIC, aktif olarak -henüz tam olarak bilinmeyen bir mekanizma ile- nukleusa taşınır.
- Viral DNA'nın konak DNA'sına integrasyonu, emerin ve BAF proteinlerinin yardımıyla olur.

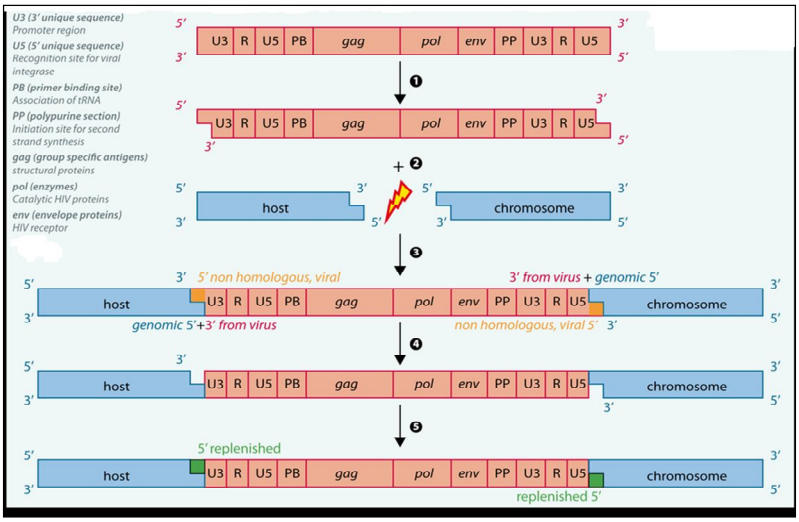


- Lamin proteinleri: Nüklear membranın altındaki tabakayı oluşturan ve nükleusa yapısal destek veren proteinler
- Emerin: İç nüklear membran (lamin) proteini
- LEM: Lamin proteinlerinin ortak yapısal kangalı
- BAF ("Barrier-to-Auto-integration Factor") : Kromatinin LEM proteinleri ile ilişkide olmasını sağlayan "non-specific DNA-binding" protein.

Li M, Craigie R. *Nature,* June 2006; 441: 581.

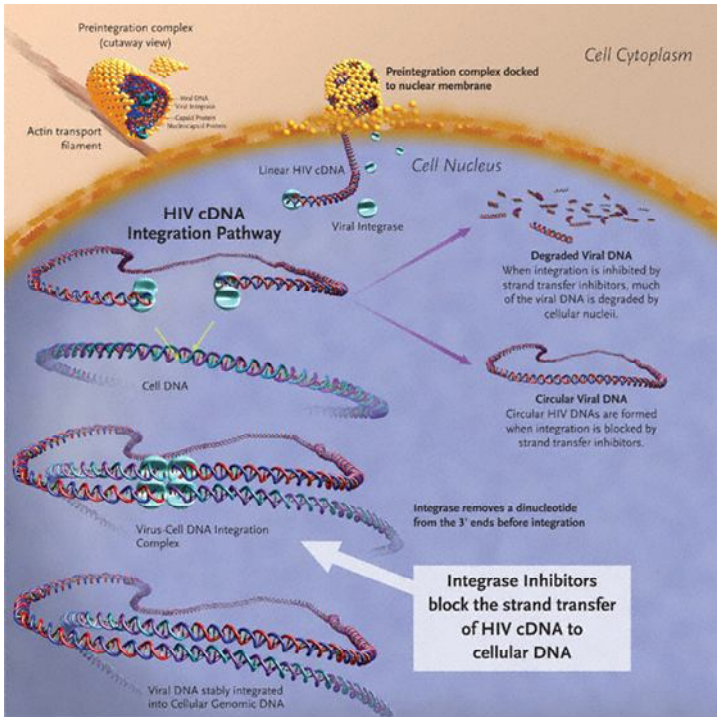
HIV integrasyonu-2

- Viral cDNA, kesik olan 3'hidroksil ucuyla geri dönüşümsüz ve kovalent olarak hücre DNA'sının 5'ucuna girer ("iplik transferi" olayı)
- HIV DNA'sının konak kromozomunda integre olduğu belirli hedef bölgeleri ("hot spots") olduğunun bilinmesine rağmen, bu bölgeleri tercih etmesini etkileyen faktörler ve mekanizma tam olarak bilinmemektedir.
- İntegre olan viral DNA (provirus) yeni virion sentezi için kalıp olarak kullanılır.
- IN inhibisyonu olduğunda, viral cDNA hücre enzimleri tarafından çembersel şekle çevrilir ve 2- LTR çemberleri çekirdekte birikir.
- IN inhibisyonu, HIV DNA'sının integrasyonunu bloke ederek gerek virusun konaktaki latentliğini gerekse HIV replikasyonunu önler.



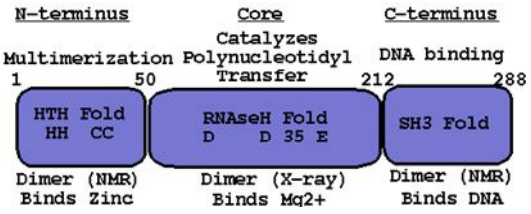
1-İntegraz cDNA'nın 3' uçlarından ikişer nükleotidi keser.
2-İntegraz aynı işlemi hücre kromozomununun belirli bir bölgesinde de yapar.
3-Viral DNA'nın 3'uçları ve hücre DNA'sının karşılık gelen 5' uçlarındaki terminal nükleotidler arasında fosfodiester bağlarının oluşumuyla DNA molekülleri birbirine bağlanır.
4-Viral DNA'nın homolog olmayan 5' uçları IN tarafından kesilerek uzaklaştırılır.
5-Kesilen kısımlardaki boşluklar hücresel tamir enzimleri tarafından doldurulur.

Mudrow S, et al. *Molecular Virology*, 2003.



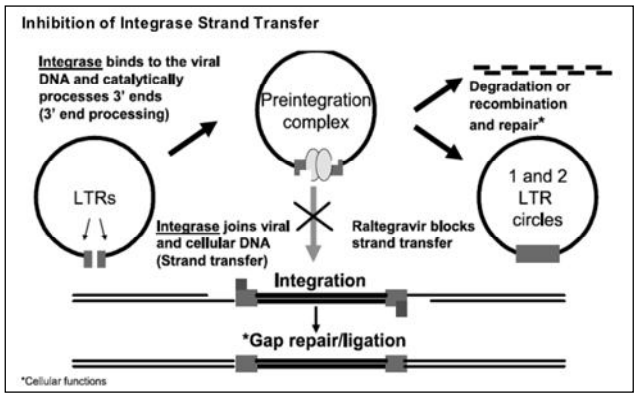
HIV integraz enzimi

- 32 KDa, 288 aa
- N-terminal bölgesi → Histidin ve sistein (HH-CC) içeren ve Zn bağlayan kısım. “3’-processing” ve “ iplik-transferi”nden sorumludur.
- Katalitik kor bölgesi → Asidik aa. triadı (D-D-E motifi) içeren ve Mg2 bağlayan kısım. DNA’nın kesimi ve fosfodiester bağlarının oluşumu ile integrasyonu sağlar.
- C-terminal bölgesi → En az korunmuş ve DNA’ya non-spesifik olarak bağlanan kısım. “3’-processing” ve “iplik-transferi”nden sorumludur.



Etki mekanizması

- Raltegravir, IN enziminin katalitik kor bağlanarak aktif bölgedeki divalan metal iyonlarını koparır (Mg2+ şelasyonu)
- IN aktivitesinin inhibisyonu, “iplik transferi”nin blokajı ile sonuçlanır.



Tedavi almış hastalarda Raltegravir

- BENCHMRK 1 & 2 → Çok merkezli, randomize, üçlü-kör
  - "Blocking integrase in treatment-Experienced patients with a Novel Compound against HIV-1: MeRcK"
- NNRTI, NRTI ve PI sınıflarından ≥1 ajana dirençli virusla enfekte 699 hasta
- Başlangıç CD4 sayısı → ort. 150/mm^3
- Başlangıç viral yükü → 4.5-4.7 log10 kopya/ml
- 24 hafta sonunda
  - Viral yükün <50 kopya/mL'e düştüğü hasta oranı (P<0.0001)
    - OBT+Raltegravir grubu → %65
    - OBT+Placebo grubu → %35
  - CD4+ hücre sayısı
    - OBT+Raltegravir grubu → 84/µL
    - OBT+Placebo grubu → 37/µL

Margolis D, www.natap.org/2007/CROI/croi_53.htm

Tedavi naif hastalarda Raltegravir

- Çok merkezli, randomize, çift-kör çalışma
- Daha önce tedavi almamış, başlangıç viral yükü ≥5.000 kopya/mL ve CD4+ hücre sayısı ≥100/µL olan 198 hasta
- Tenofovir + lamivudine + raltegravir ile tenofovir + lamivudine + efavirenz tedavileri karşılaştırılmıştır.
- 48 hafta sonunda viral yük <50 kopya/mL olan hasta oranı (istatistiksel olarak anlamlı değil)
  - Raltegravir grubunda %88
  - Efavirenz grubunda %87

Wohl DA, www.thebodypro.com/content/art45308.html

Farmakokinetik özellikler

- Absorpsiyon süresi (Tmax)→ 4 saat
- Eliminasyon yarı ömrü→ 9 saat
- 10 günlük monoterapide viral yükteki azalma → ortalama >2-log10
- Serum proteinlerine bağlanma → %83
- Atılım → ~%51'i feçes, ~%32'si idrarla; %7-14'ü böbreklerden değişmeden atılır
- Metabolizma → Glukuronidasyon ile
- Beslenme durumuna (aç-tok) bağımsız etki
- Oda ısısında saklanabilir
- Orta/hafif düzeyde böbrek veya karaciğer bozukluğu olanlar için doz ayarlaması gerekli değil
- Üridin difosfat glukuronosiltransferaz (UGT) indükleyicileri (örn.rifampin) plazma konsantrasyonunu azaltır.

Yan etkiler ve güvenilirlik

- Klinik çalışmalarda raltegravir iyi tolere edilmiş, ciddi yan etki saptanmamıştır.
- En sık saptanan yan etkiler;
  - Diyare
  - Bulantı
  - Halsizlik
  - Baş ağrısı
  - Kaşıntı
  - GİS yakınmaları
  - Terleme
- Raltegravir verilen gruplarda saptanan yan etkiler ve ilacın güvenilirliği plasebo ile benzer bulunmuştur.

Endikasyon

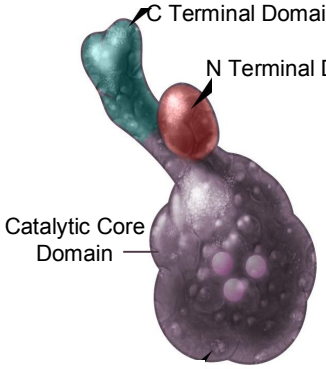
- Daha önce tedavi almış ancak viral replikasyonun devam ettiği ve çoklu ilaç direnci saptanan HIV-1 enfeksiyonlarının tedavisinde diğer antiretroviral ajanlarla birlikte kombine olarak kullanılır.
- Diğer aktif antiretroviral ajanlarla sinerjistik etki göstermektedir.
- Tedavi almamış naif yetişkinlerde ve pediatrik hastalardaki etkinliği ve güvenilirliği açık değildir.

Direnç mekanizmaları

- IN enziminin katalitik kor bölgesindeki mutasyonlar (≥2) ile gelişir.
- En sık saptanan mutasyonlar
  - Q148H/R/K (~%40)
  - N155H (~%30)
  - Y143C/R
  - G140S
- Dirençli stabil mutantlar, primer Q148 veya N155 mutasyonlarına sekonder mutasyonların eşlik etmesiyle ortaya çıkar.

Miller MD, et al. www.natap.org/2008/ResisWksp/ResisWksp_37.htm

HIV Integrase



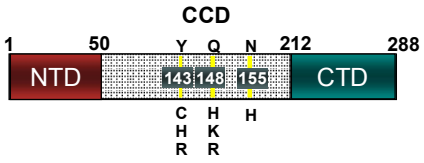


Integrase Amino acids

Resistance to Raltegravir

- Resistance Pathways
  - Q148**R/H/K** + Subsequent Mutations
  - N155**H** + Subsequent Mutations
- Y143**CHR** identified as possible pathway
- Q148**R/H/K** plus G140**S** depend on **R/H/K**
- N155**H** plus E92**Q** increases resistance

Genotype: Mutations



DHS/P

Kaynaklar

- Cocohoba J, Dong BJ. Raltegravir: the first HIV integrase inhibitor. Clin Ther. 2008; 30: 1747.
- Flexner C. HIV drug development: the next 25 years. *Nature Reviews Drug Discovery* 2007; 6: 959.
- Jegede O, Babu J, Di Santo R, et al. HIV type 1 integrase inhibitors: from basic research to clinical implications. AIDS Rev. 2008;10:172.
- Kuritzkes DR. HIV-1 entry inhibitors: an overview. Curr Opin HIV AIDS. 2009;4:82.
- Lieberman-Blum SS, et al. Maraviroc: a CCR5-receptor antagonist for the treatment of HIV-1 infection.Clin Ther. 2008 Jul; 30:1228.
- MacArthur RD, Novak RM. Maraviroc: The First of a New Class of Antiretroviral Agents. Clin Infect Dis 2008; 47:236–41.
- http://www.natap.org/
- http://www.thebody.com/content/art40487.html

GÜNCEL VE YENİDEN GÜNCELLEŞEN VİRUSLAR

PROF. DR. YUSUF ÖZBAL

24 HAZİRAN 2009, 09:00-09:40



YENİ VİRAL HASTALIKLARIN ORTAYA ÇIKIŞI

Yeni veya önceden tanımlanamayan viral hastalıklar daima görülecektir

Yeni viral hastalıkların nerede ve ne zaman ortaya çıkacağını önceden bilmek zordur

YENİ VİRAL HASTALIKLARIN ORTAYA ÇIKIŞI

- Yeni bir virüsün etkinliği:
  - Genelde ilk çıktığı yerde sonlanmakta veya
  - Aralıklı olarak salgınlar yapmakta veya
  - Coğrafi bir bölgede sınırlı kalmaktadır
- Son yıllarda viral salgınların artması, yaşam alanların değişimi yanında etken olan patojenik yeni virüslerin tanımlanmasının kolay yapılmasındandır
- Gelişen yeni tanısal teknolojiye parelel olarak yeni viral hastalıklarda global bir artış olacaktır

1973'den beri yeni tanımlanan patojenik virüsler ve hastalıkları

Yıl	Virüs	Hastalık
1973	Rotavirus	Yaygın infantil diyarenin major etkeni
1975	Parvovirus B19	Aplastik kronik hemolitik anemi
1977	Ebola virus	Ebola hemorajik ateş
1977	Hantaanvirus	Renal sendromlu hemorajik ateş
1980	Human T-lymphotropic virus-I	T-hücre lenfoma-lösemi
1982	HTLV-II	Tüylü hücre lösemisi
1983	Human immunodeficiency virus (HIV)	AIDS

1973'den beri yeni tanımlanan patojenik virüsler ve hastalıkları

Yıl	Virüs	Hastalık
1988	Human herpesvirus-6 (HHV-6)	Roseola subitum
1988	Hepatitis E	Enterik bulaşan non-A, non-B hepatit
1989	Hepatitis C	Pareneral bulaşan non-A, non-B, karaciğer infeksiyonu
1991	Guanarito virus	Venezuella hemorajik ateşi
1993	Sin nombre virus	Tehlikeli solunum sendromu
1994	Sabia virus	Brezilya hemorajik ateşi
1995	HHV-8	AIDS'li hastalarda Kaposi sarkom etkeni

Son 20 yıl içinde tekrar güncelleşen viral hastalıklar

Hastalık	Tekrar güncelleşmesinde rol oynayan faktörler
Kuduz	Halk sağlığı önlemlerinde yetersizlik, kullanılan arazide değişiklik, seyahat
Dengue/Dengue hemorajik ateş	Transport, seyahat ve göç, kentleşme
Sarı ateş	İlaç ve insektisitlere direnç, bireysel mücadele ve ekonomik kaynak gereksinimi

Yeni virüslerin ilk tanınması

- PCR ve duyarlı/özgül diğer tanı yöntemlerin geliştirilmesi ile virüslerin belirlenmesinde büyük artış gözlenmektedir
- Postmortem dokulardan revers transkripsiyon ve PCR ile birçok yeni virüs belirlendi ve isimlendirildi
  - **Bayou virüs** (Sin Nombre virus'a uzaktan ilgili bir hantavirus) moleküler biyolojik metotlarla yeni belirlenen bir virüstür
  - Asla kültürü yapılamayan ve uzun yıllar patojenik önemi anlaşılamayan **HPV**'nin 100'den fazla tipi genomik nükleotit sekans analiziyle belirlendi

Yeni virüslerin ilk tanınması

- **HCV**, moleküler yöntemlerin uygulamaya girmesiyle bulundu
- NANB hepatitlerin etkenini belirlemek için **CDC** ile **Chiron**'un 1989'da birlikte yürüttüğü araştırma sonucunda bulunan yeni hepatit virüsü HCV, deneysel olarak faktör VIII ile birlikte infekte edilen bir şempanzenin kanından klonlandı
- Şempanze kanından ekstrakte edilen RNA'dan cDNA yapmak için rastgele primerler kullanılarak revers trankribsiyon yapıldı

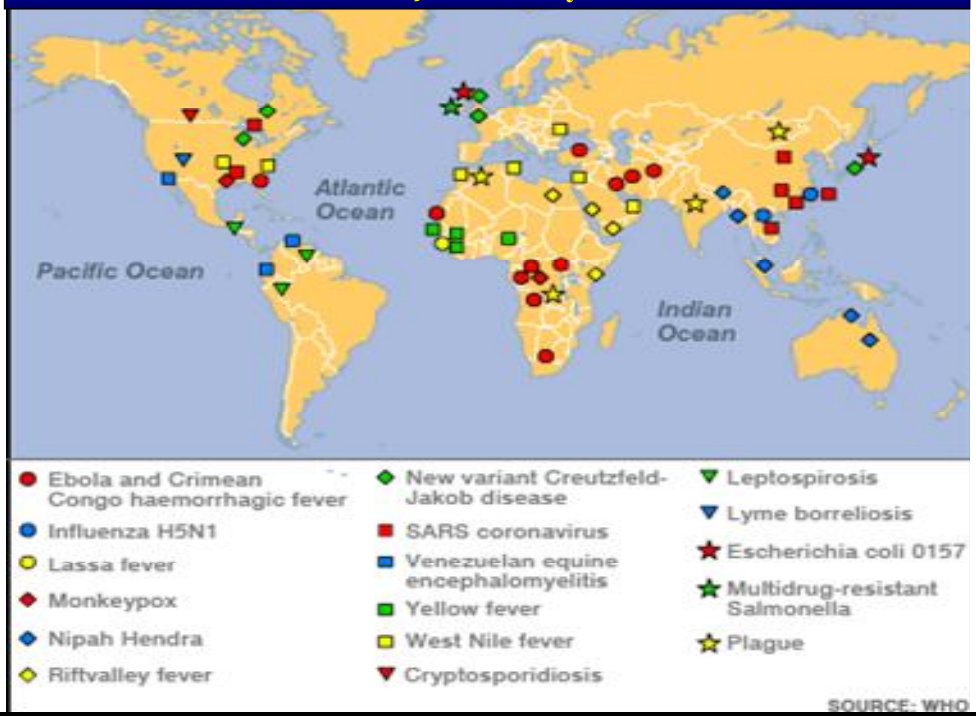
Yeni virüslerin ilk tanınması

- DNA, **bakteriyofaj gt 11'e** klonlandı
- Bakteriyofaj içeren bakteri kolonileri, NANB'li hasta serumları ile tarandı
- Taranan binlerce kolondan birinde infekte hastaların kanında antikor bulunduğu belirlendi
- Pozitif klondan elde edilen DNA, diğer klonların taranmasında kullanıldı
- **Bugün HCV'nin genotiplerini tanıyabiliyoruz**

Yeni virüslerin ilk tanınması

- HCV'nin bulunuşundan sonra benzer karakterli ***Flaviviridae*** ailesi üyeleri (GB virus A, GB virus B, GB virus C/HGV) aynı yöntemle belirlendi
- Güncel veya yeni virüslerin belirlenmesinde klasik teknikler (histopatolojik karakterin belirlenmesinde doku kültürü veya deney hayvanı kullanımı, elektron mikroskopi, immünofloresan) yerini korumaktadır
- Çin'de (Guangdong) 2002'de görülen ve Hong Kong yoluyla yayılan **SARS**'ın etkeni olan **SARS-CoV**, klasik yöntemlerle belirlenmiştir

Güncel ve Tekrar Güncelleşen İnfeksiyon Hastalıkları 1996-2004



YENİ VİRAL HASTALIKLARIN ÇIKMASINI SAĞLAYAN FAKTÖRLER

Virolojik faktörler
Bireysel konak faktörleri
Konak popülasyon faktörleri (Bireysel, toplumsal)
Çevresel faktörler (Ekolojik, zoonotik)
Zarar vermek için virüs kullanılımı (Biyoterörizm)

VİRÜS: DEĞİŞİM VE YENİ VİRAL FENOTİPLERİN ORTAYA ÇIKMASI

- Varyasyon
- Poligenik varyasyon
- Mutasyon
- Rekombinasyon
- Genlerin yeniden yapılanması
- Oluşan yeni virüslerin epidemiyolojik potansiyeli

Varyasyon

- Patojen ile konak defansı arasında birbirlerine karşı koyabilmesi için benzer mekanizmalar gelişmektedir
- Bu mekanizmalardan biri varyasyondur
- Varyasyon, infeksiyöz etkenin konağın immün yanıtından kaçış mekanizmasıdır
- Varyasyonla yeni patojen virüsler oluşmaktadır
- Örneğin, ilk kez fare dışkısından izole edilen 2 segmentli dsRNA (2.6 ve 1.5 kb) içeren picobirnavirus varyantları kısa bir süre sonra insanlardan izole edilmiştir

Varyasyon

- Günümüzde 3.600 virüs türü taksonomik olarak tanımlanmıştır
- Uluslararası Referans Merkezi ve Kültür kolleksiyonları 30.000'den fazla viral suş saklamakta ve varyasyonla bu sayı gittikçe artmaktadır

Poligenik Varyasyon

- Virüslerin evriminde çeşitli genetik mekanizmalar (mutasyon, rekombinasyon, genlerin yeniden yapılanması) rol alır
- Bu mekanizmaların arasında en önemlisi poligenik ve natürel seleksiyona bağlı köken değişimidir
- Bu tür varyasyona en iyi örnek Çiçek virüsüdür. Variola major (Hindistan ve Avrupa'da, mortalite %30) ve variola minör (Güney Amerika'da mortalite %1) yıllarca önce oluşan varyanttır
- Diğer bir örnek, attenüe poliyovirüs varyantları (Sabin-attenüe canlı aşı virüsü) aktive olduğunda, moleküler genetik persfektifinde fenotipik farklılıklar görülmektedir

Mutasyon

- Virüslerin replikasyonu sırasında, genomunda bulunan nükleik asitlerin yanlış kopyalanmasıyla mutasyon olur
- Mutasyonlarda yeni fenotipik karakter kazanır
  - Yeni konak veya yeni hücre tipinde daha hızlı veya daha yüksek titrede veya
  - Konağın savunma mekanizmasından daha kolay kurtularak replike olur
  - Ve yeni bir viral hastalığın ortaya çıkmasını sağlar

Mutasyon

- HBV'de, pregenomik RNA'dan revers transkripsiyon yoluyla DNA'ya dönüşüm sırasında genomik mutasyon olabilmekte ve 4 yolla gerçekleşmektedir:

1. Nokta mutasyonu ile taban bazının değişmesi
2. Nükleotidlerin tekli veya çoklu delesyonu
3. Nükleotid sıralanmasının tersine tekrarı
4. Nükleotid sıralanışının yeniden düzenlenmesi

Mutasyon

- Persistan ve kronik infeksiyona meyil yaratır
- Hastalığın klinik karakterini değiştirerek şiddetlendirir
- Tedaviyi engeller
- Serolojik göstergelerde karışıklık yaratır
- Orijinal virüs için koruyucu olan aşıyı etksiz kılar
- Orijinal virüse karşı oluşan özgül antikora cevapsızlık yaratır

Mutasyon

- Genetik mutasyonel değişimde bir/birkaç nükleotitde değişim olduğundan fenotipik değişim minimal düzeyde veya rekombinasyonda olduğu gibi viral genomlara yeni genler eklenerek daha kompleks olabilir
- Mutasyonlarda, etkin viral antijenik determinantlar oluşur ve antikor bulunduğu halde virüs replikasyonuna devam edebilir
- RNA virüslerinde yüksek sıklıkta mutasyon görülmekte ve RNA virüsleri epidemik veya pandemik hastalıkların ortaya çıkmasında devamlı ve büyük risk taşımaktadır

Mutasyon

- HIV tek bir hücre içinde binlerce replike olduğundan
- genetik mutasyon sıklıkla olmaktadır
- Revers transkriptaz, ortalama her 2.000 nükleotitten birinde mutasyon yapabilmektedir (her bir replikasyon döngüsünde 5 mutasyon)
- Birçok mutant HIV virionları aynı anda tek bir infekte kişide bulunabilir
- Genetik mutantlar yeni serotipler oluşturabilir **(HIV-3 ?)**
- Mutant bir HIV için geliştirilecek aşı, diğerlerine karşı korumayacaktır

Rekombinasyon

- Genetik rekombinasyon, bir hücrenin miks infeksiyonu sırasında iki veya daha fazla viral genom arasındaki etkileşimle parental genotiplerden alınan özellikleri taşıyan yeni bir genom oluşmasıdır
- Rekombinasyon hem DNA hemde RNA virüslerinde görülür
- Herpesvirüslerle ***in vivo*** yapılan deneysel çalışmalarda, birden fazla herpesvirüsle infekte hayvanlarda, insanlarda görülen herpesvirüs hasalık belirtileri izlenmemiştir

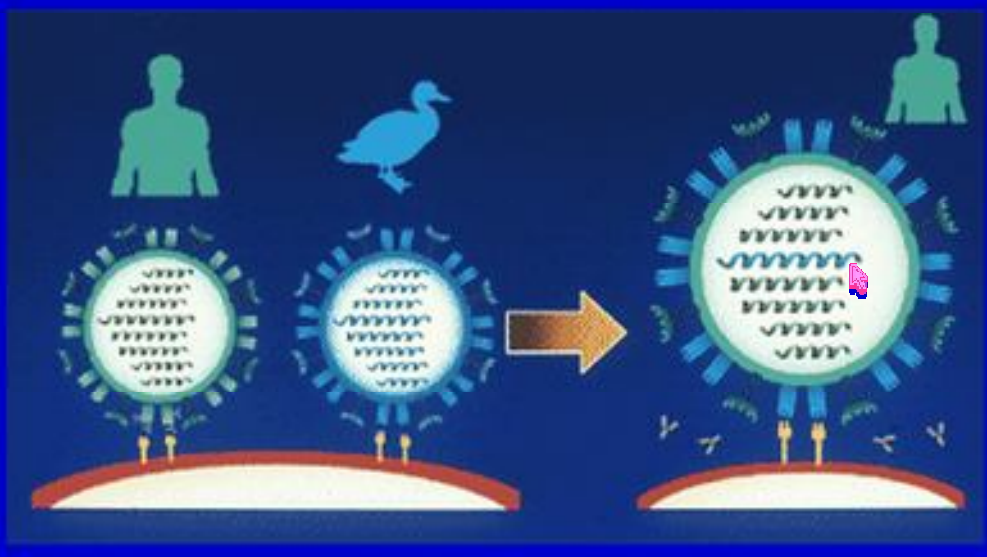
Rekombinasyon

- Batı at ensefalit virüsü farklı bir rekombinanttır
- İki glikoprotein geni Sinbis-like virüs progenitor'ünden ve diğer genleri batı at ensefalit virüsü'nden alınmıştır
- Bu değişiklik 1000 seneden daha önce konak sivrisinekte persistan infeskiyonu sırasında oluşmuştur
- Rekombinasyon, poliyovirüs serotipleri arasında da olmaktadır. Sabin aşısıyla aşılandıktan sonra rekombinant virüsler dışkıyla yayılmaktadır

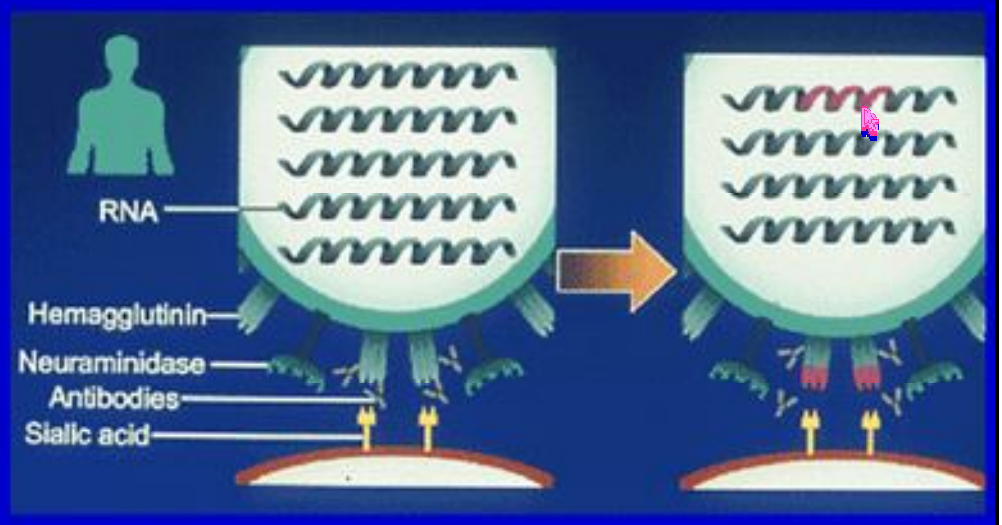
Genlerin yeniden yapılanması

- Segmentli genom içeren, filogenetik olarak birbirine yakın virüslerde, genetik rekombinasyon sırasında bir genom segmentinin tamamının birleşmesi olayıdır
- Farklı Influeanza A virüslerinin genom segmentleri yeniden yapılanabilir (A ile B arasında yeniden yapılanma olmaz)
- Hemaglutinin veya nöraminidaz genlerinin yenisiyle değişerek "antijenik shift" olmaktadır

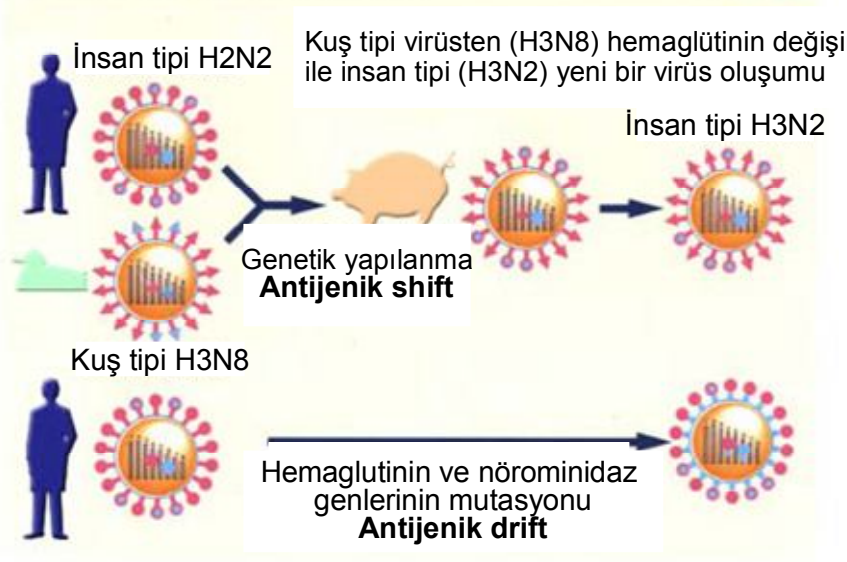
Antijenik Shift



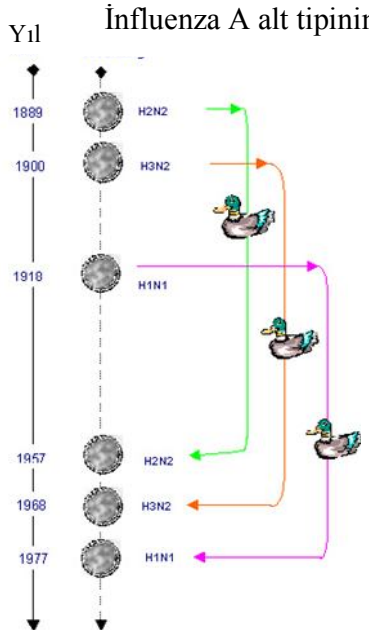
Antijenik Drift



İnfluenza A virüslerinde antijenik değişim



İnfluenza A alt tipinin sirkülasyonu



Antijenik shift hareketi

- Hemaglutinin antijenik şifti pandemilere,
- Hemaglutinin ve Nöraminidazda antijenik driftler epidemilere neden olur

Genlerin yeniden yapılanması

Bu yüzyılın insan influenza pandemileri (1916, 1957, 1968) insanlara adapte olmuş bir insan Influeanza A virüsü ile bir kanatlı Influeanza A virüsü arasında genom segmentlerinin yeniden yapılanmasıyla olmuştur

Yeni virüslerin epidemik potansiyeli

Yeni ortaya çıkan virüslerin epidemik potansiyeli;

- Bulaşma şekline,
- Konak popülasyonun immünolojik ve genetik duyarlılığına,
- Risk altındaki popülasyonun sayısına ve
- Diğer epidemiyolojik ve patojenik faktörlere bağlıdır

Yeni virüslerin epidemik potansiyeli

- Epidemyolojik potansiyel, etkenin konaktan konağa kolayca bulaştığı (özellikle solunum yoluyla) sürece artar
- Zoonotik ve eklembacaklılarla bulaşan etkenler genellikle coğrafi bir bölgede sınırlı kalır, bazen sınırlı kalmayarak daha sonra büyük epidemilere neden olur

BİREYSEL KONAK:
YENİ VİRAL HASTALIKLARIN ÇIKMASINDA DUYARLILIK/DİRENÇ FAKTÖRLERİ

- Konağın immün yanıtı
- Konağın yaşı
- Persistan infeksiyon
- Viral virülans değişimi ve konak direnci
- Tür atlama-tür bariyerini geçme
  (HIV-1/HIV-2, Hendra virus, Nipah virus)
- İnsan popülasyonunda yayılma

Konağın immün yanıtı

- Virüs-konak arasındaki mücadele, virüsün bulaşmasıyla başlar, etkenin canlı kalması ve konağın etkene karşı karışık savunma mekanizmasıyla devam eder
  - Doğal direnç
  - Kazanılan immünite
  - Direnci etkileyen fizyolojik faktörler
    - Yaş (Konağın yaşı viral patogenezi etkiler)
    - Beslenme
    - Ateş
    - Hormonal denge (hamilelik)

Persistan infeksiyon

- Bazı infeksiyöz etkenlerin, konağın çeşitli savunma mekanizmalarından korunmak için değişik stratejiler geliştirerek etkin bir immüniteye rağmen, konakta süregen kalabilmekte ve konakta yaşayarak neslini sürdürebilmektedir
- Kısa inkübasyon süreli akut infeksiyon yapan bir etken ortaya çıktığı zaman güncelliği dramatik olabilir
- Uzun inkübasyon süreli bir etken ortaya çıktığı zaman yıllar sonra pik yapabilir

Persistan infeksiyon

Kolaylaştıran faktörler:

- İnfeksiyöz etkenin antijenini değiştirmesi
- İnfeksiyöz etkenin latent faza geçişi
- İnfeksiyöz etkenin konak immün mekanizmalarına direnç geliştirmesi
- Konağın immün cevabının baskılanması

Persistan infeksiyon

- **HIV, EBV, HBV** gibi bazı virüsler, infeksiyonları sırasında konak immün sisteminden kaçarak latent faza geçebilir ve bu fazda hastalığa yol açmamakla birlikte elimine de edilemezler
- Latent virüs reaktive olarak tekrarlayan infeksiyonlar gelişebilir

HIV-1'in persistan infeksiyonu

- HIV-1, gp120 üzerinde bulunan V3 kangalını değiştirerek konakta hızla mutant suşlar oluşturur
- HIV-1'e özgül nötralizan antikor V3 kangala karşı çıksada mutant virüs nötralizan antikorlardan kurtulur
- HIV-1'in CD_4^+TH lenfositlerde latent infeksiyonu sırasında çok az viral protein sentezlediğinden konakta koruyucu immünite sağlanamaz
- HIV-1, konakta immün yanıtı bozarak immünosüpresyon ve persistan eğilim sağlar

HIV-1'in persistan infeksiyonu

Regülatör Nef proteini;

- HIV-1 ile infekte hücrelerin effektör sitotoksik CD_8^+T lenfosit ve NK hücreler tarafından öldürülmesinden korur
- HIV-1 immünopatogenezinde stimülatör rol oynar
- Yeni HIV-1 yapımına yardım eder ve yıllarca kalabilir
- Vireminin yüksek düzeye ulaşmasını ve AIDS'in gelişmesini sağlar

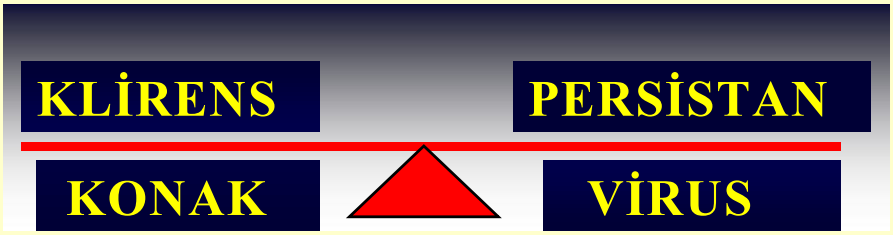
EBV'nin persistan infeksiyonu

- EBV; CD_{19}-CR_2 reseptör kompleksine bağlanarak B lenfositleri tutan ve litik, latent, persistan infeksiyonlara neden olan virüstür
- Virüse ait **EBNA-1** proteinin ***oriP*** denilen viral promoter'e bağlanmasıyla, virüs B lenfsoitlerde latent faza geçer
- İmmün yanıt çıkmasına rağmen, virüs konaktan elimine edilemez
- Latent fazda görülen **LMP-1**, immortalize B lenfositlerin oluşmasını ve onkogenezi sağlar
- Viral DNA, konak DNA'sına integre olarak süregen kalır

HBV'nin persistan infeksiyonu

- Latent HBV infeksiyonunda virüs replike olmadan, serolojik ve histolojik bulgular negatif olarak HBsAg pozitifliği devam eder
- Uzun infeksiyon periyodu sırasında HBV-DNA'nın hepatosit genomuna integresyonuyla HBsAg kaybolur
- HBV-DNA içeren hepatositler ve defektli HBeAg immün eliminasyondan kolaylıkla kaçmaktadır
- Bu nedenle, latent HBV infeksiyonu sırasında HCC'ye yakalanma riski vardır

VİRÜSLERİN KONAKTA PERSİSTAN İNFEKSİYON YAPMA EĞİLİMİ VE VİRAL KLİRENS



Viral infeksiyonlarda genellikle virüsün konakta persistan infeksiyon yapma eğilimi ile viral klirens arasında bir denge vardır

Viral virülans değişimi ve konak direnci

- Konak direncine bağlı olarak virülans değişimine en iyi örnek tavşan-myxoma virüsüdür
- Güney Amerika ve Kaliforniya tavşanlarında görülen selim bir deri tümörü etkeni olan myxoma virüsü, mekanik olarak insektlerin ısırmasıyla bulaşır
- Myxoma virüsü, Avrupa tavşanlarında letal infeksiyon etkenidir
- Avustralya'da hızla çoğalan ve çiftçilere zarar veren yabani tavşanların biyolojik kontrolü için kullanılmıştır 1950'de myxoma virüsü verilen tavşan popülasyonunda fatalite oranı %99 olmuştur

Tür atlama-Tür bariyerini geçme

- Hayvan virüsleri mutasyonla tür bariyerini atlama yeteneği kazanmakta, bazen insanlara da aracısız geçmekte ve insan ölümle sonlanan bir konak olmaktadır
- En iyi örnek HIV-1/HIV-2 dir, filogenetik olarak simian orijinlidir
- Simian rezervuarından 1931'lerde HIV-1, 1940'larda HIV-2 a insanlara geçmiştir
- Bu virüsler insan olmayan primatlarda hastalıksız replike olmaktadır

Tür atlama-Tür bariyerini geçme

- Hendra ve Nipah virüsleri de tür atlayan virüslerdir
- 1994'de hasta olan atıyla ilgilendikten sonra ARDS (acute respiratory distress syndrome) gelişen Avusturalya'lı (Hendra, Queensland) at bakıcısında bilinmeyen bir virüs izole edilmiştir
- İnfekte 21 atın 12'si ve bakıcısı ölmüştür
- Virüs, atın akciğer ve insanın böbrek dokusundan alınan biyopsi örneklerinden "equine morbillivirus" izole edilerek "Hendra virus" adı verilmiştir (Genomu 19 kb)
- Bu virüs, ***Parmyxovirdae*** ailesi üyesi olup ARDS etkenidir, zoonotiktir ve rezervuarı yarasadır (uçan tilki)

Tür atlama-Tür bariyerini geçme

- 1999'da Malezya'da domuzlarda çıkan solunum yolu hastalığı salgınında, domuzlarla yakın teması olan insanlarda şiddetli nörolojik hastalık görülmüş ve 100 kadar insan ölmüştür
- Fatal insan olguların beyin dokusundan izole edilen virüse, bir hastanın yaşadığı "Nipah River Village" köyün adı verilmiştir
- **Hendra** ve Nipah aynı genusa ait iki virüs olup "***Henipavirus***" genusu olarak isimlendirilmiştir
- Bu virüsler, tür atlayarak insanları infekte etmekte ve insanların ölümüyle sonlanan infeksiyon yapmaktadır

İnsan popülasyonunda yayılma

- Arbovirüsler; alfavirüsler (doğu at ensefalit virüsü, batı at ensefalit virüsü vb), bunyavirüslerden La cross virus, Rift vadisi ateşi virüsü eklembacaklılarla,
- Bunyavirüslerden diğer zoonotikler (Hantaan virus, Seul virus, Puuala virus, Sin Nombre virus) ve arenavirüsler (Machupo virus, Junin virus ve Lassa virus) hayvan rezervuarlardan (kemiriciler) direk yolla bulaşır
- Bu virüslerin her biri geçmişte yeni insan hastalığının ortaya çıkmasında sorumlu olmuştur

POPÜLASYON KONAK: YENİ VİRAL HASTALIKLARIN ÇIKMASINI SAĞLAYAN BİREYSEL FAKTÖRLER

- Seksüel yolla bulaşan viral hastalıklar (Genital herpes, HIV/AIDS, HPV)
- Bakım evi ve okullarda bulaşan viral hastalıklar (rotavirüs inf.)
- Toplumdaki çocukluk çağı hastalıkların bulaşması (kızamık, suçiçeği vb)

POPÜLASYON KONAK:
YENİ VİRAL HASTALIKLARIN ÇIKMASINI SAĞLAYAN BİREYSEL FAKTÖRLER

- Yiyeceklerden bulaşan infeksiyonlar
- Süs hayvanından bulaşan infeksiyonlar (maymun çiçeği)
- Biyoterörizm: Çiçek virüsü, Filovirüsler (Ebola virus, Marburg virus), arenavirüsler (Lassa fever, Machupo virus), Venezuella at ensafilit virüsü, doğu ve batı at ensefalit virüsleri, şap hastalığı virüsü

POPÜLASYON KONAK:
YENİ VİRAL HASTALIKLARIN ÇIKMASINI SAĞLAYAN BİREYSEL FAKTÖRLER

- Endüstriyel ticari veya çiftlik kaynaklı üretilen yiyeceklerin toptancı ve parakendicelere ulaştırılması sırasında bulaş (HAV, Nipah, Hendra)
- Toplumsal gelenekler,yiyecek/şebeke sularıyla bulaş
- Biyolojik ve farmakolojik preparatlar yoluyla bulaş
- Ticaret mallarından bulaş
- Tıbbi bakım ünitelerinde immünosüpresif hastaların etkileneceği virüsler (EBV,VZV, HHV6, HPV, human parvovirus 19, polyoma virüsleri JC ve BK, adenovirüsler, HBV, moluscum contagiosum virüs, kızamık, HCV, ınfluenza, RSV)

ÇEVRE:
YENİ VİRAL HASTALIKLARIN ÇIKMASINI SAĞLAYAN EKOLOJİK VE ZOONOTİK FAKTÖRLER

- Popülasyon hareketleri, insanların düzensiz yerleşmesi ve evcil hayvanların yeni eklembacaklı ortamına girmesiyle yeni hastalık epizodları ortaya çıkmaktadır
- Panama kanalının yapılmasıyla Orta Amerika'da Sarı ateş salgınları başlamıştır
- Brezilya'da amozon ormanlarında ağaç kesenler arasında mayora virus hastalığı ortaya çıkmıştır
- İlk kez Uganda'da 1937'de izole edilen Batı Nil virüs'ü yayılarak Mısır, İsrail, Hindistan ve Afrika'da 50 yıldan beri önemli bir halk sağlığı problemi olmuştur

ÇEVRE:
YENİ VİRAL HASTALIKLARIN ÇIKMASINI SAĞLAYAN EKOLOJİK VE ZOONOTİK FAKTÖRLER

- Sulak bölgelerin değişimiyle göçmen kuşların rotasını değiştirmesi, arbovirüslerin yeni yerlere girmesiyle risk artmıştır
- Sulak alanların değişmesi, insan yaşam biçimini değiştirmiş, eklembacaklı vektör ilişkilerini etkilemiştir
- Japon B ensefalit virüsü Asya'da yeni yerlere girmiştir
- Dengue; dünyanın tropikal bölgelerinde hızla ortaya çıkan ve her yıl milyonlarca olguda görülen hastalıklarından biridir. Vektör sivrisineğin (*Aedes aegypti*) doğal ortamı olan coğrafyada (Brezilya, Bolivya, Kolombiya, Paraguay, Ekvator, Venezuella, Nigaraguay, Küba ve Meksika) endemiktir

ÇEVRE:
YENİ VİRAL HASTALIKLARIN ÇIKMASINI SAĞLAYAN EKOLOJİK VE ZOONOTİK FAKTÖRLER

- Tropikal ve subtropikal bölgelerde 17., 18. ve 19. yüzyıllarda epidemilere neden olan Sarı ateş etkeni oldukça tehlikeli bir virüstür ve vektörü aynı sivrisinektir
- Sarı ateş virüsü, Afrika ve Güney Amerika için potansiyel risk olmaktadır
- Kore hemorajik ateşi, Kore harbi sırasında (1950-1952) görülmüştür ve moratlitesi yüksektir. Etken olan Hantaan virüsü 1976' da izole edilmiştir, vektörü kemiricilerdir

ÇEVRE:
YENİ VİRAL HASTALIKLARIN ÇIKMASINI SAĞLAYAN EKOLOJİK VE ZOONOTİK FAKTÖRLER

- Uzak doğuda, Kore'de "Kore renal sendromlu hemorajik ateş" ve Çin'de "epidemik hemorajik ateş" olgusu sayısı yılda 100.000'dir
- 1993 Mayıs ayında güneybatı Ameriaka'da fatalitesi yüksek (%38) "Şidetli akut solunum sendromu" denilen yeni bir hantavirüs infeksiyonu görülmüş, etkeni Sin Nombre virus olarak adlandırılmıştır
- Kemiricilerin idrar, dışkı ve salyalarında bulunan virüsün inhalasyonu ile insana bulaşır, rezervuarı geyik faresidir

GÜNCEL VE TEKRAR GÜNCELLEŞEN HASTALIKLARDAN KORUNMA VE KONTROL

- **Araştırma dönemi**
- Hastalık karakteri belirlenmeli
- Epidemiyolojik karakteri belirlenmeli
- Yeni bir virüsten kuşkulanıldığı zaman etken araştırılmalı, izolasyon ve identifikasyonu yapılmalı
- Moleküler biyolojisi, patogenezi, fizyopatolojisi, immünolojisi, ekolojisi, epidemiyolojisi, sosyolojisi ve davranış tarzı ve vektör biyolojisi araştırılmalı

GÜNCEL VE TEKRAR GÜNCELLEŞEN HASTALIKLARDAN KORUNMA VE KONTROL

- **Müdahale dönemi**
- Şayet kuşkulu olgunun klinik ve mikrobiyolojik tanısı kesinleşirse, görevli epidemiyolog haberdar edilmeli ve ilgili kurumlara bildirilmeli
- Bölgesel sağlık kurumlarına ve uzman danışmanlara ulaşmak için hızlı kominikasyon sistemi oluşturulmalı
- Halk sağlığı kurumları haberdar edilerek olgular derhal bildirilmeli, yeni hastalık kayıtları düzenli yapılmalı ve lojistik yardım sağlanmalı

GÜNCEL VE TEKRAR GÜNCELLEŞEN HASTALIKLARDAN KORUNMA VE KONTROL

- Teknoloji tansferi sağlanmalı (tanı teknolojisi, aşı, ilaç üreten ticari sektörlerden tıbbi destek)
- Uzman danışmanlardan oluşan bir koordinasyon kurulu ile bunlara bağlı alt üniteleri oluşturulmalı
- İnfeksiyon hastalıkları, mikrobiyoloji ve epidemiyoloji uzmanları birlikte sorumluluk üstlenmeli
- Karantina uygulanmalı

GÜNCEL VE TEKRAR GÜNCELLEŞEN HASTALIKLARDAN KORUNMA VE KONTROL

- Yanlış veya gecikmeli tanı, uygulanacak karantinanın gecikmesine, mortalite ve morbidite'nin yükselmesine, medya ve halk arasında paniklere yol açacaktır
- Hastanelerde bulaşıcılığı çok yüksek salgınları göğüsleyebilecek izole servis ve referans mikrobiyoloji laboratuvarları açılmalı, çalışanları eğitilmeli
- Vektör kontrolü, rezvuar konak kontrolü, çevre kontrolü (su, hayvan, eklebacaklı) yapılmalı ve bölgenin sanitasyonu sağlanmalı (güveli yiyecek, su, kanalizasyon)

İNSAN ADENOVİRUS ENFEKSİYONLARINDA TANI

PROF. DR. ARZU SAYINER

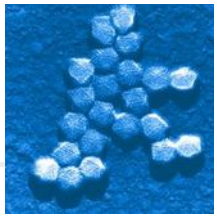
24 HAZİRAN 2009, 09:40-10:20

İNSAN ADENOVİRUS İNFEKSİYONLARI



Prof. Dr. A. Arzu Sayıner
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, İzmir

Tarihçe



- 1953 → İlk izolasyon
  - Adenoid dokudan izolasyon
  - Askerlerde solunum yolu enf. etkeni
- 1956 → "Adenovirus" (Ad) olarak tanımlandı (Enders et al. 1956)
- GİS ve göz enfeksiyonlarındaki rolü saptandı.
- 1962 → Ad tip 12 ile bebek hamsterde kanser oluşumu
  - İnsanda kanser ???
- 1955-60 → Aşı çalışmaları

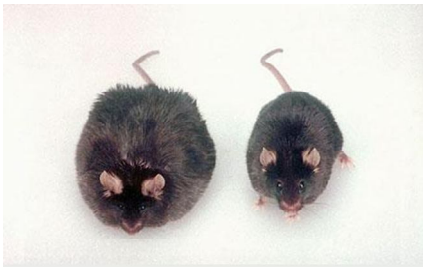
İnsanda enfeksiyon

Konak, doku ve serotipe göre değişken

SIK				NADİR
Solunum	Göz	Üriner	GİS	Hepatit, pankreatit
Farenjit	Konjonktivit	Akut hemorajik sistit	Enterit	Menenjit
Faringokonjonktival ateş	Keratokonjonktivit			Ansefalit
Boğmaca benzeri tablo				Miyo-perikardit
Bronşiolit				Kolit
Pnömoni				Dissemine fatal enf.
				Genital enf.

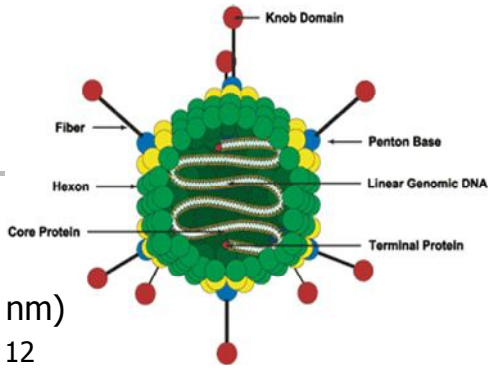
Obezite – Ad 36 ilişkisi





Dhurandhar NV et al. Adipogenic cascade can be induced without adipogenic media by a human adenovirus. Obesity 2009; 17 4, 657-664.

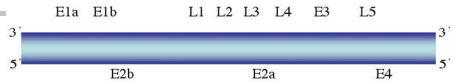
VİRUS



- Zarfsız
- İkozahedral kapsid (70-90 nm)
  - 252 kapsomer: 240 hekzon, 12 penton
  - 20 üçgen yüz, 12 köşede birer penton
  - Taban ("base") ve çıkıntı ("fiber")
    - Topuz → Reseptöre bağlanma
- Linear, dsDNA (36 kb)
  - 5' ucunda protein (TP)
    - DNA sentezinde primer

www.qbiogene.com

Virus genomu



- **Erken genler (E)**

E1A ve B : Transkripsiyon aktivasyonu, konak hücrenin S fazına geçmesi

E2 : DNA replikasyonu ve transkripsiyonundan sorumlu üç protein kodlar (polimeraz, terminal pr, DNA'ya bağlanan protein)

E3 : Bağışık yanıtı bozar. (MHC transportunun ve hücre lizisinin engellenmesi)

E4 : Transkripsiyonun düzenlenmesi, geç gen ekspresyonuna geçiş, mRNA transportu, hücrenin gen ekspresyonunun baskılanması, viral DNA replikasyonu

- **Geç genler (L) :** Yapısal proteinler

Yapısal proteinler

10 yapısal protein

No	İsim	Görev
II	Hekzon monomeri →2 ilmik: L1 (HVR 1-6) L2 (HVR 7)	Yapısal
III	Penton tabanı	Penetrasyon, toksik
IIIa	Penton tabanına bağlı	Penetrasyon
IV	Çıkıntı	Tutunma, HA
V	Kor: DNA ve penton tabanı ile ilişkili	Histon benzeri, paketleme?
VI	Hekzon minor polipeptidi	Stabilite, biraraya gelme?
VII	Kor	Histon benzeri
VIII	Hekzon minor polipeptidi	Stabilite, biraraya gelme?
IX	Hekzon minor polipeptidi	Stabilite, biraraya gelme?
TP	Terminal protein	Genom replikasyonu

Principles and Practice of Clinical Virology, Zuckerman AJ et al, 2004

Sınıflama

- *Adenoviridae*
  - *Mastadenovirus*
  - *Aviadenovirus*
  - *Atadenovirus*
  - *Siadenovirus*
- İnsanda 51 serotip
  - 6 tür ("species"): A-F

Tür	Serotip	Onkojenik	%G+C	Hemaglutinin (Rh/R)		Çıkıntı uzunluk (nm)
A	12,18,31	Yüksek	48-49	-	+/-	28-31
B1	3,7,16,21,50	Zayıf	50-52	+	-	9-11
B2	11,14,24,35	Zayıf	50-52	+	-	9-11
C	1,2,5,6	Yok	57-59	-	+/-	23-31
D	8-10,13,15,17,19,20,22,23,25-30, 32,33,36-39,42-49,51	Yok	58	+/-	+	12-13
E	4	Yok	57-61	-	+/-	17
F	40,41	Yok	57-59	-	+/-	~ 29

Davison AJ, J Gen Virol 2003

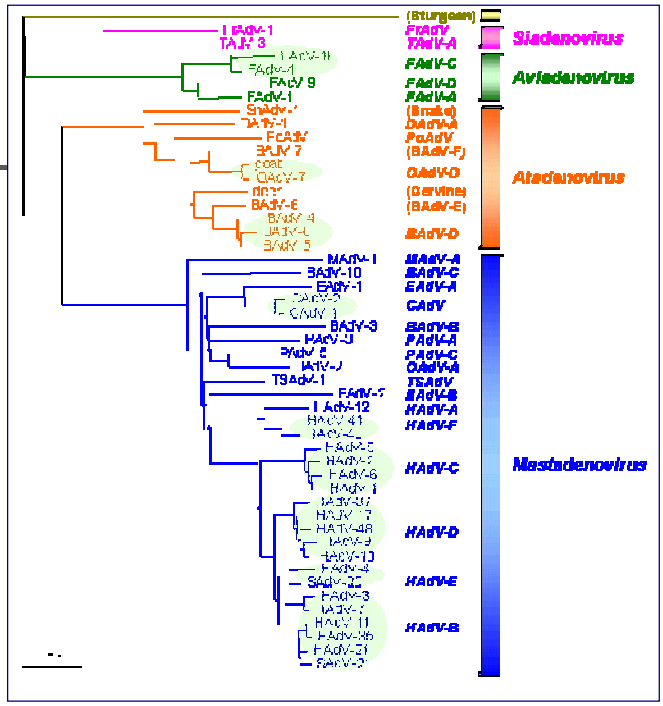


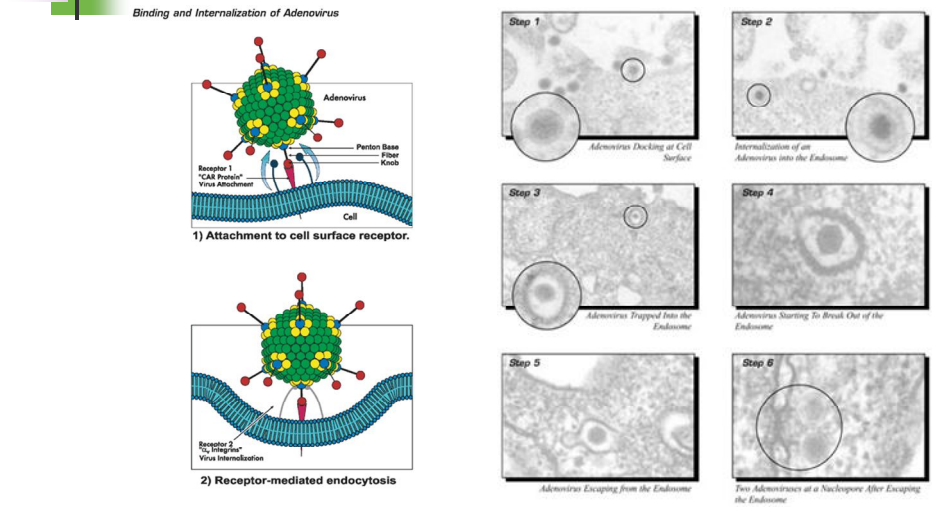
Table 1. Organ-specificity and receptor usage of human adenoviruses

Species	Serotype	Preferred site of infection	Primary cellular receptor
A	12, 18, 31	Gastrointestinal	CAR
B1	3, 7, 16, 21, 50	Respiratory	CD46; CD80/86; X
B2	11, 14, 34, 35	Renal	CD46; X
C	1, 2, 5, 6	Respiratory	CAR; heparan sulfate proteoglycans
D	8, 9, 10, 13, 15, 17, 19a, 19p, 20, 22–30, 32, 33, 36, 37, 38, 39, 42–48, 49, 51	Ocular and other	CAR; sialic acid; CD46
E	4	Respiratory	CAR
F	40, 41	Gastrointestinal	CAR

X refers to a yet unidentified glycoprotein [147].

Lenaerts L. et al, Rev Med Virol 2008:18

Hücreye giriş



Transkripsiyon
Replikasyon
Paketlenme
} çekirdek

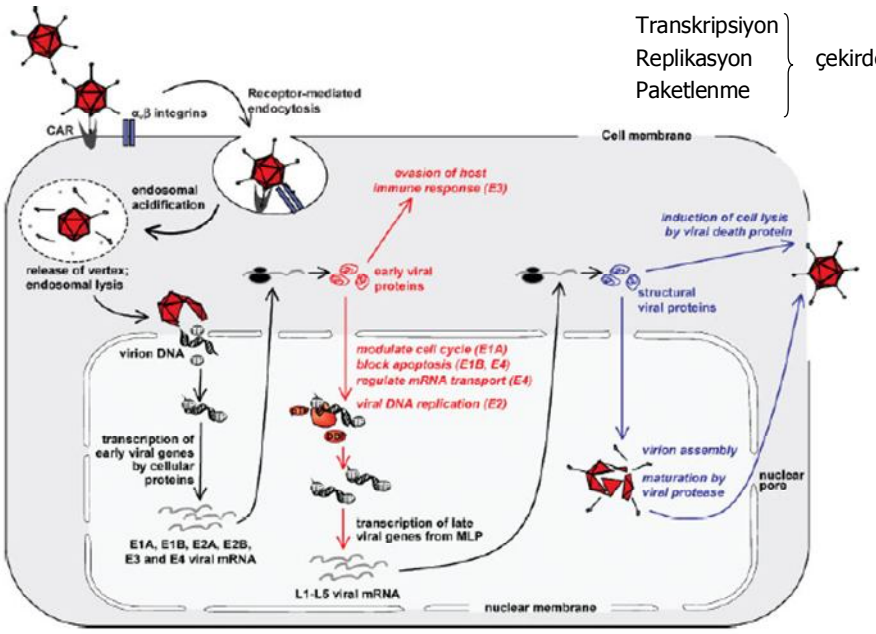
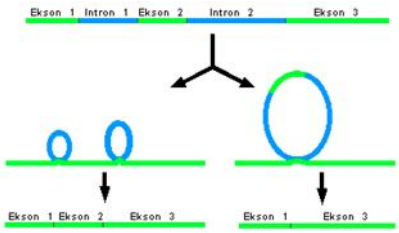


Figure 2. The adenovirus infection pathway. CAR, coxsackie-adenovirus receptor; DBP, DNA-binding protein; E, early; L, late; MLP, major late promoter; pTP, precursor terminal protein; TP, terminal protein.

Lenaerts L. et al Rev.Med.Virol. 2008

Transkripsiyon

- Alternatif uçbirleştirme ile her genden birden çok protein sentezlenir.
  - mRNA'da ekzon ve intron dizileri → İntronlar çıkarılır, ekzonlar birleşir.
- Uçbirleştirme "splicing"
  Phillip Sharp, Richard Roberts
  - 1993 Nobel ödülü



Epidemiyoloji

- Rezervuar: İnsan
  - Epidemi – 4, 7, 14, 21
  - Endemi – 1, 2, 5, 6
  - Sporadik olgular
- Bulaşma
  - Direkt temas
    - Göz aletleri, yüzeyler, eller
  - Damlacık yoluyla
  - Fekal-oral
  - Su – göl, yüzme havuzu
  - Cinsel temas ??
- İlk karşılaşma - genellikle çocuklukta
- Çoğu asemptomatik veya hafif, spontan sonlanan enfeksiyon
  - Serotipe özgü bağışık yanıt

- SYE %2-5
  - C (1, 2, 5)
  - B (3, 7)
  - ABD – Askerler (4, 7, 21)
- Göz enfeksiyonları
  - 1-7, 11-17, 19-21, 29
  - Yüzme havuzu: 3, 4, 7
  - Epidemi: 8, 19, 37
- İnfantlarda GE
  - Enterik serotipler: 40, 41
  - 2, 31
  - Nadir: 1, 3, 5, 7, 12, 18
- İmmunsupresiflerde enfeksiyon
  - 43-51

Fiziksel ve kimyasal ortama direnç

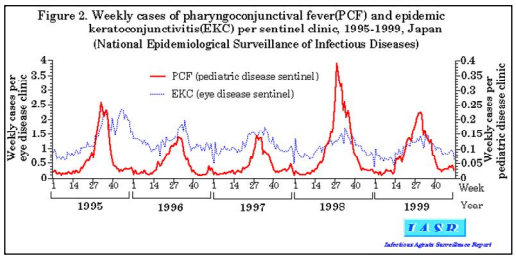
- Dirençli
  - Oda ısında dış ortam koşulları
  - Düşük pH, gastrik ve biliyer sekresyonlar
  - Eter, isopropil alkol
- İnaktivasyon
  - Sodyum hipoklorid (500 ppm) → 10dk
  - Sıcak su (75°C → 30 sn, 60°C → 2 dk, 56°C → 30 dk)

Patogenez

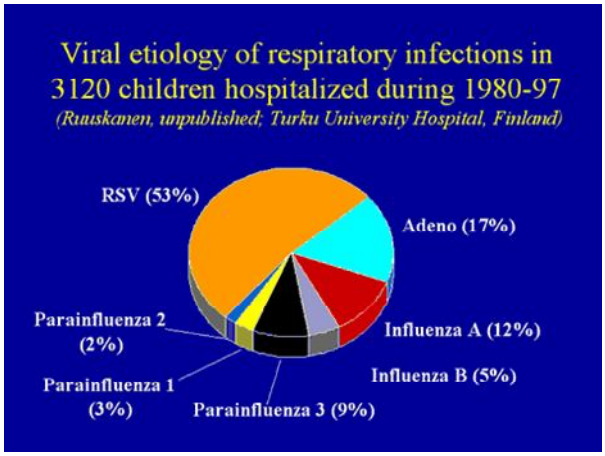
- Litik-prodüktif enfeksiyon – genellikle epitelde
- Latent-persistan enfeksiyon – Lenfoid doku, böbrek, KC, AKC, beyin
  - Asemptomatik çocukların tonsillerinde (+)
  - Organ nakli ile bulaş
  - Enfeksiyon sonrası dışkıda aylarca (+)
  - İmmunsupresiflerde (KİT) reaktivasyon
  - Persistans mekanizması
    - Uzun ömürlü lenfositlerde epizomal
    - Dokuda düşük düzey replikasyon
    - İntegrasyon?
  - Persistans yaşla azalır.
- Onkojenik enfeksiyon – Ad A ile hamsterlerde

Solunum yolu enfeksiyonu

- Kış sonu, ilkbahar, yaz başı
- Her tür klinik tablo
  - Eksüdatif tonsillit
- Ad7 → yüksek patojenisite, fatal seyir
- Çocuklarda pnömoni (Ad 3, 7)
  - İnfantlarda ağır
- İD: 5-8 gün
- <4 yaş
  - %16 varan EX
  - Sekel
- Dışkı ile saçım – aylarca, yıllarca



- Erişkinlerde %3
- Çocuklarda %5 -7
  - Hospitalize olanların %10'unda
- Askeri birliklerde salgınlar → Ad3, 4, 7
  - %20-40 hospitalizasyon



Askeri birliklerde salgınlar

- Sıklıkla Ad 3, 4, 7
- Ad 14 salgını (Hava Eğitim Üssü, ABD, 2007)
  - 551/1147 (%48) enfekte kişi
    - 23 pnömoni
      - 4 yoğun bakım gereksinimi → 1 ex
  - Ad7 antikorlarının varlığı – kısmen koruyucu

Tate et al. J Infect Dis, 2009

Neonatal YBÜ – Ad 30 salgını

- 6 ay süren salgın → 21/333 (%6.3) bebek enfekte, 6 ex
- Göz muayenesi ile bağlantılı
- Enfeksiyon kontrol önlemlerinin erken kesilmesi ile salgının alevlenmesi
- Hastalar
  - 7 pnömoni
  - 7 konjonktivit
  - 1 konjonktivit + pnömoni
  - 1 ÜSYE
  - 5 asemptomatik

Faden et al. J Pediatr, 2005

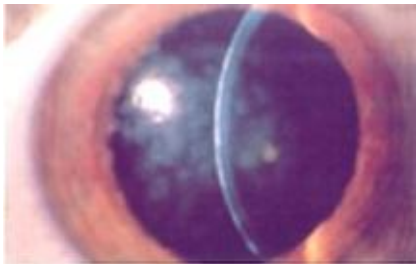
Göz enfeksiyonları

- Viral konjontivitlerin %50'si
  - Ani başlangıç, kırmızı göz, sulu akıntı, LAP
- Faringokonjonktival ateş ("PCF")
- EKC (Ad D: 8, 19, 37)
  - Çok bulaşıcı ve ciddi → Korneada opasiteler
  - Göz kliniklerindeki en sık nozokomiyal ajan
    - Tonometre, göz damlaları, el, havlu, bekleme odası
  - İD: 6-10 gün
  - Klinik: 2 hft
  - Fotofobi, bzk görme, batma → aylarca
- Persistan enfeksiyon yapabilir
  - Alevlenmeler, bulaştırıcılık









Viral göz enfeksiyonlarında klinik tanı

Table 1. Correlation of recovered virus and clinical diagnosis in misdiagnosed cases

Clinical diagnosis	Laboratory results				
	adeno	entero	VZV	CMV	herpes
Herpes conj	13%	3.2%	3.2%	3.2%	
Adeno conj					4.8%
AHC	30%				
Herpes keratitis	5%	2.7 %			

adeno= adenovirus; entero= enterovirus; VZV= varicella zoster virus; CMV= cytomegalovirus; conj= conjunctivitis; AHC= acute hemorrhagic conjunctivitis

Marangon et al. Arq Bras Oftalmol, 2007

Gastroenterit

- Çocuklarda → Rotavirusdan sonra ikinci en sık viral enterit etkeni (%5-15)
  - Yıl boyu
- Çocuklarda %50 olguda SY bulguları ile birlikte
- Klinik: 1 – 2 hafta
- Sıklıkla serotip 40, 41
  - Intusepsiyon – Ad 1, 2, 5, 6
- Bulantı, kusma, ishal → sulu, lökosit ve eritrosit yok.
  - Ardından aylarca süren laktoz intoleransı



Hemorajik sistit

- Çocuklarda ve immün süpresiflerde
- En sık 11, nadir olarak 34, 35
- Böbrekte persistan enfeksiyon → immün süpresyon ile aktivasyon
- Kİ tx'da sistemik enfeksiyonun ilk belirtisi olabilir.
- Böbrek tx'da görülebilir.

İmmün süpresiflerde enfeksiyon - 1

- Uzun süreli, tedavi zor, fatalite riski yüksek
  - Pnömoni - %60 (sağlıklılarda %15)
  - Hepatit - %50 (sağlıklılarda %10)
- Kİ tx alıcılarında daha sık

  Enterit, sistit, pnömoni, hepatit, pankreatit, kolit, disemine enfeksiyon
  - Erişkinlerde %5-14, çocuklarda %30
  - Tx sonrası 1-3 ay arası
  - Reaktivasyon veya Kİ / transfüzyon ile bulaşma
- Riski artıran faktörler
  - Küçük yaş → 5 yaş altı KİT yapılan çocuklarda insidans %80'e ulaşabiliyor.
  - Allojenik tx
  - T hücre sayısında azalma
  - Uygun olmayan donör
  - Tüm vücut ışınlaması
  - GVHD

İmmün süpresiflerde enfeksiyon - 2

- Solid organ tx – tx organ tutulur
  - KC tx
    - Hepatit, %50 fatal
    - Ad C sık
  - Böbrek tx
    - Hemorajik sistit, % 17 fatal
    - Ad B sık
- HIV (+)
  - %7-30
  - Sıklıkla başka patojenlerle birlikte
  - GİS, üriner sistem
  - Belirti olmasa da dışkı / idrarda (+)
  - Düşük CD4 ile ilişkili uzun süreli fekal saçım
  - 11, 34, 35, 42-47 → Bazı serotipler özellikle HIV (+)lerde saptanıyor.
  - HAART ile önlenebiliyor.
- Kanser hastaları – özellikle çocuklar

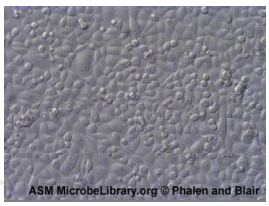
Bağışık yanıt

- **Yanıt**
  - **Antikor yanıtı**
    - Gruba özgü
      - Nötralizan değil, tanısal
    - Tipe özgü
      - Penton, hekzon, çıkıntılarda bulunan antijenlere yönelik
      - Nötralizan, koruyucu
      - Toplumda, ~10 yaş endemik serotiplere karşı Ab (+)
  - **Hücresel yanıt**
    - Korunmuş epitoplara karşı T hücre yanıtı
    - Hücresel yanıt bzk olanlarda ciddi enfeksiyon
- **Kaçış**
  - IFN inhibisyonu
    - Virusla ilişkili RNA ve E1A pr ile
  - TNF ve Fas-aracılı apopitozun inhibisyonu
    - E1b ve E3 pr ile enfekte hücrenin korunması
  - MHC1 ekspresyonunun baskılanması
    - E3 pr ile CD8 yanıtından kaçış

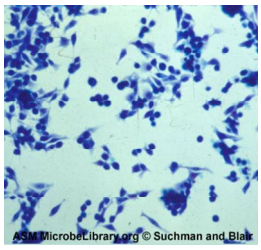
Tanı

- Elektron mikroskobisi
- Hücre kültürü
- Viral yapıların saptanması
  - Antijen
  - Nükleik asit
- Viral antikorların saptanması

Kültür



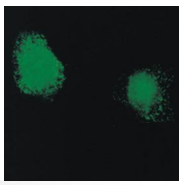
- Örnek
  - Boğaz sürüntüsü
  - NP sürüntü / aspirat
  - Konjonktival sürüntü
  - Dışkı
  - BOS
  - İdrar
  - Biyopsiler
- Klinik başladıktan sonra
  - Solunum örneklerinde 1 hft
  - Göz örneklerinde 2 hft
  - İmmün süpresiflerde dışkı ve idrarda 2 hft – ≥1yıl
- İnsan embriyonik böbrek veya epitelial hücre dizileri
  - HEK, Hep2, HeLa, A549
  - CPE → 2 – 28 gün
  - IF
  - Tiplendirme (nötralizasyon)



Kültür sonucunun yorumlanması

- İzolasyon yeri önemli
  - Göz, akciğer, genital sistemden izolasyon → tanı koydurur.
- Boğazdan izolasyon → klinik ile yorumlanır.
- Dışkıdan izolasyon → gastroenterit varsa anlamlıdır.

Antijen Saptama



- IFA
  - Hekzon proteinlerine yönelik monoklonal Ab
  - Solunum örnekleri
  - İşlem süresi: 2-4 saat
  - Kültüre göre D: %30-60
    - Örnek kalitesi
    - Örnek alınma zamanı
    - Ab



- İmmünokromatografi, lateks aglütinasyon
  - Enterik Ad yönelik
    - 10^{10} partikül/gr - Duyarlılık yeterli
  - Göz örneklerine yönelik
    - Duyarlılık %60-80
    - Negatif sonuçlar kültür veya PCR ile doğrulanmalı



Viral DNA saptama

- PCR
  - Universal
    - Dejenere primerler
    - Multipleks
  - Tipe özgü
  - Türe özgü
  - Kantitatif
- Hedef bölge: Hekzon geni (2.9 kb)

Okado M et al. Arch Virol 2007
Lu & Erdman. Arch Virol 2006
Miura-Ochiai R at al. J Clin Microbiol 2007

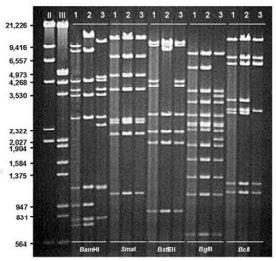
Vireminin saptanması - izlemi

İmmün süpresif olguların izleminde önemli

- Kantitatif PCR gerekli
  - Ciddi enfeksiyon göstergeleri
    - Serum/plazmada DNA (+) olması
    - Bir haftalık aralarla yapılan izlemde viral yükün artması
      - KİT'de +100 güne dek izlem
  - Genellikle viral yükteki artış ile semptomlu hastalık arasında birkaç hafta bulunur → preemptif tedavi

van Tol et al, Bone Marrow Transplant 2005

Tiplendirme -1



Yöntem	Olumlu	Olumsuz
İmmünolojik Nötralizasyon, HA inhibisyon	Klasik yöntem	▪ Zaman – emek yoğun ▪ Poliklonal, monoklonal Ab Sınırlı ulaşım Çapraz reaksiyon (poliklonal)
REA	Tüm genomdaki genetik varyasyonlar	▪ Kültürde üretilmiş virus ▪ Emek yoğun ▪ Yeni paternler nedeniyle yorum güç

Tiplendirme - 2

Yöntem	Olumlu	Olumsuz
PCR + REA	Kolay, hızlı, ucuz	REA kısıtlılıkları
Türe – tipe özgü PCR	Kolay, hızlı	Sınırlı sayıda tür, tip tanımlaması
PCR + dizi analizi	Kolay, Hızlı	Maliyet yüksek Hekzon geni HVR'lar (1-7) Çoklu amplifikasyon ve dizi analizi Tüm tipler için referans dizi yok. Kısa bölge – HVR içi veya dışı
"Microarray"	Kolay, hızlı	Maliyet yüksek

Tedavi

- Kesin tedavi, randomize kontrollü çalışma yok
- Birçok nükleozid anoloğu in vitro etkin, in-vivo ?
- Olgu sunumları, küçük grup deneyimleri
  - **Ribavirin** – YE: reversibl hafif anemi
    - Tip C adenoviruslara daha etkili
    - KİT – hemorajik sistit, pnömoni, enterit
    - KC tx – hepatit
    - Tedavinin erken başlanması önemli
  - **Cidofovir** – YE: nefrotoksisite
    - Pediyatrik kök hücre tx – hemorajik sistit, pnömoni, hepatit, enterit
  - **Immünoterapi**
    - KİT- donor lenfosit transfüzyonu

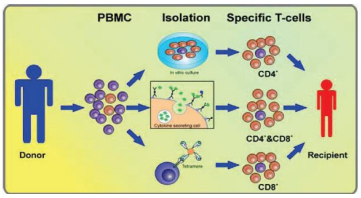
Bone Marrow Transplant 1999, Blood 2002, Pediatr Infect Dis 2000

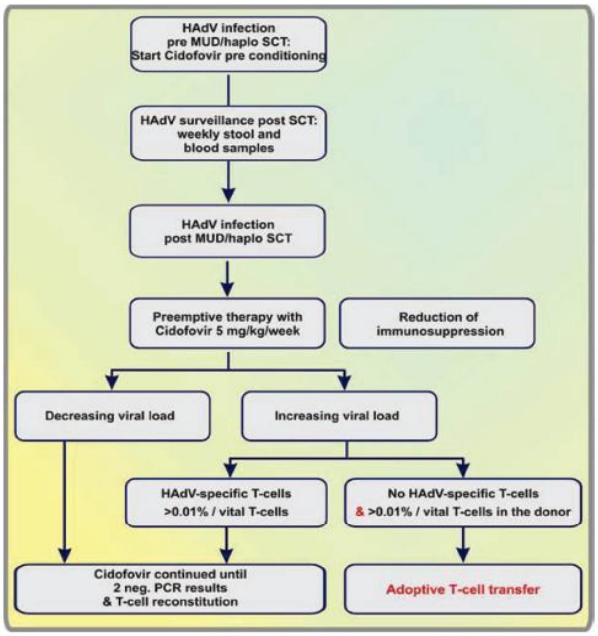
İmmün süpresiflerde tedavi

- Erken tanı
  - Periferik kanda kantitatif PCR ile izlem
    - CMV, EBV, Adenovirus - birlikte izlemi
- Preemptif tedavi (Cidofovir ?)
- Adenovirusa özgül T hücre sayısının artırılması
  - İmmün süpresyonun azaltılması
  - Adaptif virusa özgü T-hücre tedavisi

Gunson et al. J Clin Microbiol, 2009
Feuchtinger et al, Leukemia & Lymphoma, 2007

Pediyatrik allojenik kök hücre tx – Adenovirus için izlem ve tedavi planı





Feuchtinger et al, Leukemia & Lymphoma, 2007

Adenovirus aşısı



- Canlı, atenüe edilmemiş tip 4 ve 7
  - Oral, enterik kapsül içinde
  - Güvenli ve etkili
    - 1980 - askeri birliklerde kullanım
    - 1995 – aşı üretiminin durması
    - 1999 – aşılamanın durması
    - Askeri birliklerde salgınlar
      - %82 tip 4 ve 7
- Bazı erken genlerin çıkarılması ile atenüe edilmiş aşı çalışmaları

Bulaşmanın Önlenmesi -1

Solunum

- Hastadan damlacık saçımının önlenmesi (ağız ve burnun örtülmesi)
- Kirli ellerle göz, burun mukozasına temasın önlenmesi



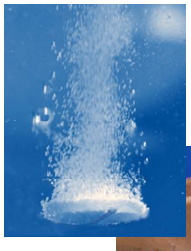
Fekal-oral, direkt temas

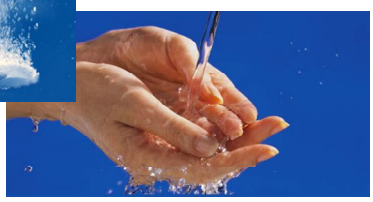
- Sık el yıkama ve kişisel hijyen
- Kontaminasyon riski olan yüzeylerin dezenfeksiyonu (Masa, oyuncak, dolap ve kapı tokmakları, vb)



Su ile bulaşma

- Klorlama





Bulaşmanın Önlenmesi -2

Nozokomiyal bulaşma (Göz)

- Aletlerin sterilizasyonu
- Temas eden tonometre ve tanısal lens kullanımının kısıtlanması
- Göz damlalarının kişisel olması
- Enfekte hasta ile temasta maske, eldiven ve diğer koruyucu önlemlerin kullanımı
- Hasta ile temas öncesi ve sonrası el yıkama
- Hasta bekleme ve muayene odalarının ayrılması ("Kırmızı oda") ve enfekte hastaların bekletilmeden muayenesi
- Yüzey dezenfeksiyonu
- Enfekte sağlık personelinin 2 hafta uzaklaştırılması

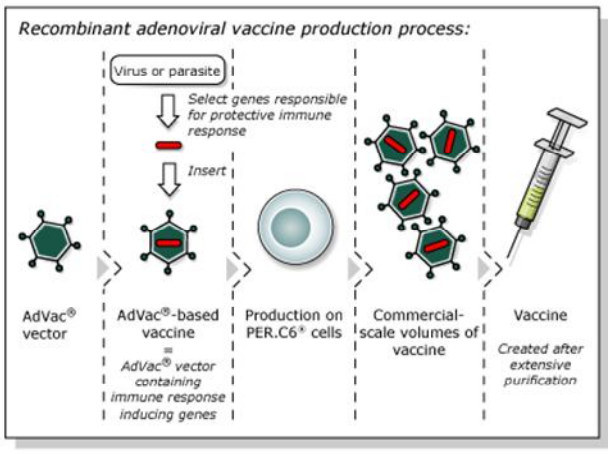




Ad vektörlerinin kullanımı - Aşı

Aşı geliştirme

- Hemorajik Ateş
- HIV
- HCV
- Sıtma
- Tb

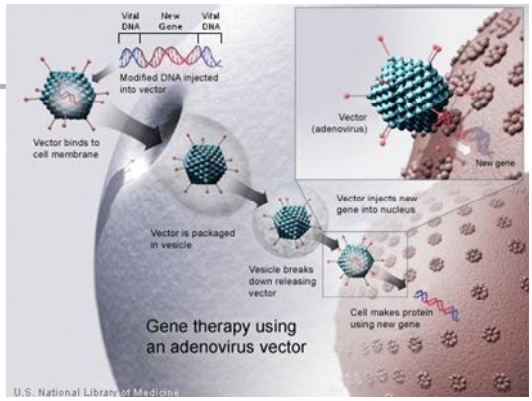


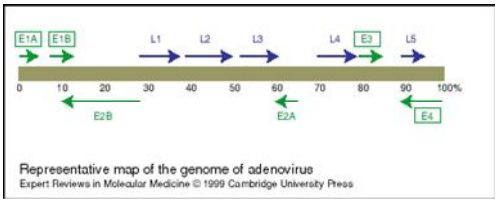
www.crucell.com

Ad vektörlerinin kullanımı - Tedavi

Gen tedavisi

- Genetik hastalıklar
  - Kistik fibroz – Transmembran regülatuar gen içeren vektör
    - Kısa süreli ekspresyon
    - Verimsiz gen aktarımı
- Kanser tedavisi
  - Sorunlu hücreye p53, RB gen aktarımı ile anti-onkojenik etkinin tamiri





Representative map of the genome of adenovirus
Expert Reviews in Molecular Medicine © 1999 Cambridge University Press

Gelişme bekleyen alanlar

- Tanı
  - Standardize kantitatif NAT
  - Hastalığı öngörecek eşik değerlerin ve izlem protokollerinin belirlenmesi
- Tedavi
- Kitlesel kullanıma uygun aşı
- Vektör olarak kullanımda başarı
- Patogenez
  - Persistans, latentlik, reaktivasyon

KLİNİK VİROLOJİ TESTLERİNDE YÖNTEM GEÇERLİLİK DEĞERLENDİRMESİ

PROF. DR. SELDA ERENSOY

24 HAZİRAN 2009, 10:50-11:30

Klinik Virolojide Yöntem Değerlendirmesi

Prof. Dr. Selda Erensoy
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD, İzmir

selda.erensoy@ege.edu.tr

✓**Analitik onay (Verifikasyon)**

Testin analitik değerlendirilmesinde belli kriterlerin uygunluğu

(SD, CV, analitik duyarlılık, özgüllük, dinamik aralık)

✓**Klinik Geçerlilik (Validasyon)**

Uygulama alanı için gerekli kriterleri taşıması

(klinik anlamlılık)

Kalite Güvencesi

- **Analiz öncesi (preanalitik)**
- **Analiz (analitik)**
- **Analiz sonrası (postanalitik)**

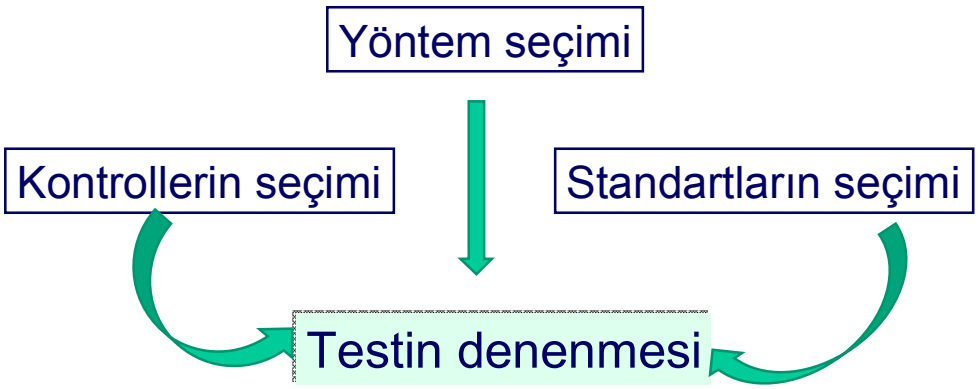
→Örnek toplanmasından → rapor edilmesine kadar.

→Raporda teste ait yeterli gerekli bilginin bulunması.

Test Geçerliliği

- Deneysel bir süreç
  - Doğru ve kesin analiz için reaktifler ve protokolün optimizasyonu
- Göreceli bir işlev
  - Tanısal duyarlılık
  - Tanısal özgüllük
- Koşullara bağlı
  - Hedef popülasyona göre → PPD / NPD
- İlerleyen – Sürekliliği olan bir süreç
  - Kullanım yaygınlaştıkça geçerlilik güvencesi artar

1. basamak: Testin kullanılabilirliğinin araştırılması

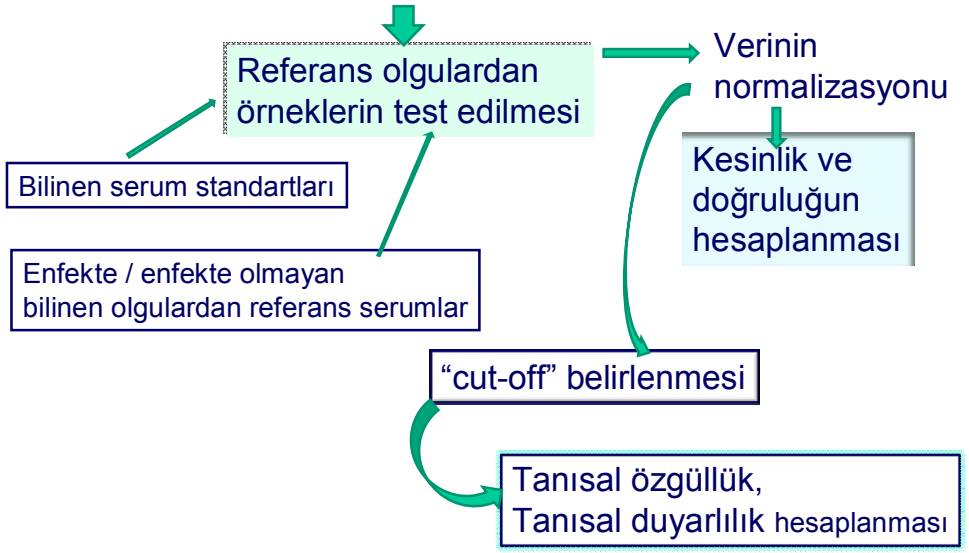


Jacobson RH, 1996

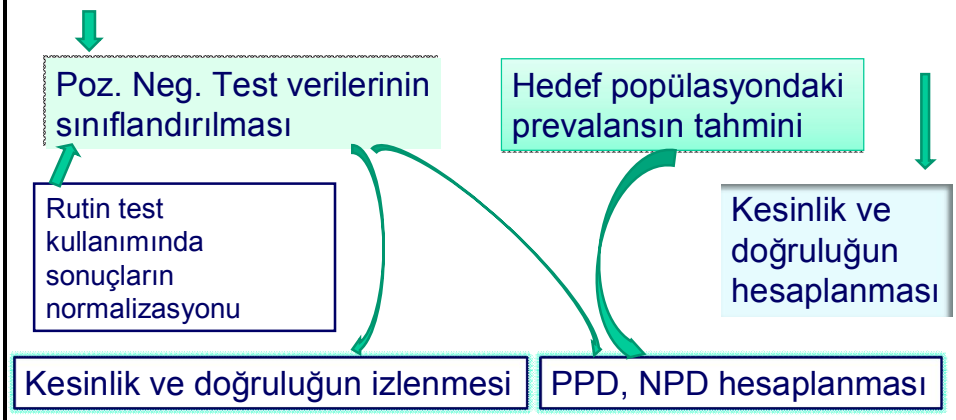
2. basamak: Testin geliştirilmesi ve standardizasyon



3. basamak: Testin performansının belirlenmesi



4. basamak: Testin performansının izlenmesi



5. basamak: Geçerlilik kriterlerinin sürekliliği ve genişletilmesi

Farklı popülasyonlardaki referans olguların örnekleri ile çalışma→ Geçerliliğin diğer popülasyonlara genişletilmesi

Yeni reaktiflerin kullanımdakilerle karşılaştırılarak standardize edilmesi

Kesinlik **•Çalışma içi** **•Çalışmalar arası**	**Karar düzeylerinde** **≥ 10** **20 çalışma (x2 düzey)** Standart sapma (SD; ±) Değişkenlik katsayısı (CV; %)	**Kalitatif**	**Kantitatif** √
Hasta korelasyonu	**Uyum katsayısı; referans yöntem/ lab. (%50 referans aralık dışında)**	**S=20** √	**S=40** √
Doğrusallık	**4-5 nokta (x2)**		√
Referans aralık geçerliliği	**40 veri noktası;** **120 nokta (yeni referans aralığı tanımı için)**		√
Doğruluk	**Gerçek değere yakınlık. 3 veri noktası**	√	√

Duyarlılık	**Saptama sınırı; çok düşük değerlerin anlamlı olduğu durumlarda**	**Kalitatif Kinik anlamda** √	**Kantitatif Kinik anlamda** √
Örnek stabilitesi	**Saklama ve transporta bağlı; hassas örnekler ve testler için**	√	√
İnterferans	**Testin performans ve doğruluğu bozan komponentler**	√	√
Organizma tanımlanması	**20 hasta izolatı + 20 negatif örnek**	√	√ **(semi-kantitatif)**
Antibiyotik duyarlılığı	**Uygun standart izolatlar (x3)**	√	√ **(semi-kantitatif)**

CPSA, July 2004

		Enfeksiyon durumu belli referans olgular			
		Enfekte		**Enfekte değil**	
Test sonucu	Pozitif	**570**	**(GP)**	**(YP)**	**46**
	Negatif	**30**	**(YN)**	**(GN)**	**1354**
		Tanısal duyarlılık **GP /(GP+YN)** **= 570/600** **= %95**		**Tanısal özgüllük** **GN /(GN+YP)** **= 1354/1400** **= %96.7**	

TANISAL VİROLOJİ LABORATUVARINDA Kantitatif Testler (örnek: NAT)

Kantitatif Nükleik Asit Testleri (NAT)

→ Virüs yükü

Hasta yönetiminde kullanım

Nükleik Asitlerin Miktarını Belirleme

1. **Göreceli kantitasyon ("relative") : Karşılaştırma yöntemi**
2. **Tam sayı bildiren ("absolute") : Viral Yük**
   - Ağırlık (pg)
   - Molekül sayısı (kopya, genom eş değeri)

   → Tanımlanmış hacim, hücre sayısı, doku ağırlığı (kopya/ml)

   Logaritmik sonuç verilmesi (log_{10})

   1000 k/ml = 10^3 = **3.0 log_{10}**

   - Uluslararası birim (IU)*

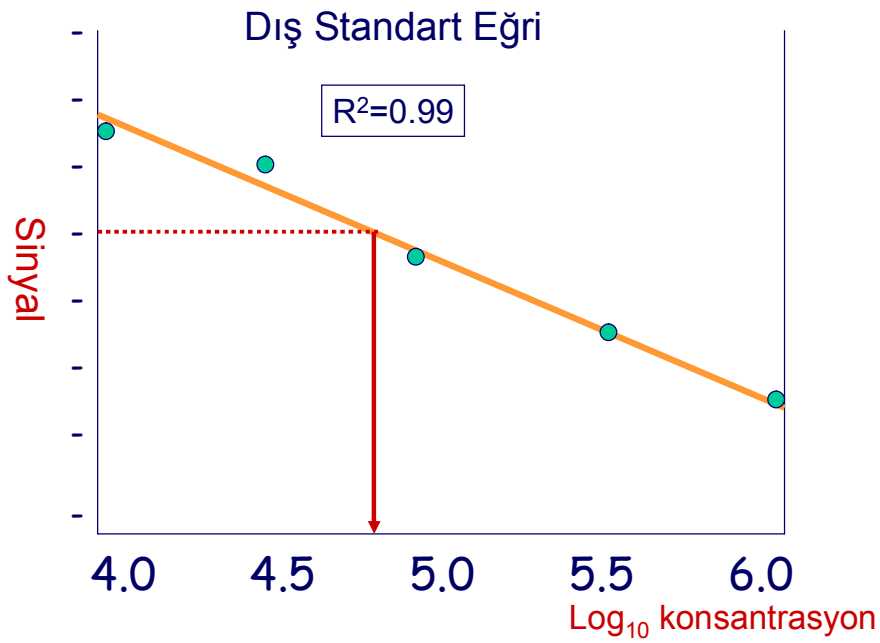
Nükleik asit testlerinde miktar belirleme

- **Kalibratörler (Standartlar)**

  Belirli miktarda nükleik asit bulunduran standart örnekler
  - **Doğal analitik standartlar**
  - **Sentetik standartlar (DNA / RNA)**
- **Dış kalibratörler**

  →Dış (eksternal) standart eğri
- **İç (internal) kantitasyon standardı**

  →Doğal n.a. sinyali ile karşılaştırarak



KLASİK PZR

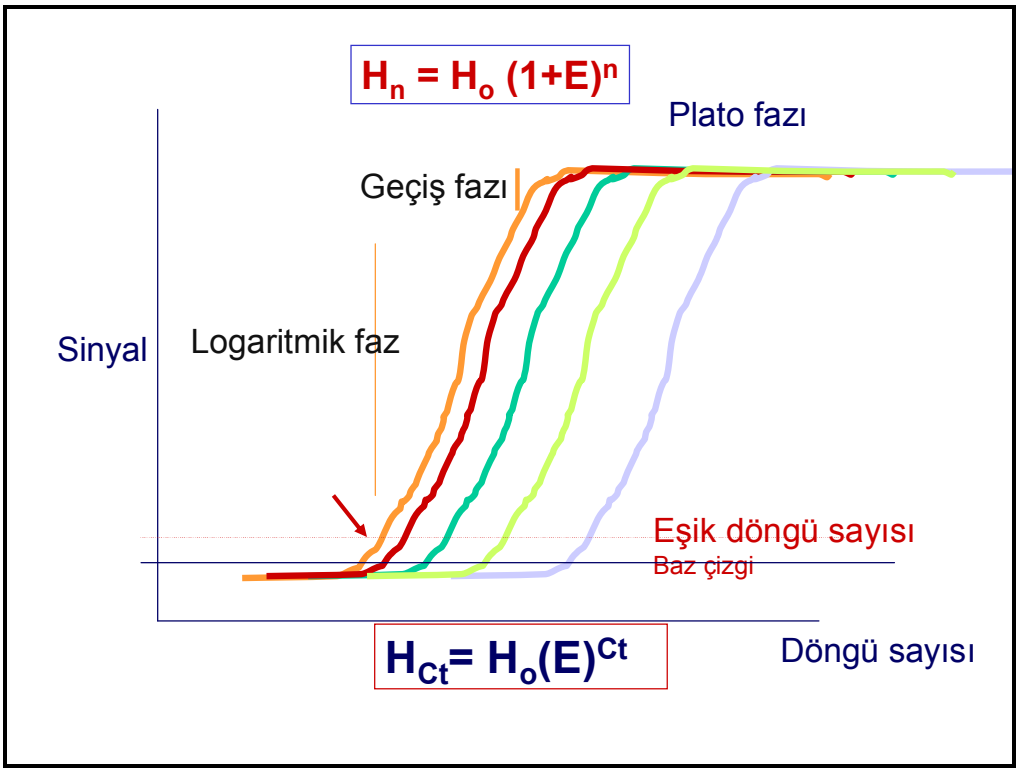
→PZR sonundaki ürünler (amplikonlar) saptanır; analiz edilir.

→İç kantitasyon standardı şart

"REAL TIME PCR"

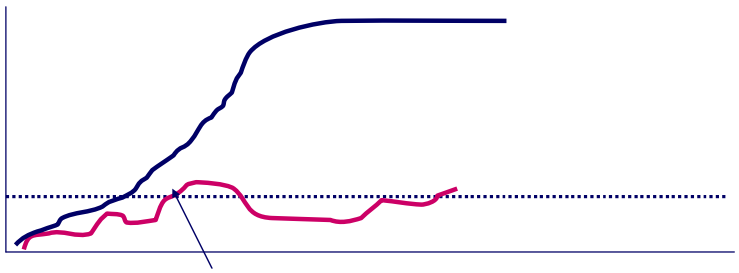
(GERÇEK ZAMANLI PZR)

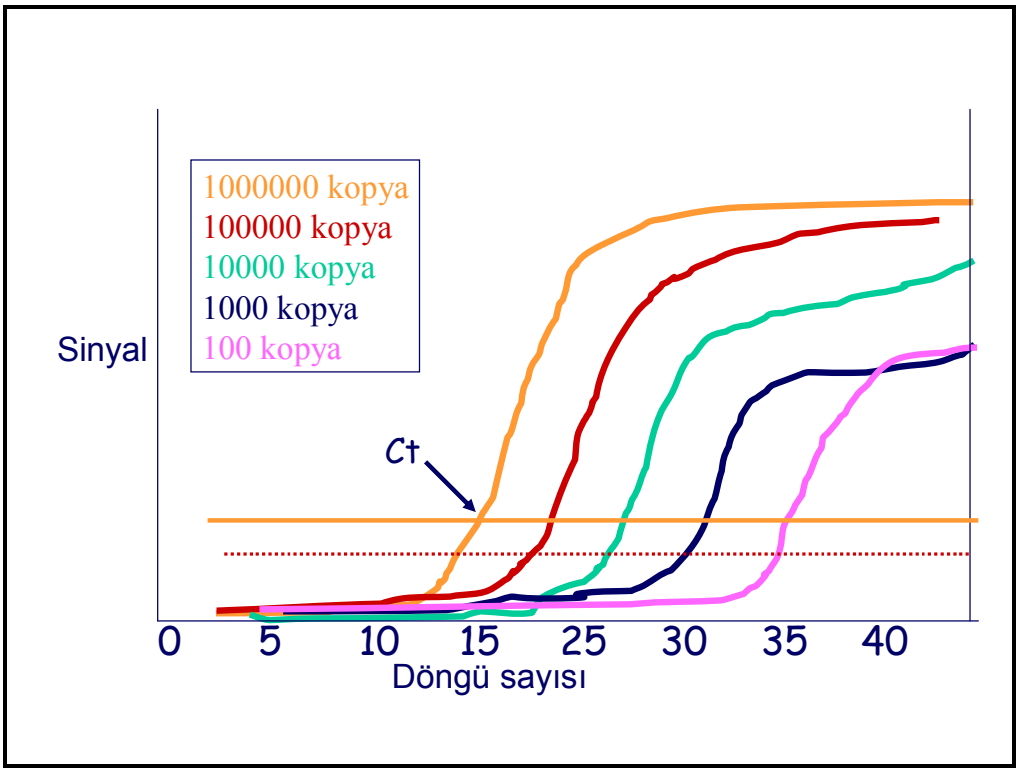
→ PZR devam ederken ortaya çıkan ürünler saptanmaya başladığı anda değerlendirmeğe alınır.

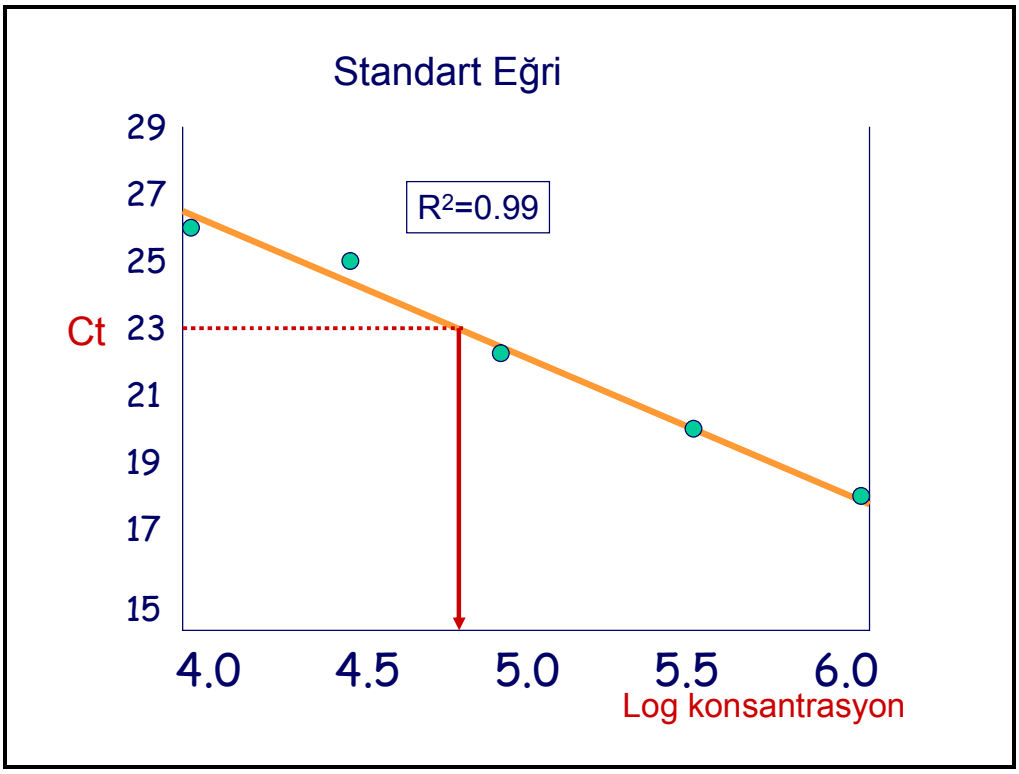


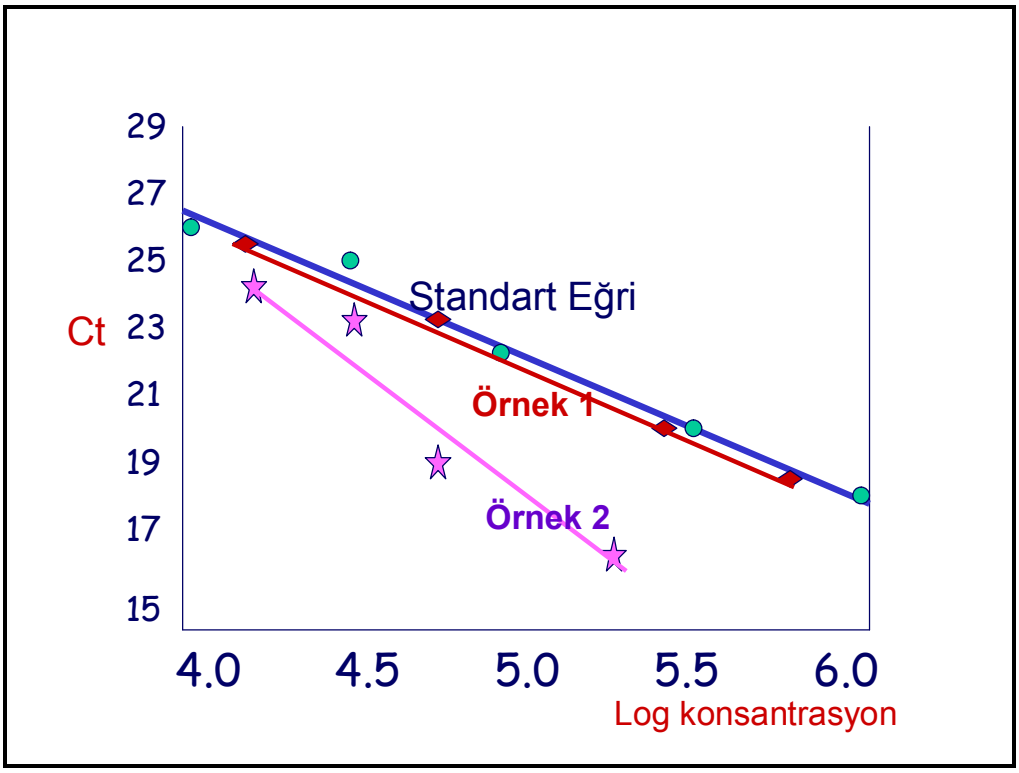
- Gerçek zamanlı PZR → Ct değerleri üzerinden hesaplamadan önce her örneğin amplifikasyon eğrisinin kontrol edilmesi gerekir.

→ Eşik çizgisinin geçilmesi özgül olmayan reaksiyonlara bağlı olabilir.

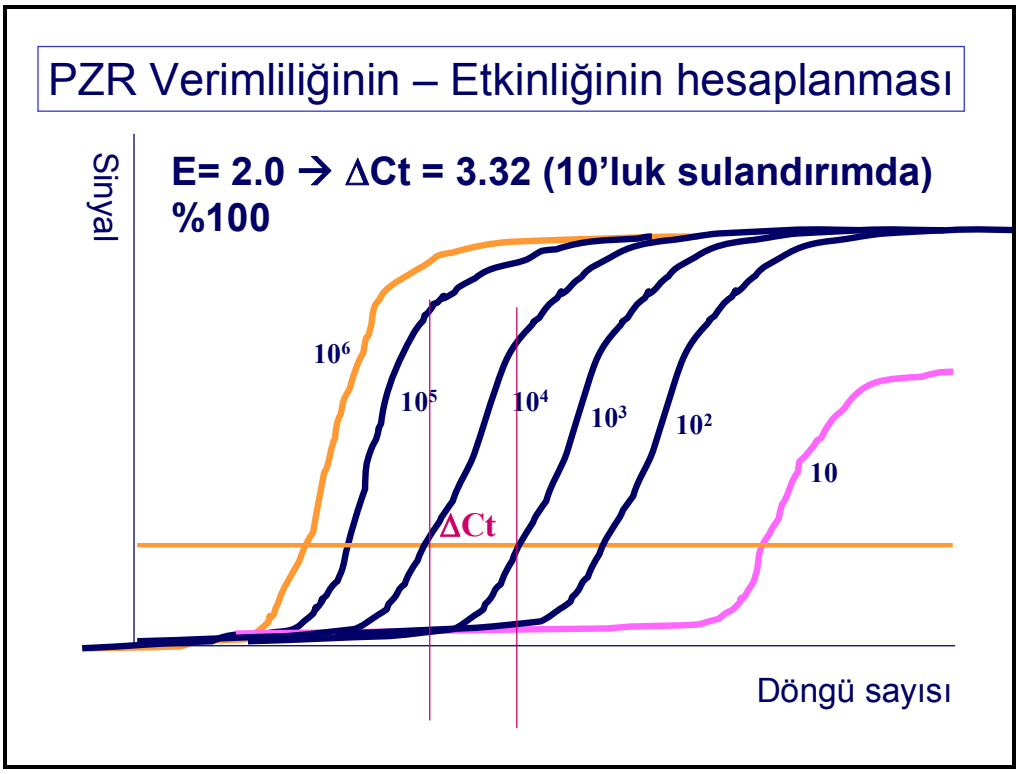


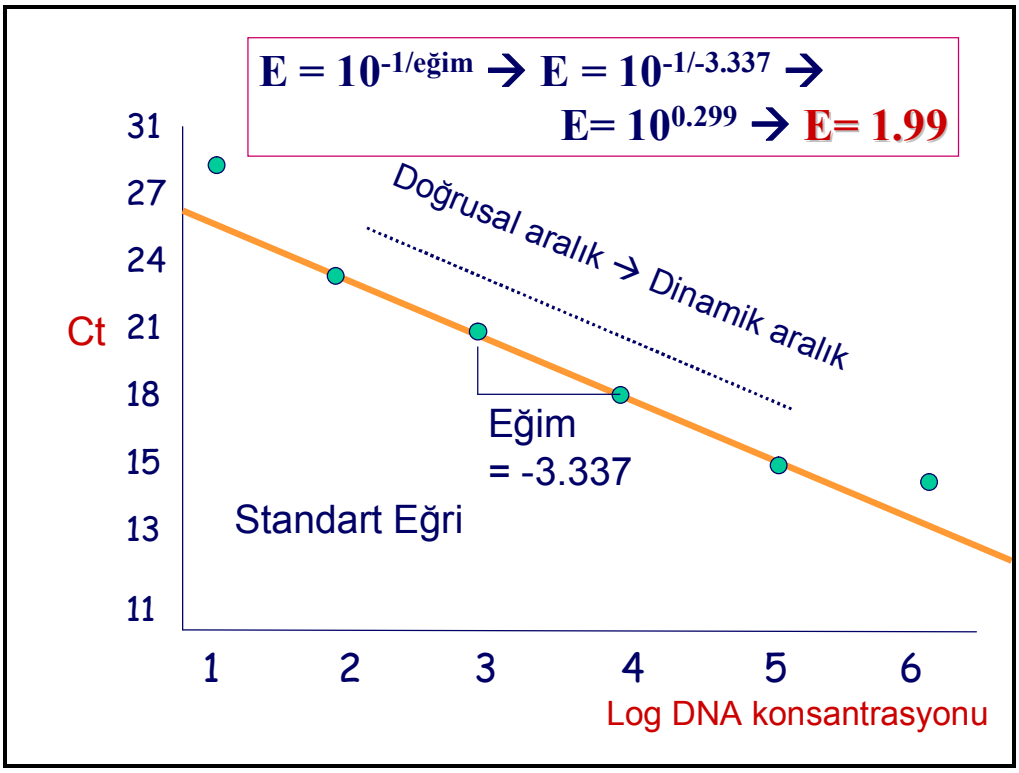

1000000 kopya
100000 kopya
10000 kopya
1000 kopya
100 kopya
Sinyal
Ct
0
5
10
15
25
30
35
40
Döngü sayısı

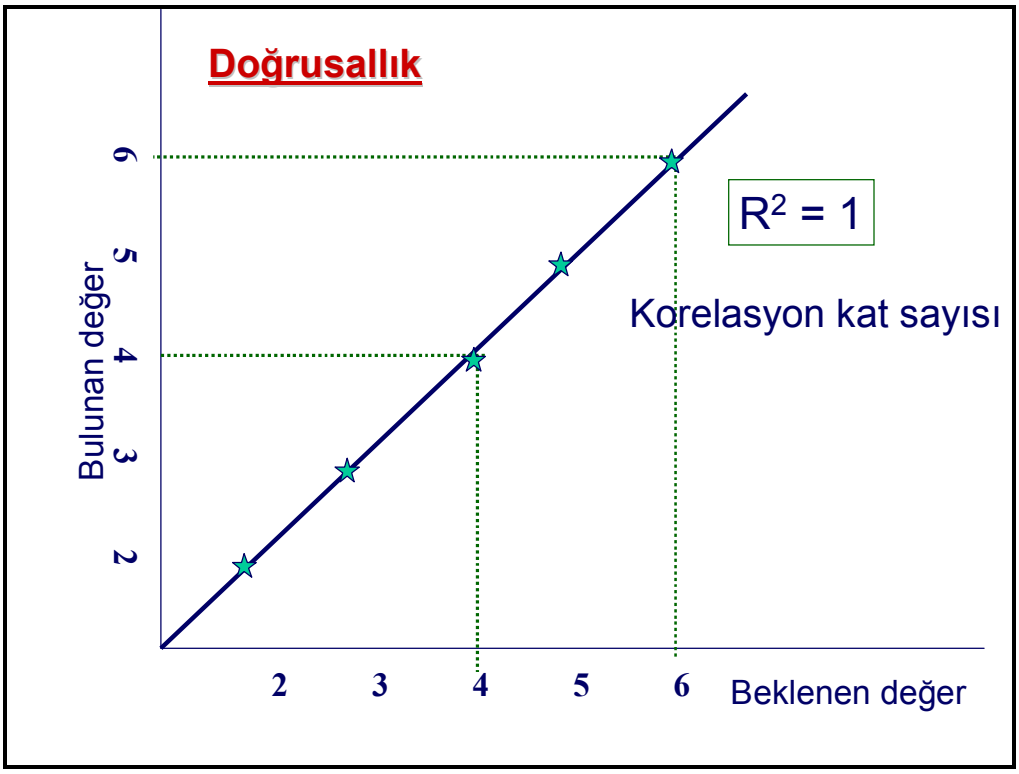

Standart Eğri
R²=0.99
Ct
29
27
25
23
21
19
17
15
4.0
4.5
5.0
5.5
6.0
Log konsantrasyon



PZR Verimliliğinin – Etkinliğinin hesaplanması




E = 10-1/eğim → E = 10-1/-3.337 →
E= 100.299 → E= 1.99
31
27
24
Ct 21
18
15
13
11
Doğrusal aralık → Dinamik aralık
Eğim
= -3.337
Standart Eğri
1
2
3
4
5
6
Log DNA konsantrasyonu


Doğrusallık
Bulunan değer
2
3
4
5
6
R2 = 1
Korelasyon kat sayısı
2
3
4
5
6
Beklenen değer

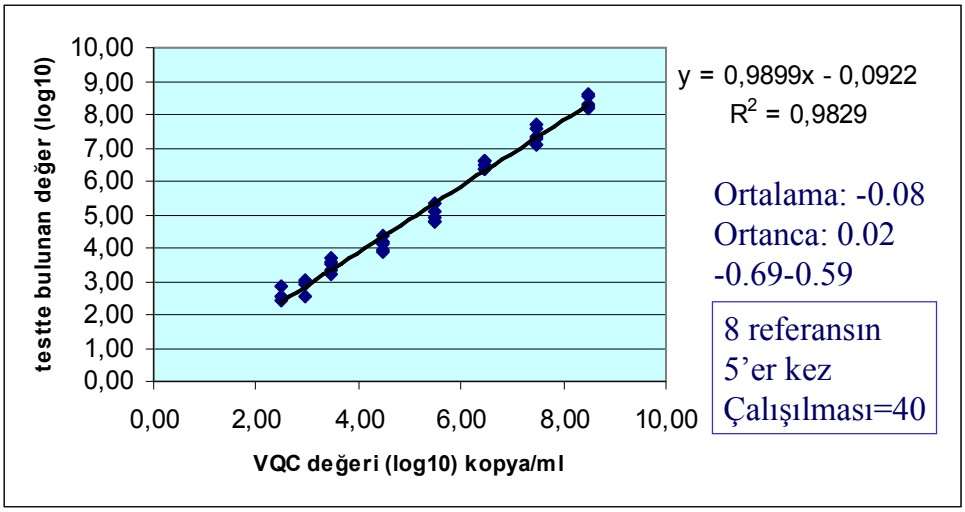
Kantitatif Nükleik Asit Testinin Değerlendirilmesi

1. Doğruluk ("Accuracy"):

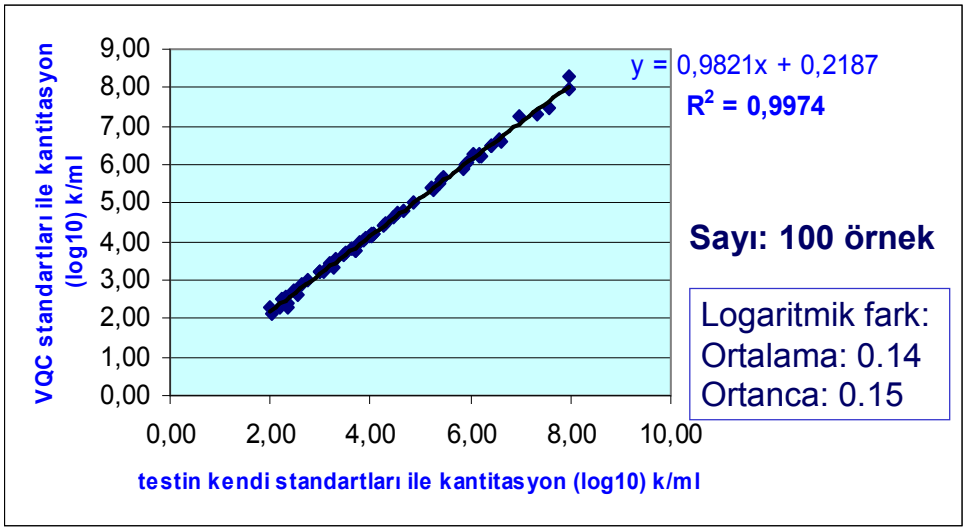
- Test sonuçlarının kabul edilen referansın gerçek değerine uyumu

→Testimizi literatüre dayandırılan klinik kararları uygulamak için kullanacaksak gerekli.

Testin dış referans panel ile değerlendirilmesi



Kantitatif bir "gerçek zamanlı PCR" testinin farklı standart panellerle değerlendirilmesi



Kantitatif Nükleik Asit Testinin Değerlendirilmesi

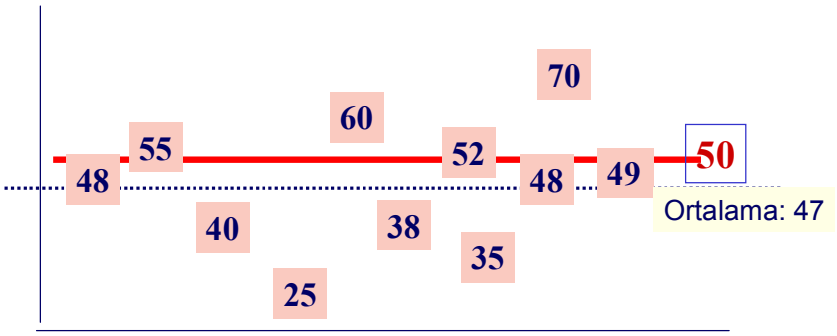
2. Güvenilirlik ("Precision"):

- Aynı örneğin tekrarlayan çalışmalarda elde edilen sonuçları arasındaki tutarlılık.

Aynı çalışmada ("intra-assay")

Farklı çalışmalarda (inter-assay")

→ Bir hastanın izlemi ve yönetimi için gerekli.

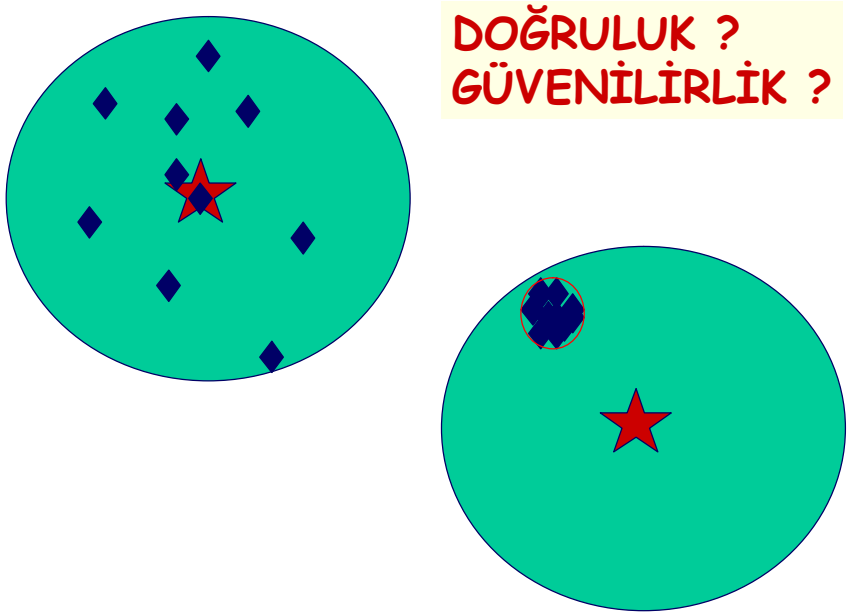


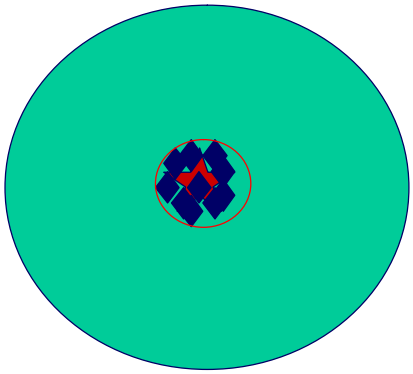
STANDART SAPMA (SD) σ
("Standard Deviation")
Değişkenliğin (dağılımın) ölçümü =
Ölçülen populasyondaki değişikliğin pozitif kare kökü (+/-)
SD= √ [Σ(a-b)2/n-1)]

SD = 12.7

DEĞİŞKENLİK KATSAYISI (CV)
("Coefficient of Variation") (%)
Standart sapmanın ortalamaya oranı

CV = %27





Kantitatif Nükleik Asit Testinin Değerlendirilmesi

- Doğruluk
- Güvenilirlik
- Saptama sınırı (analitik duyarlılık)
- Kantitasyon sınırları (dinamik aralık)
- Özgüllük
- Tipler – alt tipler arası kantitasyon etkinliği

- **Saptama sınırı (Analitik duyarlılık)**

Saptanabilen en düşük konsantrasyon (≥%95)

(100 kopya/ml)

- **Kantitasyon sınırları**

(Dinamik aralık)

Kabul edilebilir doğruluk ve güvenilirlikte saptanan en düşük ve en yüksek konsantrasyonlar

(500 – 10^8kopya/ml)

- **Kantitasyon (Dinamik) Aralık**
  - **Kabul edilebilir doğrulukta miktar belirlediği düzeyler**
    - **İstenen aralık, kullanım amacına, örnek popülasyonuna göre değişebilir.**
    - **Testin en az %95 kez +/-0.5 log kopya/ml sonuç vermesi gerekir.**

Tolerans sınırı

- İki farklı zamanda alınan sonuçlar arasında anlamlı kabul edilen fark

(Biyolojik değişkenlik ile çalışmalar arası değişkenlik toplamı)

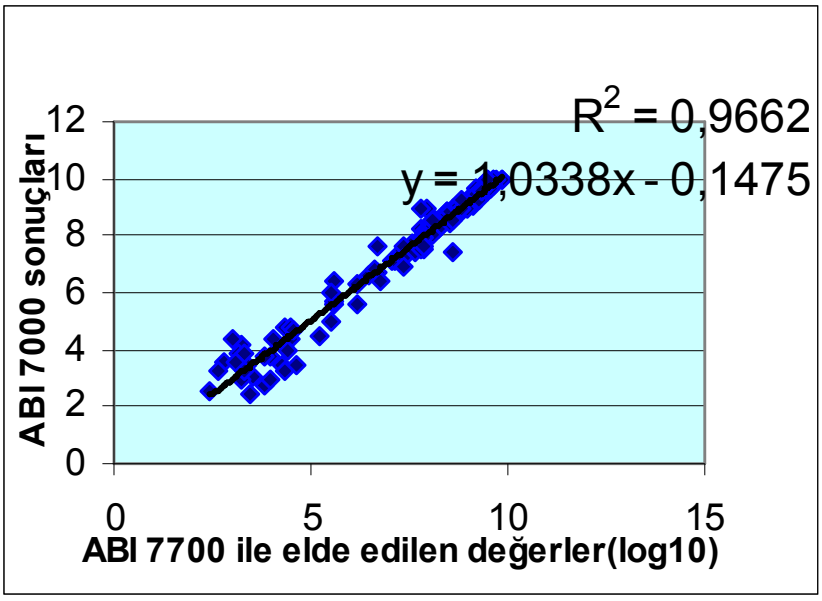
Örn. HIV-1 viral yük testi

Biyolojik değişkenlik: $0.3\log_{10}$

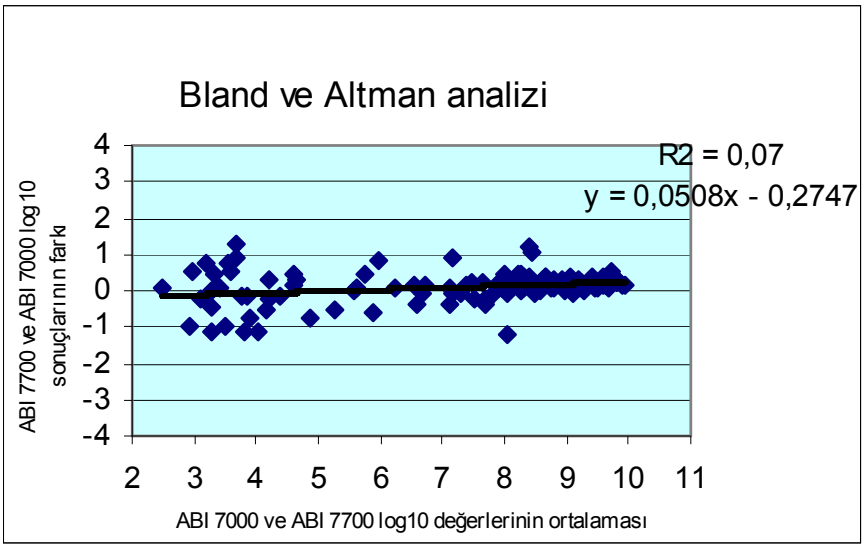
Çalışmaya/teste ait değişkenlik: $0.2\log_{10}$

→ > +/- $0.5\log_{10}$ (anlamlı)

Aynı testin iki farklı cihazdan elde edilen sonuçlarının karşılaştırılması



Aynı testin iki farklı cihazdan elde edilen sonuçlarının karşılaştırılması



Sonuç

- ✓ **Laboratuvar, amacına uygun şekilde standartlarını ve kantitasyon stratejisini seçmeli.**
- ✓ **Kantitatif testin geçerlilik ve doğrulama çalışmaları yapılmalı.**
- ✓ **Standartlar iyi kontrol edilmeli.**
- ✓ **Her çalışmada en az bir bağımsız referans çalışılmalı (iç kalite kontr.).**
- ✓ **Dış Kalite Kontrol programlarına katılmalı.**

ENDEMİK BURKITT LENFOMA: DÜŞMANLARIN İŞBİRLİĞİ

PROF. DR. DÜRDAL US

24 HAZİRAN 2009, 11:30-12:00

ENDEMİK BURKITT LENFOMA: DÜŞMANLARIN İŞBİRLİĞİ

Prof.Dr.Dürdal Us
Hacettepe Üni. Tıp Fak. Mikrobiyoloji ve Klin. Mik. AD. Ankara

INFECTIOUS DISEASE

A deadly partnership

DOI:
10.1038/nrmicro1724

URLs

Plasmodium falciparum
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=genomeprj&cmd=ShowDetailView&TermToSearch=9538

PfEMP1
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=124015261

Endemic Burkitt's lymphoma (eBL), an aggressive B-cell lymphoma, is the most prevalent childhood cancer in equatorial Africa. Malaria and Epstein-Barr virus (EBV) infections are co-factors in the aetiology of this disease, but how do these pathogens interact to cause eBL? Reporting in *PLoS Pathogens*, Chêne and co-workers have identified a protein that is produced by the malaria parasite *Plasmodium falciparum* and that can induce reactivation of EBV from latently infected B cells. Virus reactivation, in turn, might increase the risk of developing eBL.

Infection with EBV during infancy results in a lifelong latent infection of memory B cells, although not all EBV infections result in B-cell tumorigenesis. eBL is restricted to malaria-endemic regions of Africa, and acute malaria infection dramatically increases the levels of circulating EBV. According to earlier research published by the authors, the cysteine-rich inter-domain region 1-α (CIDR1α) of the highly expressed protein *P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) induces proliferation and activation of memory B cells. The latest report details the effects of CIDR1α on the reactivation of latent EBV in B cells.

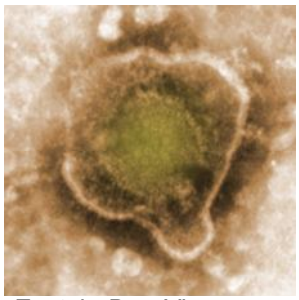
Chêne *et al.* showed that red blood cells infected with *P. falciparum*, which express huge amounts of PfEMP1, and purified CIDR1α both bind to EBV-carrying B cells. Importantly, the binding of CIDR1α to EBV-carrying B cells resulted in a large increase in virus titre that could not be attributed to either increased apoptosis (leading to virus release) or B-cell proliferation. To directly show that CIDR1α stimulates reactivation of EBV from latency to a lytic replication cycle, the authors used a B-cell line that is a reporter for induction of the lytic replication EBV cycle through a fusion of green fluorescent protein (GFP) to an EBV lytic gene. They showed that the addition of GFP expression, with a concomitant increase in released EBV genomes that is consistent with reactivation of the EBV lytic replication cycle. CIDR1α had the same effect on EBV-carrying B cells from the tonsils of both healthy donors and those suffering from eBL.

The detection of high antibody titres to EBV lytic proteins is usually a prelude to the onset of eBL. Elucidating the mechanisms underlying the link between exposure to malaria and increased EBV replication represents an important advance in the understanding of eBL carcinogenesis.

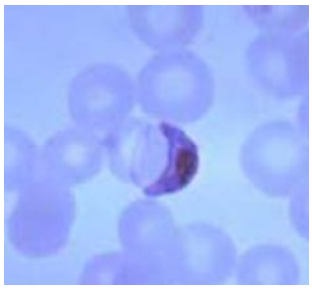
Susan Jones

ORIGINAL RESEARCH PAPER Chêne, A. *et al.* A molecular link between malaria and Epstein-Barr virus reactivation. *PLoS Pathogens* **3**, e80 (2007)

© 2007 Nature Publishing Group



Epstein-Barr Virus



Plasmodium falciparum

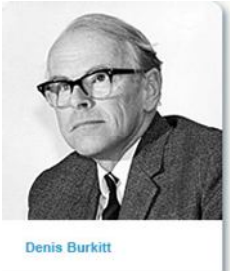
Burkitt lenfoma (BL)

- BL, sıklıkla yüz ve çeneyi tutan malignant bir tümör tipidir.
- Endemik, sporadik ve HIV ile ilişkili formlarda görülebilir.

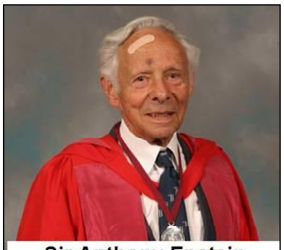




Tarihçe


Denis Burkitt

- BL, ilk kez 1958 yılında Dr. Denis Burkitt tarafından Orta Afrika'daki çocuklarda tanımlanmıştır.
- Dr.Burkitt, aynı zamanda bu hastalığın epidemiyolojik özelliklerine de dikkati çekmiş ve sıtmanın yaygın olduğu tropik iklimli alçak bölgelerde yüksek insidansa sahipken, yağışı az olan yüksek bölgelerde hastalığın mevcut olmadığını vurgulamıştır.
- Dr.Burkitt, hastalığın sınırlı coğrafi dağılım göstermesinin çevresel faktörlere bağlı olabileceğini ve hastalığın patogenezinde malarya ile birlikte sivrisinekle bulaşan bir arbovirusun da rolü olabileceğini ileri sürmüştür.


Sir Anthony Epstein

- BL etiyolojisi, Dr.Anthony Epstein'in Yvonne Barr ve Bert Achong ile birlikte yaptığı çalışmalarla aydınlatılmıştır.
- Bu araştırıcılar, büyük uğraşılar sonucu 1964 yılında BL dokularında herpes grubuna ait yeni bir virusun varlığını göstermişlerdir.
- Bu yeni virus Epstein-Barr virusu (EBV) olarak isimlendirilmiştir.
- Dr.Epstein'in çalışmaları, şaşırtıcı bir diğer bulguyu daha ortaya koymuştur: EBV, daha önceden sanıldığı gibi sadece BL'lı hastalarda sınırlı olmayıp, toplumlarda erişkin popülasyonda son derece yüksek prevalansa (~%95) sahiptir.
- Virusun BL'den başka nazofarengeal karsinoma ile ilişkisinin ve in vitro olarak B lenfositlerini transforme ettiğinin gösterilmesiyle, EBV 1970 yılında ilk insan tümör virusu olarak kabul edilmiştir.

BL alt tipleri ve özellikleri

Characteristics	Endemic	Sporadic	HIV-associated
Geographical distribution	Equatorial Africa*, Papua New Guinea	United States, Europe	Worldwide
EBV-association	>90%	<20%	~30% in Europe and the United States
Incidence rate	1–20/100,000	0.01/100,000	Variable
Age range	2–14 years	All ages	All ages
Tumour site	Extranodal	Lymph nodes	Lymph nodes
c-*myc* translocation	Yes	Yes	Yes
Cofactors	Malaria, EBV	Unknown	HIV infection

*There is some evidence that in Africa all three subtypes can be present. There is not enough known about South American BL to determine whether it is a new subtype of BL.

Rochford R, et al. Nature Reviews Microbiology 2005; 3: 182

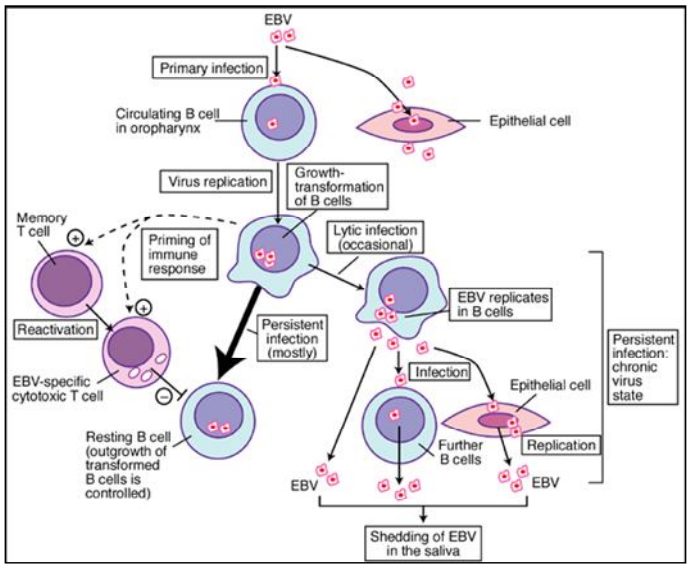
Endemik BL (eBL) epidemiyolojisi

- BL, ekvator Afrika'sında çocukluk çağı kanserlerinin %74'ünü oluşturmaktadır.
- Coğrafi bölge → Orta Afrika, Papua Yeni Gine
- Yaş → Çocukluk çağı (en sık 6-8 yaş)
- Cinsiyet → Erkek çocuklarda 2-5 kez daha sık
- Risk faktörleri ve ko-faktörler
  - Genetik yatkınlık
  - İmmün süpresyon
  - Erken yaşta kazanılan primer EBV enf.
  - Endemik sıtma enf.
  - Endemik HIV enf.
  - Çevresel kofaktörler (iklim, bitki örtüsü, vb)

- Tanımlanmasından bu yana geçen 50 yıl içinde, BL ile EBV arasındaki ilişkinin büyük ölçüde aydınlatılmış olmasına rağmen, moleküler mekanizmalar halen tam olarak anlaşılabilmiş değildir.

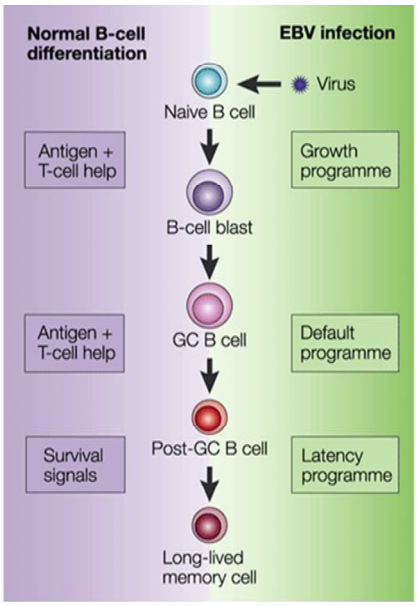


Normal sağlıklı kişilerde EBV enfeksiyonu



Expert Reviews in Molecular Medicine **2001; Cambridge University Press**

EBV persistans programları



Virusun lenfoid dokuya girişi ve naif B hüc.ni enfekte etmesi

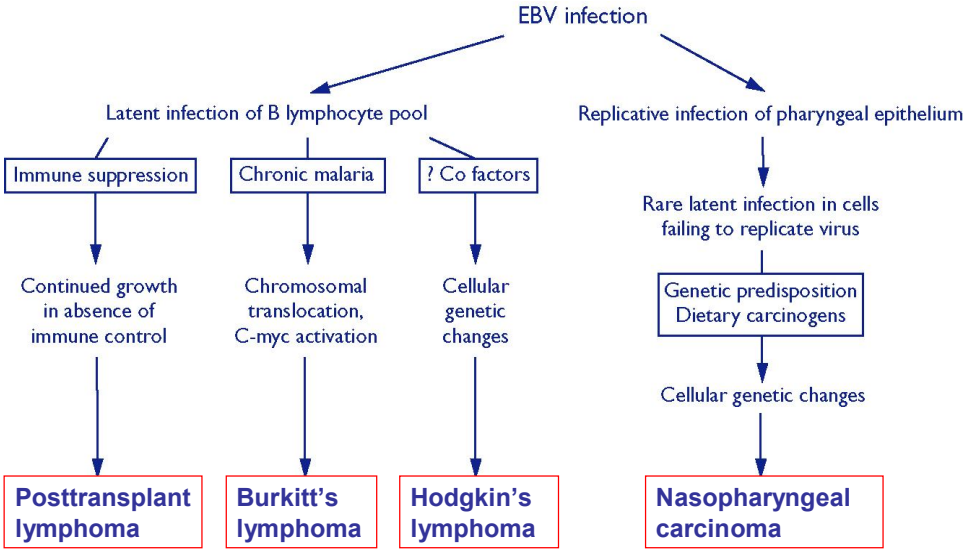
Latentlik III → Naif B hüc.nin aktivasyonu ve proliferasyonu (Tüm EBNA genleri ve LMP genlerinin ekspresyonu)

Latentlik II → Germinal merkezlerde enfekte B hüc.nin bellek hüc.ne farklılaşması (EBNA1 ve LMP genleri ekspresyonu), GC'lerden dinlenen bellek B hüc.i olarak perifere çıkış

Latentlik I → Dinlenen bellek B hüc.nde virusun persistansı (Bu hüc.ler, özgül CD8+ CTL tarafından kontrol altında tutulur). Ancak bu hüc.ler çoğaldıklarında sadece EBNA-1 gen ekspresyonu yapılır. (EBV-pozitif BL hüc.nde de latentlik I programı uygulanmaktadır)

Thorley-Lawson DA. *Nat Rev Immunol 2001;* 1: 75

EBV ile ilişkili kanserler



EBV'e bağlı eBL oluşum mekanizmaları

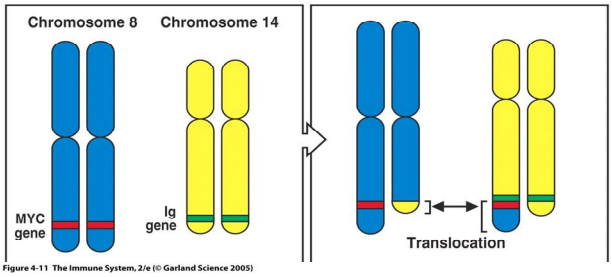
- Virusun immün sistemden başarılı kaçış stratejileri
- Kromozomal translokasyon ile *c-myc* aktivasyonu
- *P.falciparum*'un B hücre proliferasyonu ve aktivasyonuna neden olarak virusun reaktivasyonunu artırması

İmmün sistemden başarılı kaçış

- Doğrudan B lenfositlerinin enfeksiyonu
- Sitokin yanıtının modülasyonu
  - BCRF1 (vIL-10) → Th1 süpresyonu, Th2 aktivasyonu
  - BARF1 → CSF-1 fonksiyonunun blokajı
- MHC sınıf I ve II ekspresyonunun bozulması→ EBNA
- İnterferon yanıtının bozulması → BARF-1
- p53 ve pRb disfonksiyonu → EBNA
- Apoptoz sinyal yolunun inhibisyonu → LMP1
- Diğer

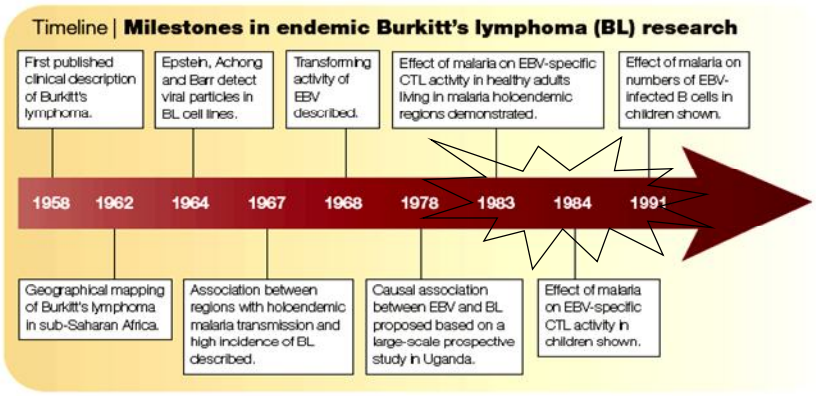
Kromozomal c-myc translokasyonu

- t(8;14) → Ig ağır zincir geninin kontrolü altında aktif olarak transkripte edilir.
- t(2;22) → Ig hafif zincir geni ile birlikte aktif olarak transkripte edilir.
- *myc* translokasyonu GC (germinal center) safhasında olur ve hüc.in proliferasyonu kontrolden çıkar.
- *myc* translokasyonunun neden olduğu proliferasyon, dinlenme haline dönüşmesi gereken bellek B hüc.nin çoğalmaya devam etmesine ve sadece EBNA-1 programı uygulanan BL tümörünün gelişimine yol açar.



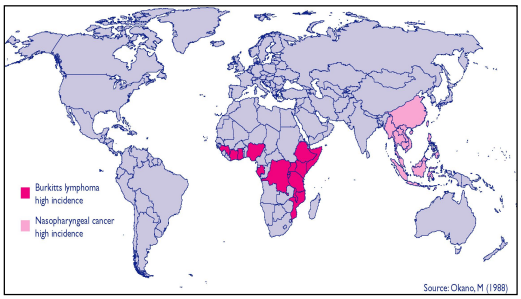
Sıtma – eBL ilişkisi

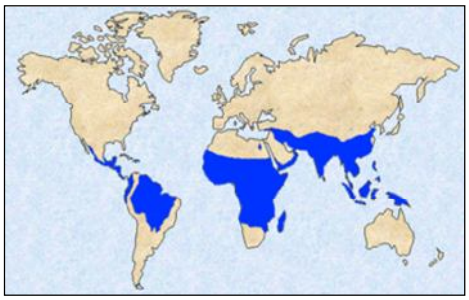
- Dr.Burkitt'in öngörüsü, yani BL patogenezinde bir virus (EBV) ile birlikte sıtmanın sinerjik rol oynadığı hipotezi 1980'li yılların başında şekillenmeye başlamıştır.



Rochford R, et al. *Nat Rev Microbiol 2005;* 3: 182

Endemik BL ve Endemik Sıtma





1: Scand J Infect Dis Suppl. 1982;36:15-23.

Epstein-Barr virus, malaria and Burkitt's lymphoma.

Klein G.

PMID: 6304867 [PubMed - indexed for MEDLINE]

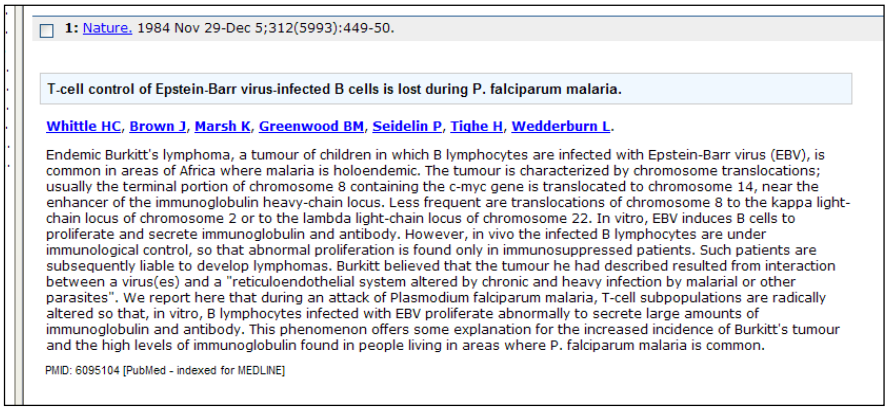
1: IARC Sci Publ. 1985;(60):205-15.

A preliminary report of epidemiological studies of Burkitt's lymphoma, Epstein-Barr virus infection and malaria in North Mara, Tanzania.

Geser A, Brubaker G.

PMID: 2998990 [PubMed - indexed for MEDLINE]

- Whittle HC, et al. → Sıtma sırasında T hücre yanıtının bozulduğu ve virusla enfekte B hücrelerinin olağandışı proliferasyonu ile yüksek düzeyde antikor sentezlediği gösterilmiştir.



1: Nature. 1984 Nov 29-Dec 5;312(5993):449-50.

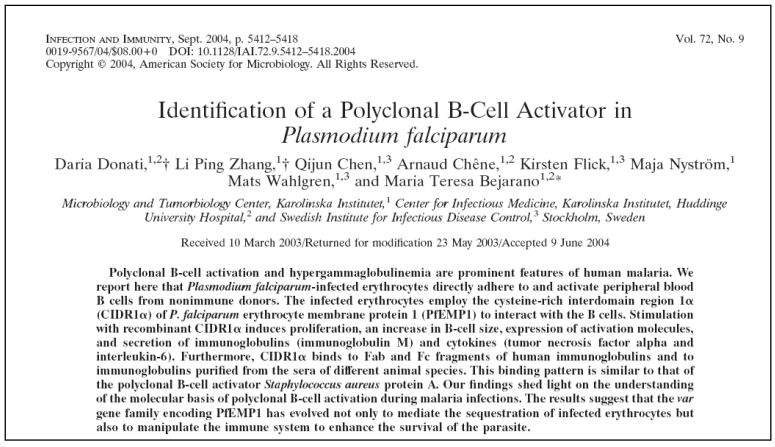
T-cell control of Epstein-Barr virus-infected B cells is lost during P. falciparum malaria.

Whittle HC, Brown J, Marsh K, Greenwood BM, Seidelin P, Tighe H, Wedderburn L.

Endemic Burkitt's lymphoma, a tumour of children in which B lymphocytes are infected with Epstein-Barr virus (EBV), is common in areas of Africa where malaria is holoendemic. The tumour is characterized by chromosome translocations; usually the terminal portion of chromosome 8 containing the c-myc gene is translocated to chromosome 14, near the enhancer of the immunoglobulin heavy-chain locus. Less frequent are translocations of chromosome 8 to the kappa light-chain locus of chromosome 2 or to the lambda light-chain locus of chromosome 22. In vitro, EBV induces B cells to proliferate and secrete immunoglobulin and antibody. However, in vivo the infected B lymphocytes are under immunological control, so that abnormal proliferation is found only in immunosuppressed patients. Such patients are subsequently liable to develop lymphomas. Burkitt believed that the tumour he had described resulted from interaction between a virus(es) and a "reticuloendothelial system altered by chronic and heavy infection by malarial or other parasites". We report here that during an attack of Plasmodium falciparum malaria, T-cell subpopulations are radically altered so that, in vitro, B lymphocytes infected with EBV proliferate abnormally to secrete large amounts of immunoglobulin and antibody. This phenomenon offers some explanation for the increased incidence of Burkitt's tumour and the high levels of immunoglobulin found in people living in areas where P. falciparum malaria is common.

PMID: 6095104 [PubMed - indexed for MEDLINE]

- Donati D, et al. → *P.falciparum* EMP-1 (Erythrocyte Membrane Protein) proteini eksprese eden eritrositlerin periferal kan B hücrelerinin yüzeyine yapışarak poliklonal aktivasyona yol açtığı gösterilmiştir.



INFECTION AND IMMUNITY, Sept. 2004, p. 5412–5418 Vol. 72, No. 9
0019-9567/04/$08.00+0 DOI: 10.1128/IAI.72.9.5412–5418.2004
Copyright © 2004, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Identification of a Polyclonal B-Cell Activator in *Plasmodium falciparum*

Daria Donati,[1,2]† Li Ping Zhang,[1]† Qijun Chen,[1,3] Arnaud Chêne,[1,2] Kirsten Flick,[1,3] Maja Nyström,[1] Mats Wahlgren,[1,3] and Maria Teresa Bejarano[1,2]*

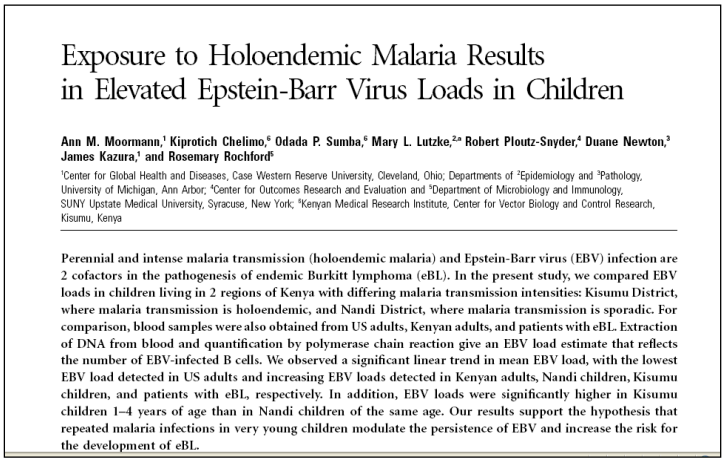
Microbiology and Tumorbiology Center, Karolinska Institutet,[1] Center for Infectious Medicine, Karolinska Institutet, Huddinge University Hospital,[2] and Swedish Institute for Infectious Disease Control,[3] Stockholm, Sweden

Received 10 March 2003/Returned for modification 23 May 2003/Accepted 9 June 2004

Polyclonal B-cell activation and hypergammaglobulinemia are prominent features of human malaria. We report here that *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes directly adhere to and activate peripheral blood B cells from nonimmune donors. The infected erythrocytes employ the cysteine-rich interdomain region 1α (CIDR1α) of *P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) to interact with the B cells. Stimulation with recombinant CIDR1α induces proliferation, an increase in B-cell size, expression of activation molecules, and secretion of immunoglobulins (immunoglobulin M) and cytokines (tumor necrosis factor alpha and interleukin-6). Furthermore, CIDR1α binds to Fab and Fc fragments of human immunoglobulins and to immunoglobulins purified from the sera of different animal species. This binding pattern is similar to that of the polyclonal B-cell activator *Staphylococcus aureus* protein A. Our findings shed light on the understanding of the molecular basis of polyclonal B-cell activation during malaria infections. The results suggest that the *var* gene family encoding PfEMP1 has evolved not only to mediate the sequestration of infected erythrocytes but also to manipulate the immune system to enhance the survival of the parasite.

Infect Immun 2004; 72: 5412

- Moormann AM, et al. → Erken çocukluk döneminde tekrarlayan sıtma enfeksiyonlarının, EBV yükünü artırdığı ve virusun persistans programını modüle ederek BL gelişim riskini yükselttiği saptanmıştır.



Exposure to Holoendemic Malaria Results in Elevated Epstein-Barr Virus Loads in Children

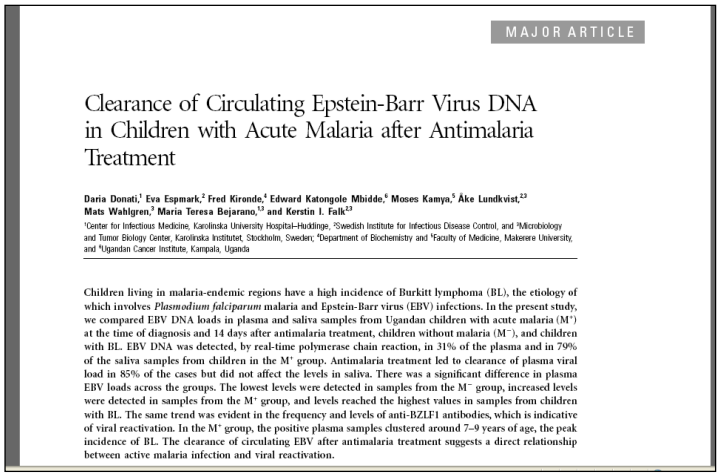
Ann M. Moormann,[1] Kiprotich Chelimo,[6] Odada P. Sumba,[6] Mary L. Lutzke,[2,a] Robert Ploutz-Snyder,[4] Duane Newton,[3] James Kazura,[1] and Rosemary Rochford[5]

[1]Center for Global Health and Diseases, Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio; Departments of [2]Epidemiology and [3]Pathology, University of Michigan, Ann Arbor; [4]Center for Outcomes Research and Evaluation and [5]Department of Microbiology and Immunology, SUNY Upstate Medical University, Syracuse, New York; [6]Kenyan Medical Research Institute, Center for Vector Biology and Control Research, Kisumu, Kenya

Perennial and intense malaria transmission (holoendemic malaria) and Epstein-Barr virus (EBV) infection are 2 cofactors in the pathogenesis of endemic Burkitt lymphoma (eBL). In the present study, we compared EBV loads in children living in 2 regions of Kenya with differing malaria transmission intensities: Kisumu District, where malaria transmission is holoendemic, and Nandi District, where malaria transmission is sporadic. For comparison, blood samples were also obtained from US adults, Kenyan adults, and patients with eBL. Extraction of DNA from blood and quantification by polymerase chain reaction give an EBV load estimate that reflects the number of EBV-infected B cells. We observed a significant linear trend in mean EBV load, with the lowest EBV load detected in US adults and increasing EBV loads detected in Kenyan adults, Nandi children, Kisumu children, and patients with eBL, respectively. In addition, EBV loads were significantly higher in Kisumu children 1–4 years of age than in Nandi children of the same age. Our results support the hypothesis that repeated malaria infections in very young children modulate the persistence of EBV and increase the risk for the development of eBL.

J Infect Dis 2005; 191:1233

- Donati D, et al. → Malaryanın endemik olduğu bölgelerde yaşayan çocuklarda EBV yükünün arttığı ve akut malarya sırasında yüksek olan viral DNA düzeyinin anti-malaryal tedaviden sonra temizlendiği gösterilmiştir.



MAJOR ARTICLE

Clearance of Circulating Epstein-Barr Virus DNA in Children with Acute Malaria after Antimalaria Treatment

Daria Donati,[1] Eva Espmark,[2] Fred Kironde,[4] Edward Katongole Mbidde,[6] Moses Kamya,[5] Åke Lundkvist,[2,3] Mats Wahlgren,[3] Maria Teresa Bejarano,[1,3] and Kerstin I. Falk[2,3]

[1]Center for Infectious Medicine, Karolinska University Hospital–Huddinge, [2]Swedish Institute for Infectious Disease Control, and [3]Microbiology and Tumor Biology Center, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden; [4]Department of Biochemistry and [5]Faculty of Medicine, Makerere University, and [6]Ugandan Cancer Institute, Kampala, Uganda

Children living in malaria-endemic regions have a high incidence of Burkitt lymphoma (BL), the etiology of which involves *Plasmodium falciparum* malaria and Epstein-Barr virus (EBV) infections. In the present study, we compared EBV DNA loads in plasma and saliva samples from Ugandan children with acute malaria (M^+) at the time of diagnosis and 14 days after antimalaria treatment, children without malaria (M^-), and children with BL. EBV DNA was detected, by real-time polymerase chain reaction, in 31% of the plasma and in 79% of the saliva samples from children in the M^+ group. Antimalaria treatment led to clearance of plasma viral load in 85% of the cases but did not affect the levels in saliva. There was a significant difference in plasma EBV loads across the groups. The lowest levels were detected in samples from the M^- group, increased levels were detected in samples from the M^+ group, and levels reached the highest values in samples from children with BL. The same trend was evident in the frequency and levels of anti-BZLF1 antibodies, which is indicative of viral reactivation. In the M^+ group, the positive plasma samples clustered around 7–9 years of age, the peak incidence of BL. The clearance of circulating EBV after antimalaria treatment suggests a direct relationship between active malaria infection and viral reactivation.

J Infect Dis 2006; 193:971–7

- Chene A, et al. → Sıtma ve EBV reaktivasyonu arasındaki ilişki "moleküler düzeyde" gösterilmiştir.

OPEN ACCESS Freely available online PLoS PATHOGENS

A Molecular Link between Malaria and Epstein–Barr Virus Reactivation

Arnaud Chêne[1,2,3☯], Daria Donati[1☯*], André Ortlieb Guerreiro-Cacais[2¤], Victor Levitsky[2¤], Qijun Chen[3], Kerstin I. Falk[2,3], Jackson Orem[4], Fred Kironde[5], Mats Wahlgren[2,3], Maria Teresa Bejarano[1,2]

1 Center for Infectious Medicine, Department of Medicine, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden, 2 Department of Microbiology, Tumor and Cell Biology, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden, 3 Swedish Institute for Infectious Disease Control, Stockholm, Sweden, 4 Uganda Cancer Institute, Kampala, Uganda, 5 Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Makerere University, Kampala, Uganda

PLoS Pathogens 2007; 3 (6):e80

P.falciparum Eritrosit Membran Proteini 1 (*PfEMP-1*)

- Enfekte eritrositlerin yüzeyinde eksprese edilen bir parazit antijenidir.
- Parazitin virülans faktörü olarak kabul edilmektedir.

Molecules in focus

PfEMP1: An antigen that plays a key role in the pathogenicity and immune evasion of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*

Noa D. Pasternak, Ron Dzikowski*

Department of Microbiology and Molecular Genetics, The Institute for Medical Research Israel - Canada, The Kuvin Center for the Study of Infectious and Tropical Diseases, The Hebrew University-Hadassah Medical School, Jerusalem 91120, Israel

ARTICLE INFO

Article history:
Received 7 December 2008
Received in revised form 14 December 2008
Accepted 16 December 2008
Available online 25 December 2008

Keywords:
Malaria
Plasmodium falciparum
PfEMP1
Antigenic variation
Virulence

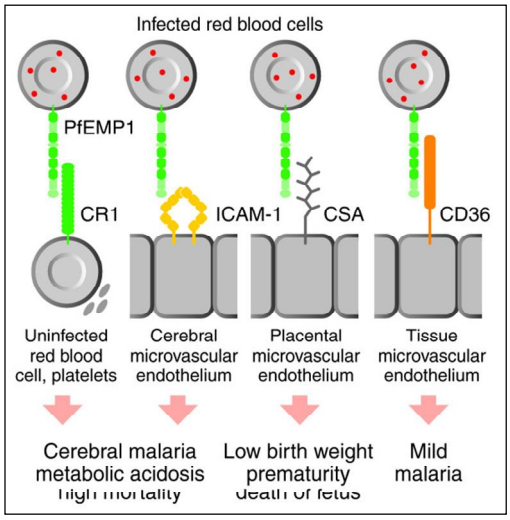
ABSTRACT

The deadliest form of human malaria is caused by the protozoan parasite *Plasmodium falciparum* affecting millions worldwide every year. *P. falciparum* virulence is attributed to its ability to evade the human immune system by modifying infected host red blood cells to adhere to the vascular endothelium and to undergo antigenic variation. The main antigenic ligands responsible for both cytoadherence and antigenic variation are members of the *P. falciparum* Erythrocyte Membrane Protein-1 (PfEMP1) family. These polymorphic proteins are encoded by a multi-copy gene family called *var*. Each individual parasite expresses a single *var* gene at a time, maintaining the remaining ~60 *var* genes found in its genome in a transcriptionally silent state. As the antibody response against the single expressed PfEMP1 develops, small sub-populations of parasites switch expression to alternative forms of PfEMP1 and re-establish the infection. Therefore, PfEMP1 is considered a key player in the pathogenicity of *P. falciparum*.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

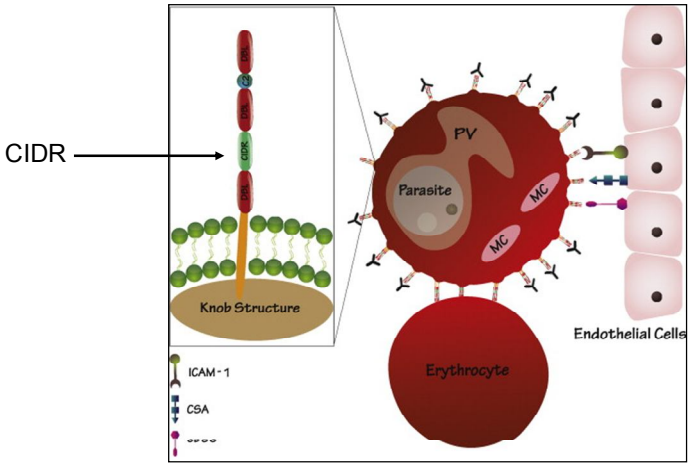
Int J Biochem Cell Biol 2009; 41: 1463

- ***PfEMP-1*** **birçok moleküle adezyon özelliğine sahiptir.**



Penman&Gupta, *J Biol* 2008;7:22

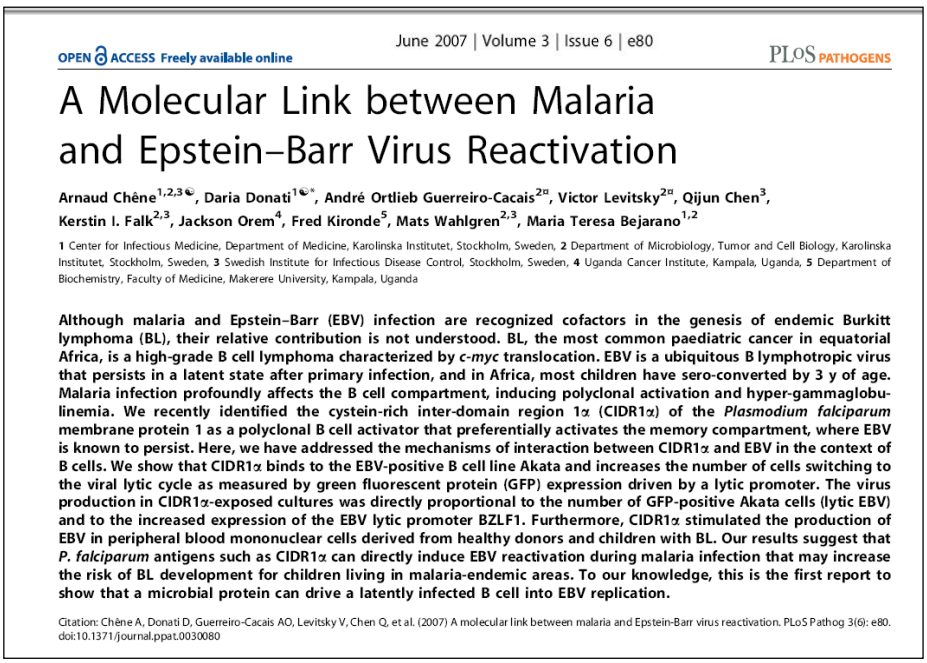
- ***PfEMP-1***, **enfekte eritrositlerin otoaglütinasyonu, sağlam eritrositlere yapışması ve çeşitli organlarda endotel hücreler üzerindeki adezyon moleküllerine tutunmasından sorumludur.**
- ***P.fEMP-1*** **proteininin sisteinden zengin kangalı olan CIDR1-α bölgesi süperantijen özelliğine sahiptir.**



PV, parasitophorous vacuole; MC, Maurer's cleft

- CIDR1-α (cysteine-rich inter-domain region) bölgesi, bellek B hücrelerini seçici olarak aktive etmektedir.
- CIDR1-α çeşitli immünolojik yolakları aktive etmekte ve ayrıca B hücrelerini apoptozdan korumaktadır.
- Parazit ile enfekte eritrositlerin ya da saf olarak CIDR molekülünün EBV ile enfekte bellek B hücrelerine bağlanması, bu hücrelerin proliferasyon ve aktivasyonunu artırarak virusun latent dönemden litik döneme geçmesini indüklemektedir.

* Chene A, et al. PLoS Pathog 2007; 3:e80.
* Donati D, et al. J Immunol 2006; 177: 3035



OPEN ACCESS Freely available online

June 2007 | Volume 3 | Issue 6 | e80

PLoS PATHOGENS

A Molecular Link between Malaria and Epstein–Barr Virus Reactivation

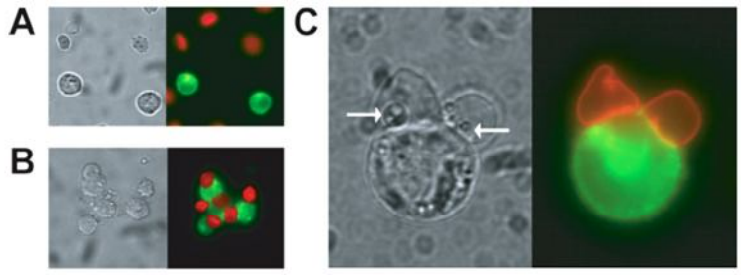
Arnaud Chêne[1,2,3☯], Daria Donati[1☯*], André Ortlieb Guerreiro-Cacais[2¤], Victor Levitsky[2¤], Qijun Chen[3], Kerstin I. Falk[2,3], Jackson Orem[4], Fred Kironde[5], Mats Wahlgren[2,3], Maria Teresa Bejarano[1,2]

1 Center for Infectious Medicine, Department of Medicine, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden, **2** Department of Microbiology, Tumor and Cell Biology, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden, **3** Swedish Institute for Infectious Disease Control, Stockholm, Sweden, **4** Uganda Cancer Institute, Kampala, Uganda, **5** Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Makerere University, Kampala, Uganda

Although malaria and Epstein–Barr (EBV) infection are recognized cofactors in the genesis of endemic Burkitt lymphoma (BL), their relative contribution is not understood. BL, the most common paediatric cancer in equatorial Africa, is a high-grade B cell lymphoma characterized by *c-myc* translocation. EBV is a ubiquitous B lymphotropic virus that persists in a latent state after primary infection, and in Africa, most children have sero-converted by 3 y of age. Malaria infection profoundly affects the B cell compartment, inducing polyclonal activation and hyper-gammaglobulinemia. We recently identified the cystein-rich inter-domain region 1α (CIDR1α) of the *Plasmodium falciparum* membrane protein 1 as a polyclonal B cell activator that preferentially activates the memory compartment, where EBV is known to persist. Here, we have addressed the mechanisms of interaction between CIDR1α and EBV in the context of B cells. We show that CIDR1α binds to the EBV-positive B cell line Akata and increases the number of cells switching to the viral lytic cycle as measured by green fluorescent protein (GFP) expression driven by a lytic promoter. The virus production in CIDR1α-exposed cultures was directly proportional to the number of GFP-positive Akata cells (lytic EBV) and to the increased expression of the EBV lytic promoter BZLF1. Furthermore, CIDR1α stimulated the production of EBV in peripheral blood mononuclear cells derived from healthy donors and children with BL. Our results suggest that *P. falciparum* antigens such as CIDR1α can directly induce EBV reactivation during malaria infection that may increase the risk of BL development for children living in malaria-endemic areas. To our knowledge, this is the first report to show that a microbial protein can drive a latently infected B cell into EBV replication.

Citation: Chêne A, Donati D, Guerreiro-Cacais AO, Levitsky V, Chen Q, et al. (2007) A molecular link between malaria and Epstein-Barr virus reactivation. PLoS Pathog 3(6): e80. doi:10.1371/journal.ppat.0030080

P.falciparum ile enfekte eritrositler EBV pozitif B hücrelerine bağlanmaktadır.



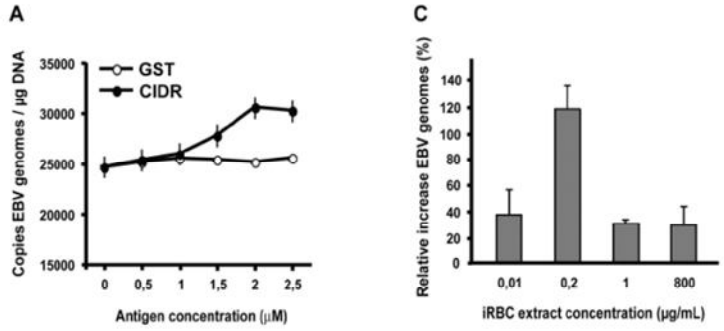
A: Akata hücreleri (yeşil) ve normal eritrositlerin (kırmızı) ko-inkübasyonu (bağlanma yok)

B: Akata hücreleri ve parazit ile enfekte eritrositlerin ko-inkübasyonu (bağlanma var)

C: Akata hücrelerine bağlanan enfekte eritrositlerin büyütülmüş resmi (Beyaz oklar parazitin eritrosit içindeki yerleşimini göstermektedir)

- Sol taraflardaki resimler faz kontrast mikroskobu ile alınmıştır.
- Akata hücreleri, EBV pozitif insan Burkitt lenfoma hücre serisidir.

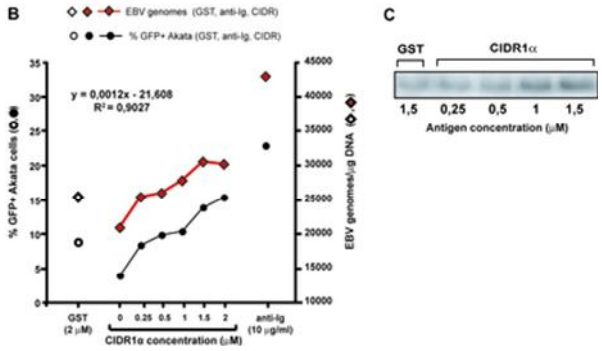
Akata hücrelerinin saflaştırılmış CIDR1α ve enfekte eritrositler (iRBC) ile uyarımı, EBV-DNA yükünün anlamlı düzeyde artışına yol açmaktadır.



A) Akata cells were cultured in medium alone (referred to as Ag concentration 0) with GST (white circles) or with CIDR1α (black circles) at protein concentrations ranging from 0,5 to 2,5 µM in the presence or absence of zVAD. After 48 h of incubation, the viral genome copy number was determined by real-time PCR. Results from a representative experiment (out of four independent experiments) are expressed as numbers of EBV genome copies per µg of total DNA.

C) Akata cells were cultured with increasing concentrations of crude extracts from iRBCs and RBCs. After 48 h of incubation, the viral genome copy number was determined by real-time PCR. Results from one representative experiment (out of three performed) are expressed as percentage of relative increase in EBV copy numbers in cultures stimulated with iRBCs versus cultures stimulated with RBC extracts.

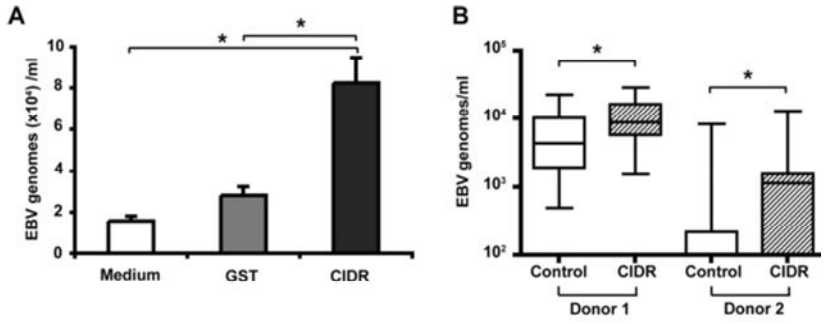
CIDR1 tarafından indüklenen EBV-DNA artışı, litik döngünün indüksiyonunu yansıtmaktadır.



B) Akata-GFP cells were cultured with GST (2 µM), with CIDR1α (0–2 µM), and with anti-Ig (10 µg/mL). After 48 h of incubation, the proportion of GFP-positive cells was quantified by FACS analysis (circles), and the EBV DNA load was assessed by real-time PCR (diamonds). The left *y*-axis denotes the proportion of Akata-GFP–positive cells in lytic cycle, the right *y*-axis denotes the number of EBV genomes. Controls included GST-stimulated (empty diamonds/circles) and anti-Ig–stimulated cells (filled diamonds/circles). Data show the mean of three independent experiments.

C) Akata cells up-regulate BZLF1 upon stimulation with CIDR1α. Akata-GFP cells were cultured with GST (1,5 µM) or with CIDR1α (0,25–1,5 µM). After 48 h of incubation, the expression of BZLF1 was analyzed by Western blot. Increased BZLF1 expression in CIDR1α stimulated samples was confirmed by relative quantitative analysis with Quantity One software (Bio-Rad).

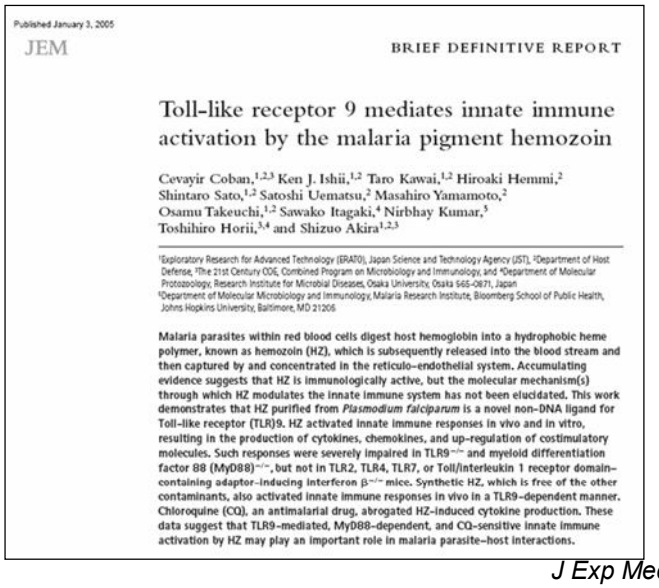
EBV seropozitif donörlerden alınan B hücrelerinin CIDR1 ile uyarımı viral kopya sayısını artırmaktadır.



A) Tonsil B cells were cultured in medium alone (white bar), with GST (1 µM) (light grey bar), and with CIDR1α (1 µM) (dark grey bar). After 48 h of incubation, the viral genome copy number in the cultures was determined by real-time PCR. *, $p = 0,04$.

B) PBMCs from two EBV-positive healthy donors were cultured with GST (1 µM) (white bars) and with CIDR1α (1 µM) (dashed bars). After 48 h of incubation, the viral genome copy number in the cultures was determined by real-time PCR. Data are expressed as EBV copies/mL. Vertical bars depict median values, with 25th and 75th percentile values represented by the bottom and top edges of the bar. Each bar shows the EBV load from one patient measured in multiple replicates and in three independent experiments. *, *p*Donor1 = 0,04; *, *p*Donor2 = 0,001.

*P.falciparum'*un pigmenti hemozoin, TLR9 üzerinden doğal immün aktivasyon yapmaktadır.



Published January 3, 2005
JEM

BRIEF DEFINITIVE REPORT

Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin

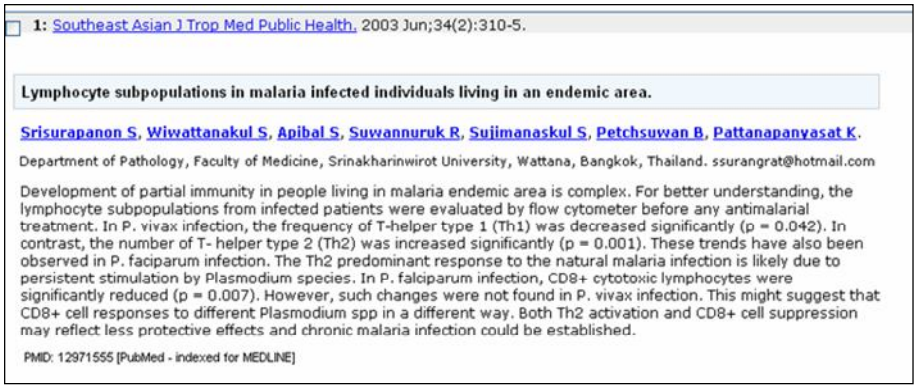
Cevayir Coban,[1,2,3] Ken J. Ishii,[1,2] Taro Kawai,[1,2] Hiroaki Hemmi,[2] Shintaro Sato,[1,2] Satoshi Uematsu,[2] Masahiro Yamamoto,[2] Osamu Takeuchi,[1,2] Sawako Itagaki,[4] Nirbhay Kumar,[5] Toshihiro Horii,[3,4] and Shizuo Akira[1,2,3]

[1]Exploratory Research for Advanced Technology (ERATO), Japan Science and Technology Agency (JST), [2]Department of Host Defense, [3]The 21st Century COE, Combined Program on Microbiology and Immunology, and [4]Department of Molecular Protozoology, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Osaka 565-0871, Japan
[5]Department of Molecular Microbiology and Immunology, Malaria Research Institute, Bloomberg School of Public Health, Johns Hopkins University, Baltimore, MD 21205

Malaria parasites within red blood cells digest host hemoglobin into a hydrophobic heme polymer, known as hemozoin (HZ), which is subsequently released into the blood stream and then captured by and concentrated in the reticulo–endothelial system. Accumulating evidence suggests that HZ is immunologically active, but the molecular mechanism(s) through which HZ modulates the innate immune system has not been elucidated. This work demonstrates that HZ purified from *Plasmodium falciparum* is a novel non–DNA ligand for Toll–like receptor (TLR)9. HZ activated innate immune responses in vivo and in vitro, resulting in the production of cytokines, chemokines, and up–regulation of costimulatory molecules. Such responses were severely impaired in TLR9$^{-/-}$ and myeloid differentiation factor 88 (MyD88)$^{-/-}$, but not in TLR2, TLR4, TLR7, or Toll/interleukin 1 receptor domain–containing adaptor–inducing interferon β$^{-/-}$ mice. Synthetic HZ, which is free of the other contaminants, also activated innate immune responses in vivo in a TLR9–dependent manner. Chloroquine (CQ), an antimalarial drug, abrogated HZ–induced cytokine production. These data suggest that TLR9–mediated, MyD88–dependent, and CQ–sensitive innate immune activation by HZ may play an important role in malaria parasite–host interactions.

J Exp Med 2005; 201:19

Kronik stimülasyon nedeniyle endemik sıtmada predominant olarak Th2 yanıtı ortaya çıkmakta, CD8+ T hücre yanıtı baskılanmaktadır.



1: Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2003 Jun;34(2):310-5.

Lymphocyte subpopulations in malaria infected individuals living in an endemic area.

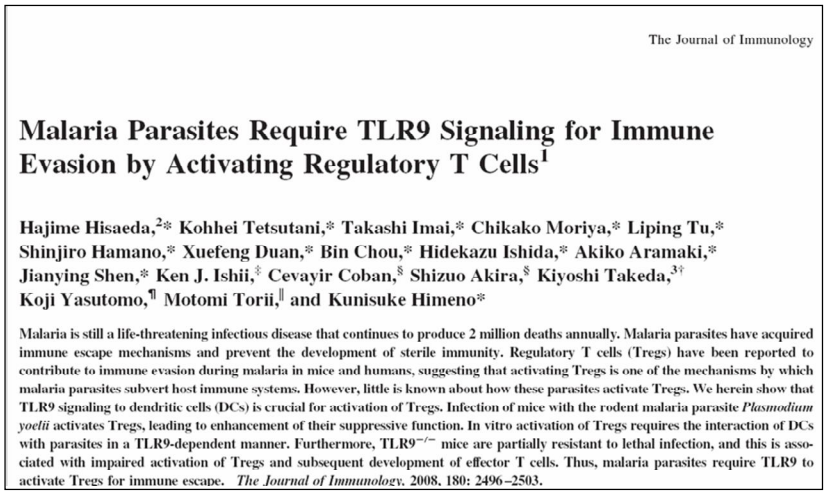
Srisurapanon S, Wiwattanakul S, Apibal S, Suwannuruk R, Sujimanaskul S, Petchsuwan B, Pattanapanyasat K.

Department of Pathology, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University, Wattana, Bangkok, Thailand. ssurangrat@hotmail.com

Development of partial immunity in people living in malaria endemic area is complex. For better understanding, the lymphocyte subpopulations from infected patients were evaluated by flow cytometer before any antimalarial treatment. In P. vivax infection, the frequency of T-helper type 1 (Th1) was decreased significantly (p = 0.042). In contrast, the number of T- helper type 2 (Th2) was increased significantly (p = 0.001). These trends have also been observed in P. faciparum infection. The Th2 predominant response to the natural malaria infection is likely due to persistent stimulation by Plasmodium species. In P. falciparum infection, CD8+ cytotoxic lymphocytes were significantly reduced (p = 0.007). However, such changes were not found in P. vivax infection. This might suggest that CD8+ cell responses to different Plasmodium spp in a different way. Both Th2 activation and CD8+ cell suppression may reflect less protective effects and chronic malaria infection could be established.

PMID: 12971555 [PubMed - indexed for MEDLINE]

Plasmodium spp. TLR9 üzerinden Treg aktivasyonu yapmaktadır.



The Journal of Immunology

Malaria Parasites Require TLR9 Signaling for Immune Evasion by Activating Regulatory T Cells[1]

Hajime Hisaeda,[2]* Kohhei Tetsutani,* Takashi Imai,* Chikako Moriya,* Liping Tu,* Shinjiro Hamano,* Xuefeng Duan,* Bin Chou,* Hidekazu Ishida,* Akiko Aramaki,* Jianying Shen,* Ken J. Ishii,† Cevayir Coban,§ Shizuo Akira,§ Kiyoshi Takeda,[3]† Koji Yasutomo,¶ Motomi Torii,‖ and Kunisuke Himeno*

Malaria is still a life-threatening infectious disease that continues to produce 2 million deaths annually. Malaria parasites have acquired immune escape mechanisms and prevent the development of sterile immunity. Regulatory T cells (Tregs) have been reported to contribute to immune evasion during malaria in mice and humans, suggesting that activating Tregs is one of the mechanisms by which malaria parasites subvert host immune systems. However, little is known about how these parasites activate Tregs. We herein show that TLR9 signaling to dendritic cells (DCs) is crucial for activation of Tregs. Infection of mice with the rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii* activates Tregs, leading to enhancement of their suppressive function. In vitro activation of Tregs requires the interaction of DCs with parasites in a TLR9-dependent manner. Furthermore, TLR9$^{-/-}$ mice are partially resistant to lethal infection, and this is associated with impaired activation of Tregs and subsequent development of effector T cells. Thus, malaria parasites require TLR9 to activate Tregs for immune escape. *The Journal of Immunology*, 2008, 180: 2496–2503.

J Immunol 2008; 180:2496

P.falciparum – EBV işbirliği mekanizmaları: Özet

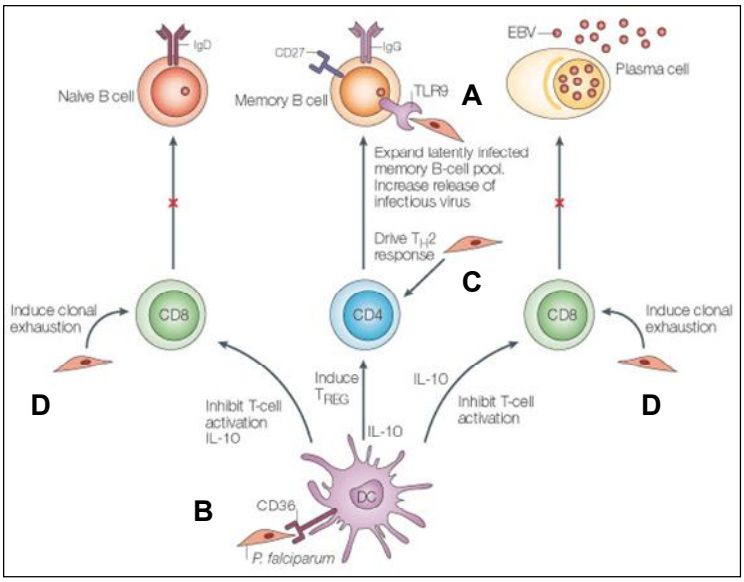
A) *P.falciparum*, yüzeyinde TLR (Toll-like receptor)-9 eksprese eden EBV ile enfekte bellek B hücrelerini aktive eder.Bunun sonunda enfekte bellek B hücre havuzu genişler ve/veya bellek B hüc.nin plazma hüc.ne farklılaşması uyarılır ve enfeksiyöz virusun salınması gerçekleşir. (Şekil 1)

B) *P.falciparum* PfEMP1 proteini dendritik hücrelerin yüzeyindeki CD36 reseptörüne bağlanır, IL-10 sentezi indüklenir. Bunun sonunda EBV'e özgül CD8+ CTL yanıtı baskılanır ve/veya regülatör CD4+ T hücre (TREG) indüksiyonu olur. (Şekil 1)

C) *P.falciparum*'a karşı immün yanıt, dominant Th2 yanıtı şeklinde olabilir. Th2 yanıtının, EBV ile enfekte bellek B hücrelerinden kaynaklanan BL klonları üzerine etkisi daha azdır. (Şekil 1)

D) Çocukluk döneminde tekrarlayan *P.falciparum* enfeksiyonları, "klonal tüketim" sonucu EBV'e özgül CD8+ CTL yanıtının kaybolmasına yol açar. (Şekil 1)

Şekil 1: *P.falciparum* – EBV işbirliği



Rochford R, et al. *Nat Rev Microbiol* 2005;3:182

Kaynaklar

- Bornkamm GW. Epstein-Barr virus and the pathogenesis of Burkitt's lymphoma: more questions than answers. Int J Cancer 2009; 124: 1745.
- Chene A, et al. A molecular link between malaria and Epstein-Barr virus reactivation. PLoS Pathog. 2007; 3:e80.
- Donati D, et al. Increased B cell survival and preferential activation of the memory compartment by a malaria polyclonal B cell activator. J Immunol 2006; 177: 3035
- Jones S. Infectious disease: a deadly partnership. *Nat Rev Microbiol* 2007; 5: 568
- Klein E, Kis LL, Klein G. Epstein–Barr virus infection in humans: from harmless to life endangering virus–lymphocyte interactions. *Oncogene* 2007; 26: 1297-1305.
- Rochford R, Cannon MJ, Moormann AM. Endemic Burkitt's lymphoma: a polymicrobial disease? Nature Reviews Microbiology 2005; 3: 182-187
- Thorley-Lawson DA, Allday MJ. The curious case of the tumour virus: 50 years of Burkitt's lymphoma. Nat Rev Microbiol 2008; 6: 913.

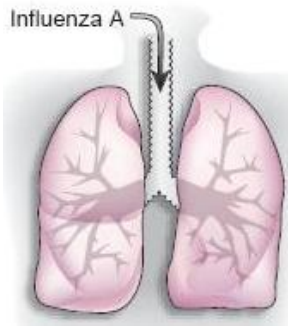
ATQ Biyoteknoloji

ÖZMEN A.Ş. / Euroimmun Türkiye

GLAXO SMITH KLINE

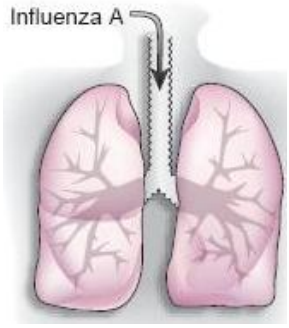
KATKILARI İÇİN TEŞEKKÜR EDERİZ …

Influenza Enfeksiyonlarında İmmünopatogenez



Prof. Dr. Selim Badur

Influenza Enfeksiyonlarında İmmünopatogenez



Prof. Dr. Selim Badur

20. Yüzyılın GRİP Pandemileri







1918: İspanyol gribi

20-40 milyon ölüm

A(H1N1)

1957: Asya gribi

1-4 milyon ölüm

A(H2N2)

1968: Hong Kong gribi

1-4 milyon ölüm

A(H3N2)

Bu insanlar neden öldü?

- **Sorumlu: Pandemi etkeni**
  - Virülansı yüksek
  - Viral pnömoni
  - Etkenin yol açtığı doğal enfeksiyon
- **Ancak bazı gözlemler:**
  - Grip insidansı artarken, invaziv pnömokok ve meningokok enfeksiyonları da artıyor
  - Grip = septisemi ve meninjit için kofaktör
  - Influenza virüslerinin fizyopatolojik etkileri, koenfeksiyon etkenlerinin ***davranışlarını*** değişime uğratıyor

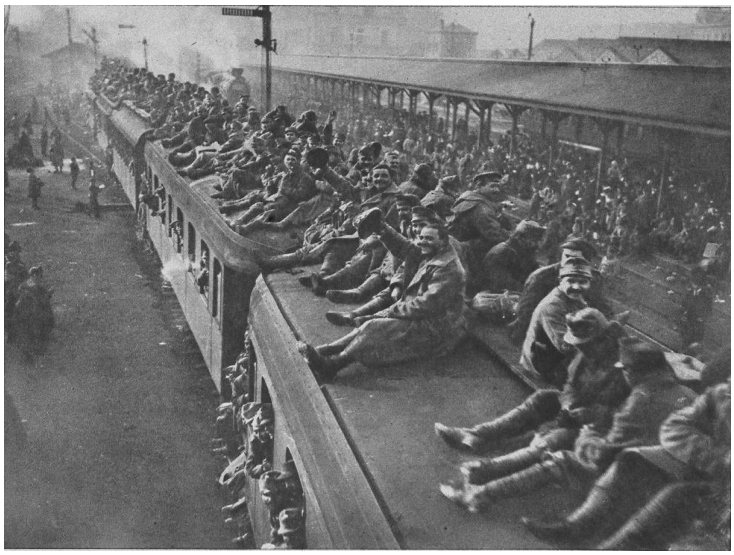


Figure 2: Faces of "influenzo-pneumonic septicaemia"

A- "facial colour is farnkly red, patient may not appear ill, half-closed appearance of the eyes"
B- "cyanosis -colour of the lips and ears-, relative pallor of the face; patient may yet live for 12 h or more"
C- "the heliotrope cyanosis"

Abrahams A et al, Lancet 1919;1: 1

ABD'de askerler arasında 1918 grip pandemisi...



"...the influenza paves the way for the pneumonia, if it does not actually produce it"

- 1941: ABD-Boston'da stafilokok/pnömokok pnömoni olgularının % 41-78'inde Influenza A antikorları
- 1957: Asya gribi sırasında ABD'de hastaneye kaldırılan/ölen olgular da S. pneumoniae, S.aureus, H.influenzae pnömonisi
- 1968: Hong Kong gribi: S.aureus pnömonisi-Influenza birlikteliği.

(Grip "predispozan" faktör !)





Tüm bu tarihsel gözlem/bulguların sonuçları

1- Yıllar boyunca çeşitli ülkelerden Influenza ve sekonder pnömoni olguları bildirilmiş

2- Influenza ve toksik şok sendromu birlikteliği tanımlanmış

3- Influenza ve meningokok birlikteliği kanıtlanmış

4- Influenza tablosunun, solunum sisteminde kolonize olmuş/koenfeksiyon etkeni olarak bulunan diğer bakteri veya virüslerin bulaşını arttırdığı saptanmış...

Emerging Infectious Diseases • www.cdc.gov/eid • Vol. 14, No. 8, August 2008

Deaths from Bacterial Pneumonia during 1918–19 Influenza Pandemic

John F. Brundage* and G. Dennis Shanks†

ing influenza virus infections. A modified influenza pandemic plan might include the following components: 1) Before a pandemic, expand indications for and decrease barriers to receipt of vaccination against *S. pneumoniae* (*36–38,40*). 2) During a pandemic, in communities not yet affected, universally vaccinate with a safe and effective strain-specific influenza vaccine, if available. 3) During local epidemics, treat all serious clinical cases with an antibacterial agent that is effective against *S. pneumoniae, S. pyogenes, H. influenzae, and S. aureus* (including methicillin-resistant *S. aureus*); isolate patients with clinical cases from other patients and as many others as possible

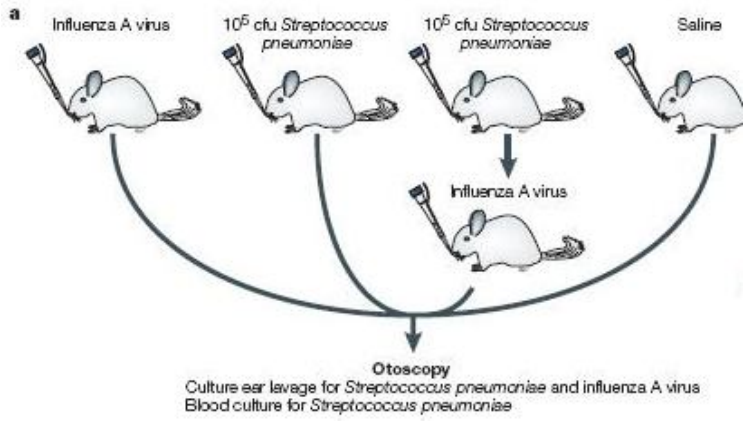
(Am J Prev Med 2006;31(3):252–256)

Cases and Deaths During Influenza Pandemics in the United States

John F. Brundage,

turn, clinical cases—during a pandemic.[12] However, during influenza epidemics in general, large proportions of deaths are caused by secondary bacterial infections (e.g., *Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus, Haemophilus influenzae, Neisseria meningitidis*), which may be preventable or treatable with currently available vaccines and/or antibiotics. Pandemic influenza—related research and

1. Örnek: Çinçilia modelinde deneysel OM



Çinçilaların IN enfeksiyonu:

-Inf A ile inoküle edilenlerin % 4'ü

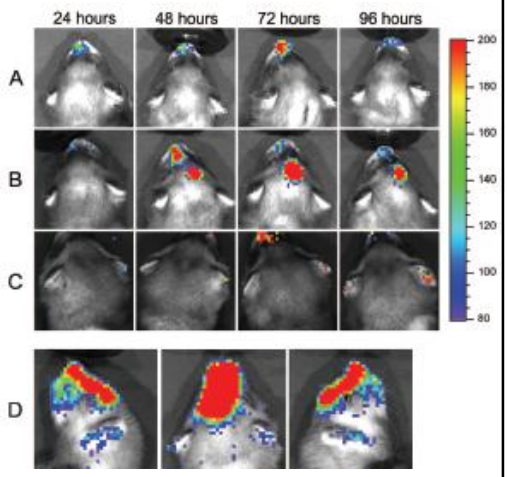
-S.pneumoniae ile inoküle edilenlerin % 21'i

-Koinfekte edilenlerin % 67'si OM geliştiriyor.

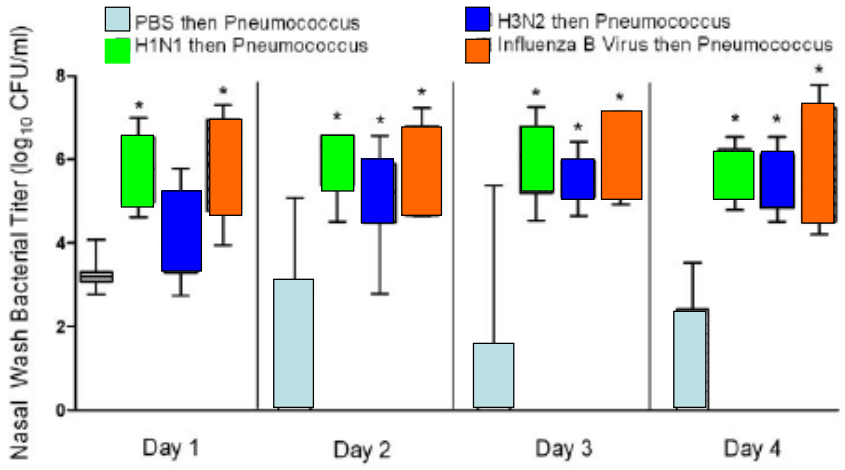
Nature Rev Microbiol 2004; 2: 552

2. Örnek: Gelincik modelinde deneysel OM

- S. pneumoniae, N.meningitidis' e dirençli deney hayvanları, sub-letal Inf.A inokülasyonunun 7. günü, bakterilere duyarlı hale geçiyor
- Gribin neden olduğu inflamasyon sürecinde süperenfeksiyona duyarlılık söz konusu...
- IFN-γ ve IL-1 artışı
- **Influenza A subtiplerinin etkileri farklı...**



Infect Immunity 2006; 74:2562



Infect Immunity 2006; 74:2562

Influenza virüslerinin bakteri kolonizasyonuna etkisi-I

1- Fareye adapte olmuş virülan Influenza suşları (PR8) ile **epitelde hasar oluşturulduktan** sonra, pnömokoklar verildiğinde:
- virüslerin **sitotoksisite gösterdikleri** alanlara bakteriler kolayca adhere olur: akciğerlerde bakteri düzeyi artar
- fareye adapte edilmemiş Influenza suşları ile bu olmuyor.

2- **Virüslere özgü sitotoksik yıkım** önemli mi?
- Influenza dışı bir etkenle, sitotoksik 4-ipomeanol gibi bir kemoterapötik ajan ile aynı deney
- aynı hasar olsa da süper enfeksiyon olmamış!

Influenza virüslerinin bakteri kolonizasyonuna etkisi-II

* Virüsler **Solunum fonksiyonlarında değişim** yaparak da bakterilere ortam hazırlar:
  - müsin tipi salgılarda artış
  - fibrin yığımı
  - inflamatuar hücre yığımı bakterilerin üremesi için iyi bir ortam
  - solunum fonksiyon kapasitesi azalır
  - silier aktivite zayıflar

* Influenza virüsleri **trombosit aktive eden faktör reseptörünün (PAFr)** sayısını arttırır
  -Pnömokokların epitel hücrelerine adhezyonunu arttırır

* **Fibrin / fibrinojen** yığımı bağlanma bölgelerini aktifler

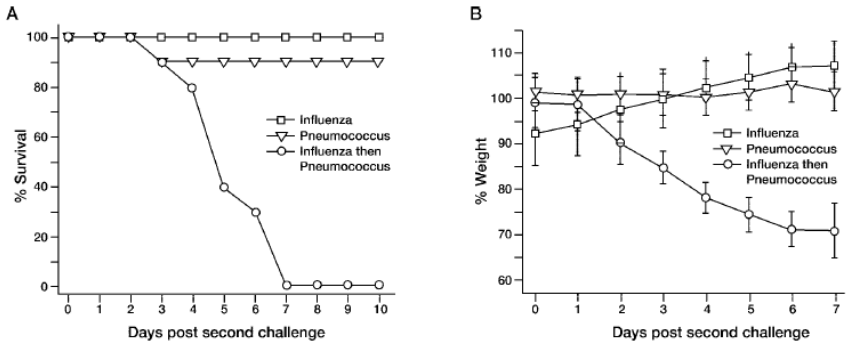
Influenza virüslerinin bakteri kolonizasyonuna etkisi-III

- **Influenza A + S.pneumoniae koenfeksiyon modeli**
  - Bakterilerin nötrofillerce alımı artıyor
  - Nötrofillerin H_2O_2 üretimi - "solunum patlaması" etkinlikleri artıyor
  - **ANCAK**: apoptozis uyarınca daha hızlı yıkıma uğradıklarından, **nötrofillerin yaşam süresi kısalıyor**
  - Artan IL-10, nötrofil disfonksiyonuna yol açar

Nötrofillerin yaşam süresi kısalıyor...

Respiratory viruses predisposing to bacterial infections: role of neuraminidase

VILLE T. PELTOLA, MD, PHD AND JONATHAN A. MCCULLERS, MD



Pediatr Infect Dis J 2004;23: 887

Bu gelişme nötrofillerin apoptoza sürüklenmesi ile...

Influenza A Virus Accelerates Neutrophil Apoptosis and Markedly Potentiates Apoptotic Effects of Bacteria

By Maria Luisa Colamussi, Mitchell R. White, Erika Crouch, and Kevan L. Hartshorn

Table 2. Effects of IAV, *E coli*, or the Combination of IAV and *E coli* on Neutrophil Expression of Fas Antigen

Antibody	Time (h)	Control Buffer	IAV	*E coli*	IAV + *E coli*
CD95	3	36 ± 2	41 ± 3*	39 ± 2	46 ± 4*
Isotype control	3	4.4 ± 0.4	5.6 ± 0.3*	7.3 ± 1*	13.2 ± 2*
CD95	20	26 ± 3	35 ± 5*	33 ± 4*	40 ± 3*†
Isotype control	20	5 ± 1	7 ± 1*	11 ± 2*	16 ± 2*†
Rabbit anti-Fas	20	10 ± 1	16 ± 2*	15 ± 2*	49 ± 15*†
Rabbit anti-Fas + blocker	20	9.4 ± 1	11 ± 2	9 ± 2	26 ± 8

Blood 1999;93: 2395

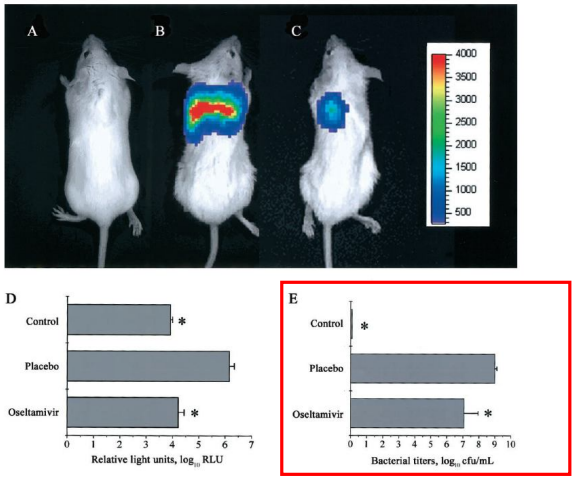
Influenza virüslerinin bakteri kolonizasyonuna etkisi-IV

En önemli virülans faktörü: **Nöraminidaz (NA)**

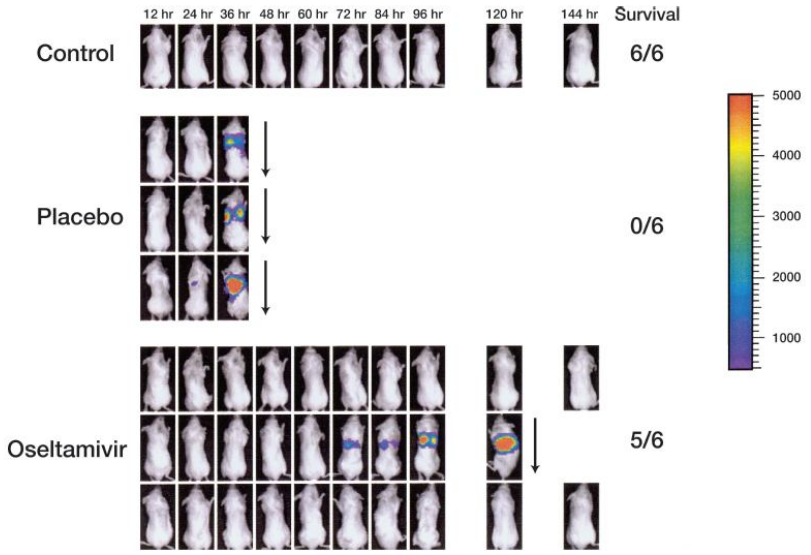
- Sialik asit reseptörlerinin kesilmesi,pnömokoklara reseptör hazırlar
- NA: apoptozisi arttırır
- N2 suşlarının NA aktivitesi yüksek
- NA inhibitörleri S.pneumoniae nin adherans ve invazyonunu baskılıyor

Role of Neuraminidase in Lethal Synergism between Influenza Virus and *Streptococcus pneumoniae*

Jonathan A. McCullers and Kimberly C. Bartmess



JID 2003:187 (15 March)

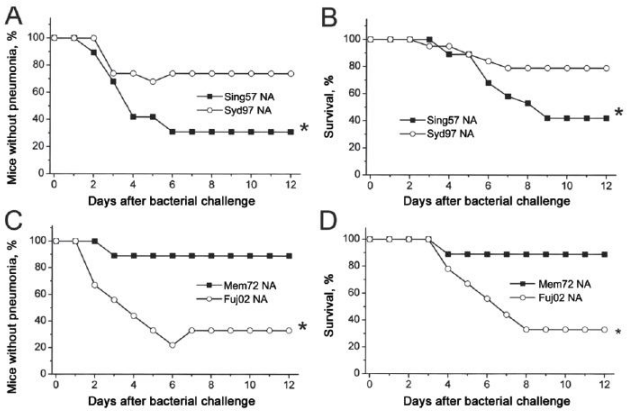


Pediatr Infect Dis J 2004;23: 887

Farklı NA aktivitesine sahip suşların etki farkı-I

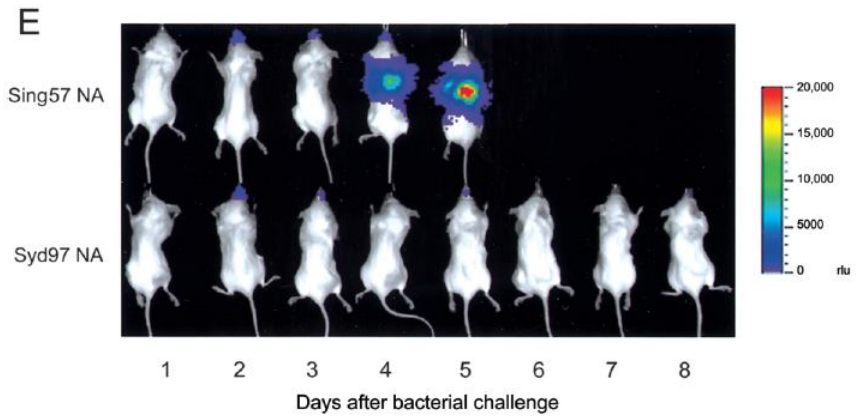
Influenza Virus Neuraminidase Contributes to Secondary Bacterial Pneumonia

Ville T. Peltola,[1,a] K. Gopal Murti,[2] and Jonathan A. McCullers[1]



J Infec Dis 2005; 192: 249

Farklı NA aktivitesine sahip suşların etki farkı-II



Sing57 : Yüksek NA aktivitesine sahip suş
Syd97 : Düşük NA aktivitesine sahip suş

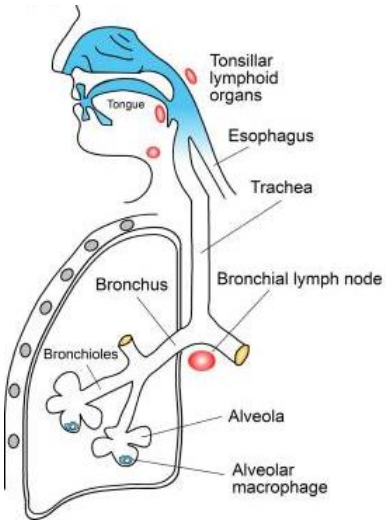
J Infec Dis 2005; 192: 249

Table 2. Comparison of neuraminidase (NA) activity with excess mortality from influenza.

Season	Circulating influenza virus	NA activity,[a] %	Deaths[b]	Excess mortality/ 100,000 persons	Reference
1957–1958	Sing57	100	66,000	39	[34]
1962–1963	Eng62	24	46,000	25	[34]
1968–1969	HK68	12	28,100	14	[34]
1972–1973	Mem72	37	20,700	10	[35]
1987–1988	Len86	41	30,800	13	[2]
1997–1998	Syd97	71	72,400	27	[2]

[a] NA activity was measured in recombinant influenza viruses with a common background of hemagglutinin and internal genes.
[b] Excess deaths by all causes in the United States above the seasonal baseline attributable to influenza. Excess mortality was calculated by Thompson et al. [2] by a method slightly different from that used by Liu et al. [35] and Housworth et al. [34]. These methods provide comparable estimates of mortality caused by influenza [2].

J Infec Dis 2005; 192: 249



Influenza enfeksiyonunu takiben Solunum yollarında farklılaşma:

1- Epitel hasarı/sitotoksisite

2- Solunum fonksiyonlarında değişimler

3- Reseptör ekspresyonunda artış

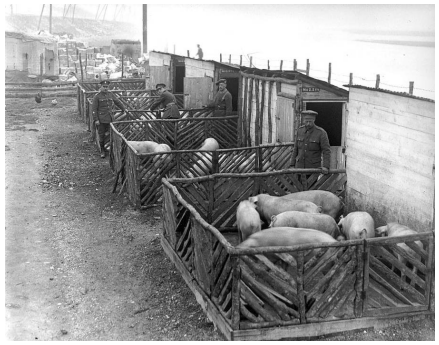
4- Doğal direncin baskılanması

BAKTERİ ENFEKSİYONLARINDA ARTIŞ

http://www.influenzareport.com/ir/pathogen.htm

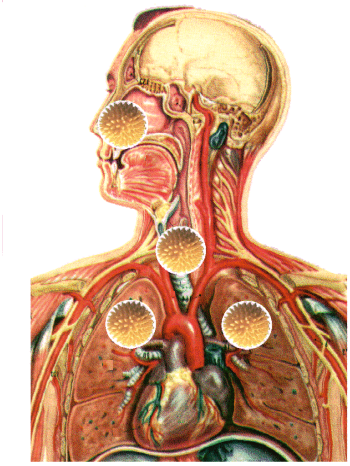


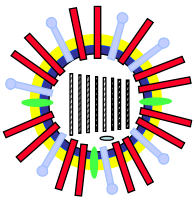
GRİP olgularında ANTİBİYOTERAPİ Gereksiz mi?



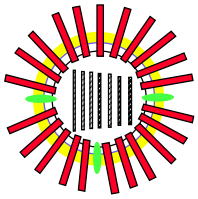


İnsan Influenza virüsleri





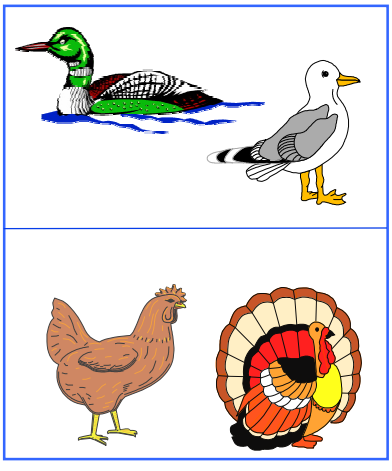
Tip A
sub-tip H1N1
sub-tip H3N2
Sub-tip H1N2
Tip B



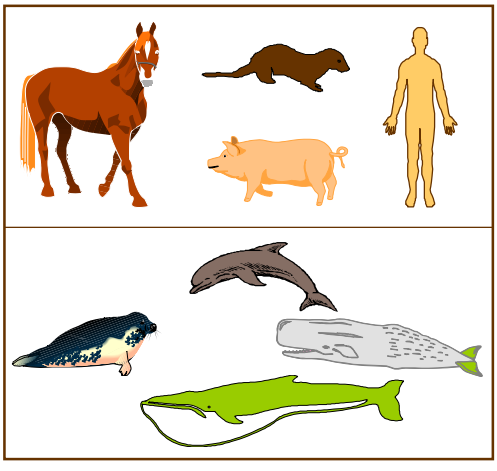
Tip C

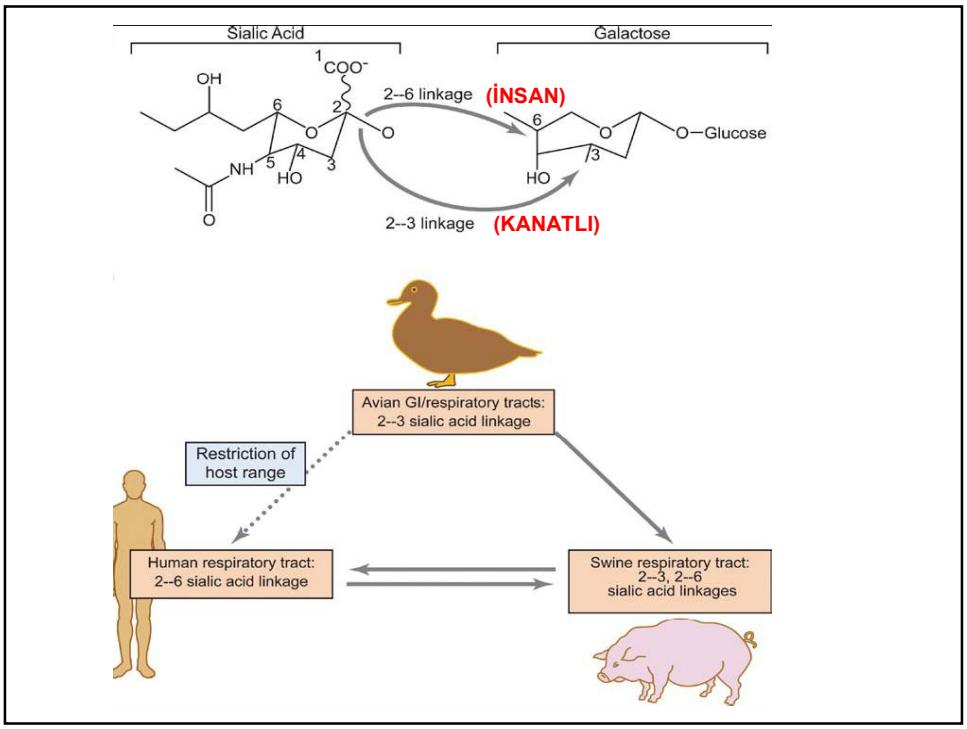
Influenza virüslerinin tropizm özellikleri

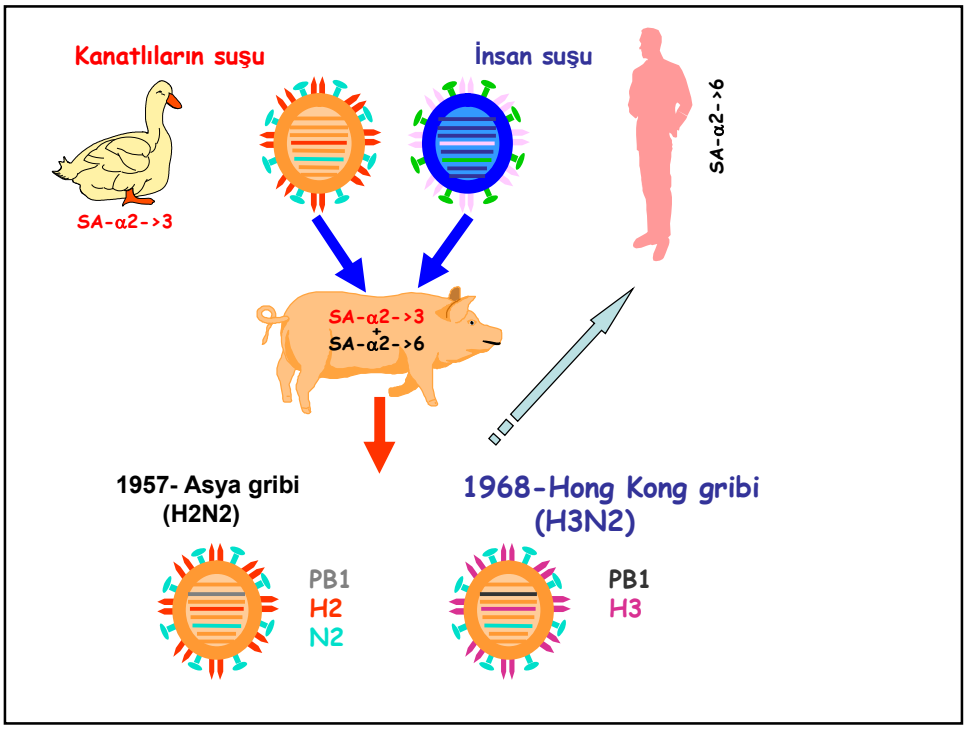
Sindirim sistemi



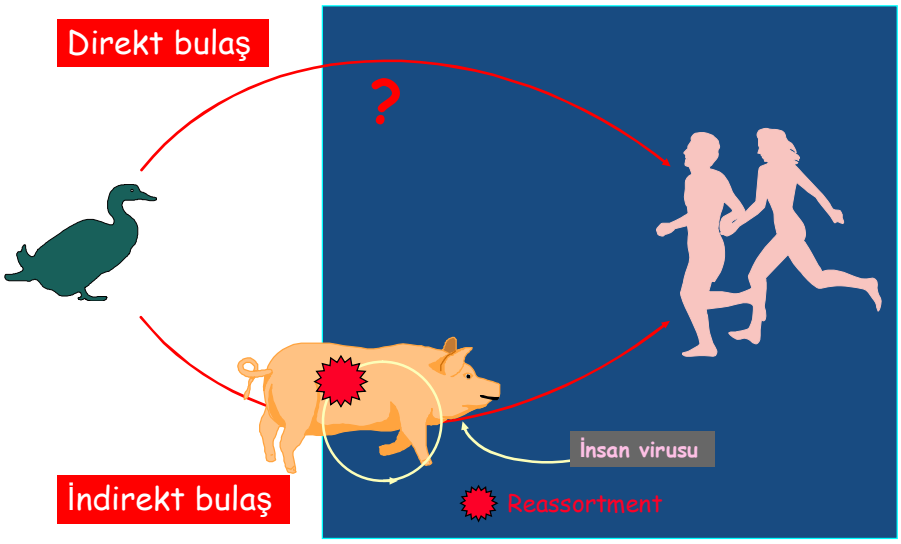
Solunum sistemi



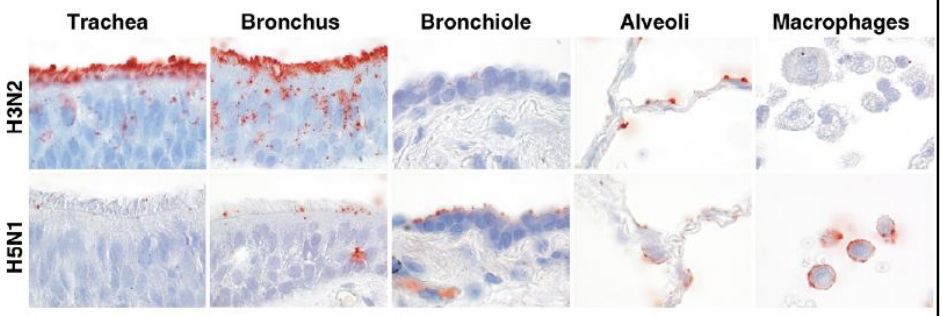

Sialic Acid
Galactose
2--6 linkage (İNSAN)
2--3 linkage (KANATLI)
O—Glucose
Avian GI/respiratory tracts:
2--3 sialic acid linkage
Restriction of
host range
Human respiratory tract:
2--6 sialic acid linkage
Swine respiratory tract:
2--3, 2--6
sialic acid linkages


Kanatlıların suşu
İnsan suşu
SA-α2->3
SA-α2->6
SA-α2->3
+
SA-α2->6
1957- Asya gribi
(H2N2)
PB1
H2
N2
1968-Hong Kong gribi
(H3N2)
PB1
H3

Influenza virüslerinin türler arası bulaş yolları

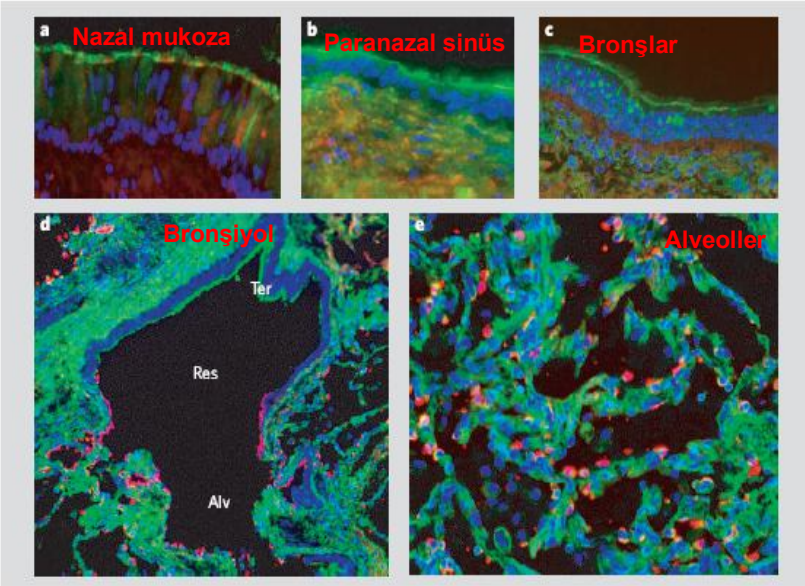


- Memelilerde Influenza A suşları solunum yollarının yüzeysel epitel tabakasına bağlanırlar
- Bu durum, virüsün replikasyonu için gerekli bir aşama olan viral HA'nin kırılmasında rol oynayan ***"tripsin-like"*** **proteazların** yerleşim bölgeleri ile bağlantılı
- H5 suşlarının HA'ninleri ise, **"tripsin bağımsız"** yoldan da kırılabilirler; bu nedenle farklı bölgelerde yerleşme özelliği gösterirler.

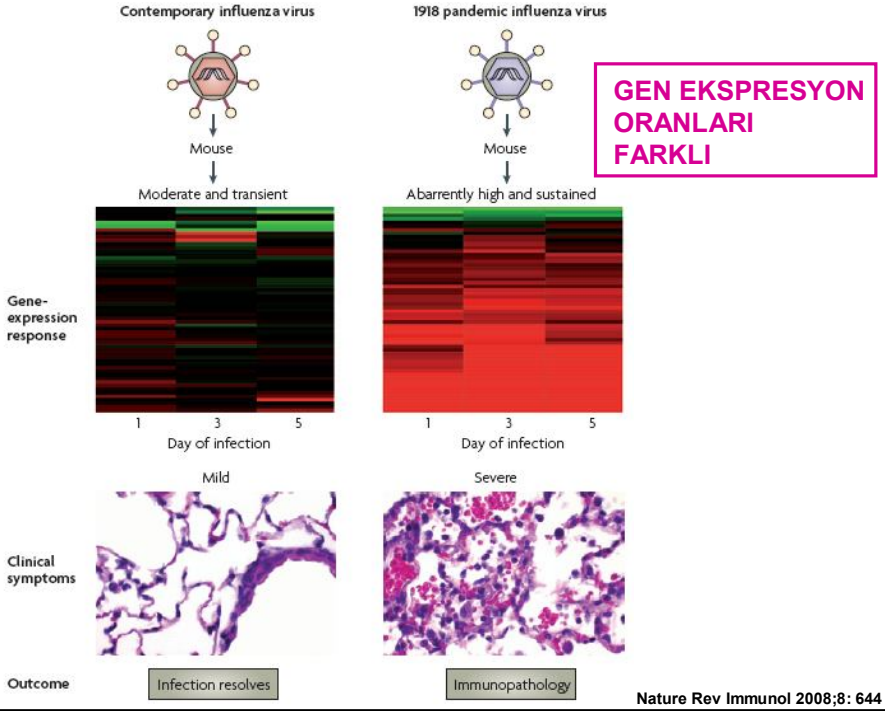


Am J Pathol 2007;171: 1215

İnsan solunum yollarının H5N1 ile enfeksiyonu



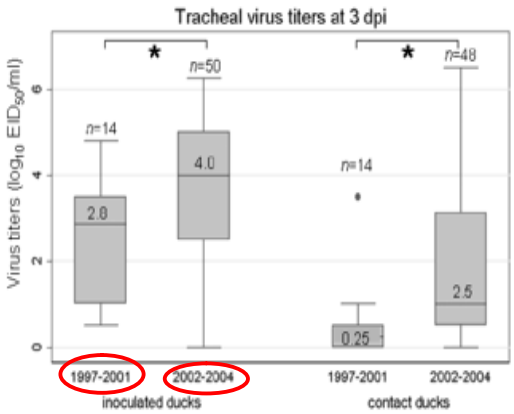
Nature 2006; 440:435



GEN EKSPRESYON ORANLARI FARKLI

Nature Rev Immunol 2008;8: 644

Aynı Suşun Replikasyon Yoğunluğu Farklı Olabilir...

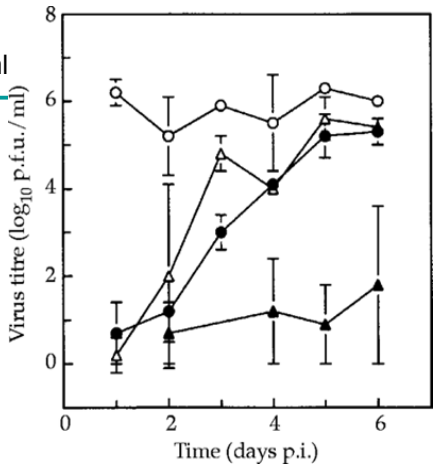


Sturm-Ramirez et al, J Virol 2005

Farklı Bölgelerde Replikasyon Yoğunluğu Farklı Olabilir...

- akciğer
- Beyin
- Adipoz doku
- kan

	HK156 log_{10} pfu/ml	HK483 log_{10} pfu/ml
Beyin	1.8+/- 0.7	3.9+/- 0.3
Akciğer	5.9+/- 0.5	5.5+/- 0.7
Kan	1.3+/- 1.2	0.9+/- 1.1



Nishimura et al, J Gen Virol 2000

Influenza Virüslerine Karşı İmmün yanıt



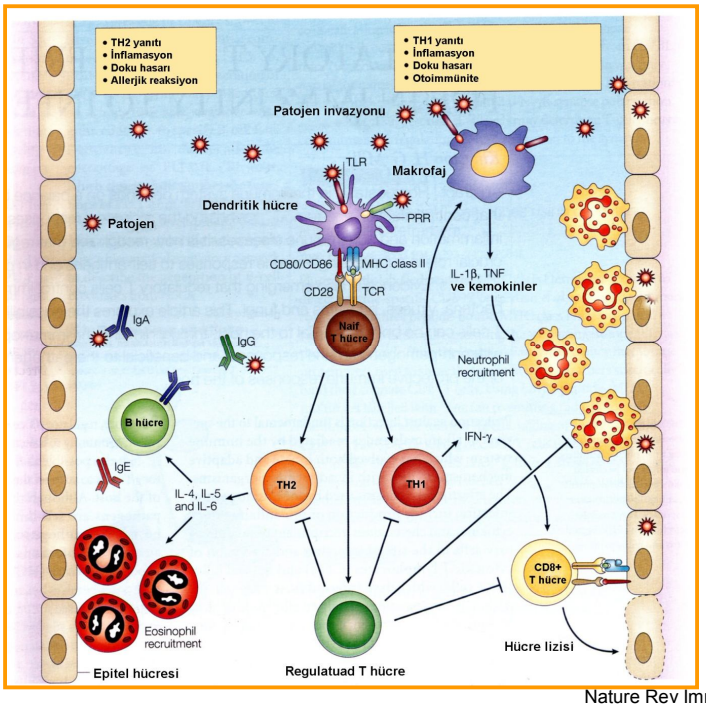


Memelilerde Influenza enfeksiyonları:

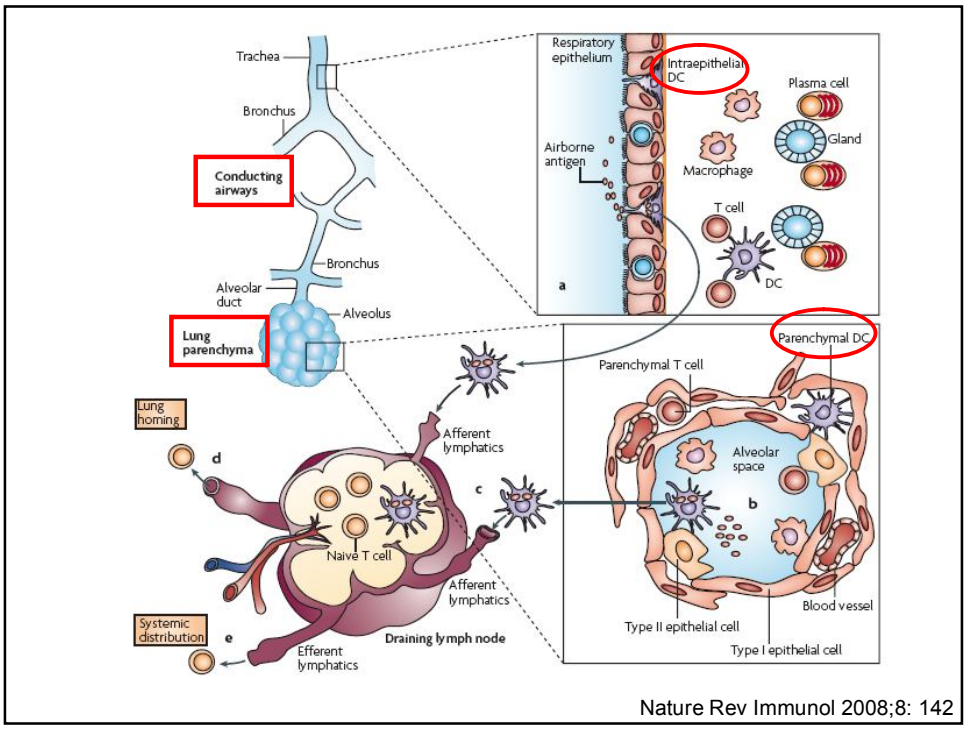


- Doğal Bağışıklık rol oynar + Ayrıca güçlü Edinsel Yanıtta söz konusu
- Ancak virüsün değişkenliği...
- Aşılar ile Hümoral yanıt sağlanır ...
- Hedef: DAHA GÜÇLÜ AŞILARIN ELDESİ

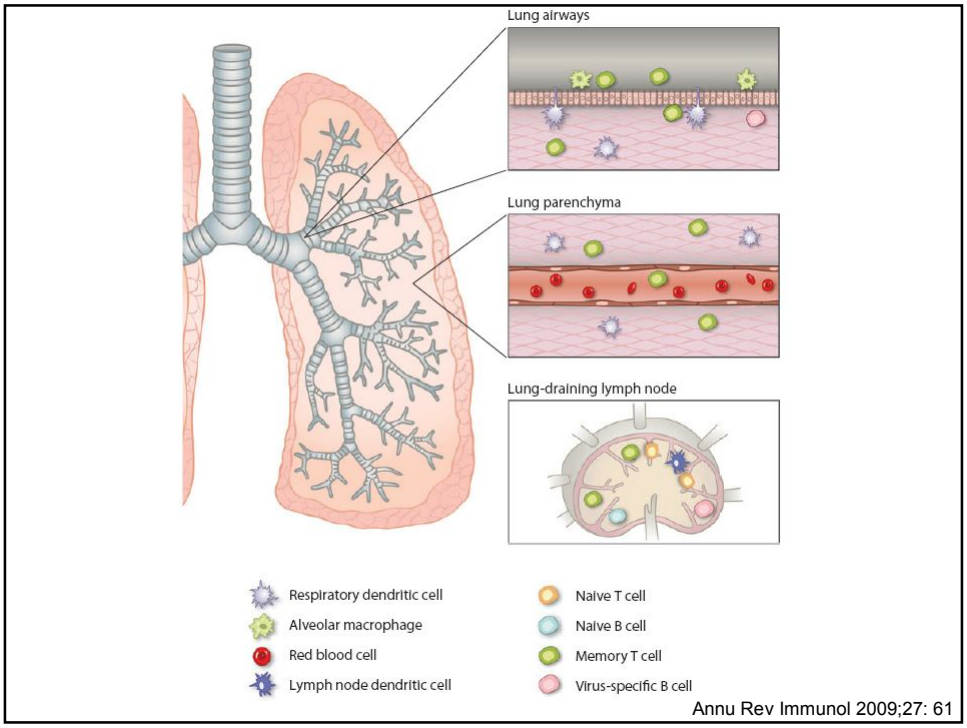




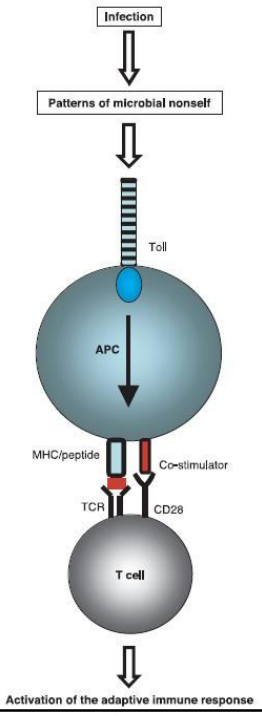
Nature Rev Immunol 2004;4:841



Nature Rev Immunol 2008;8: 142



Annu Rev Immunol 2009;27: 61



Yabancı ETKENİ, doğal direnç hücreleri tanır, aktive olurlar ve ÖZGÜL BAĞIŞIKLIĞIN orkestra şefi olan $CD4^+$ T hücrelerine sunarlar.

Uyarıyı alan "şef", sağa sola emirler yağdıracak ve tüm sistem istenmeyen yabancı etkene karşı ayağa kalkacaktır.

Science 2002;296: 298

Influenza Virüslerine Karşı Oluşan Yanıtın Aşamaları

1- Virüslerin tanınması (PAMP-PRR bağlantısı)

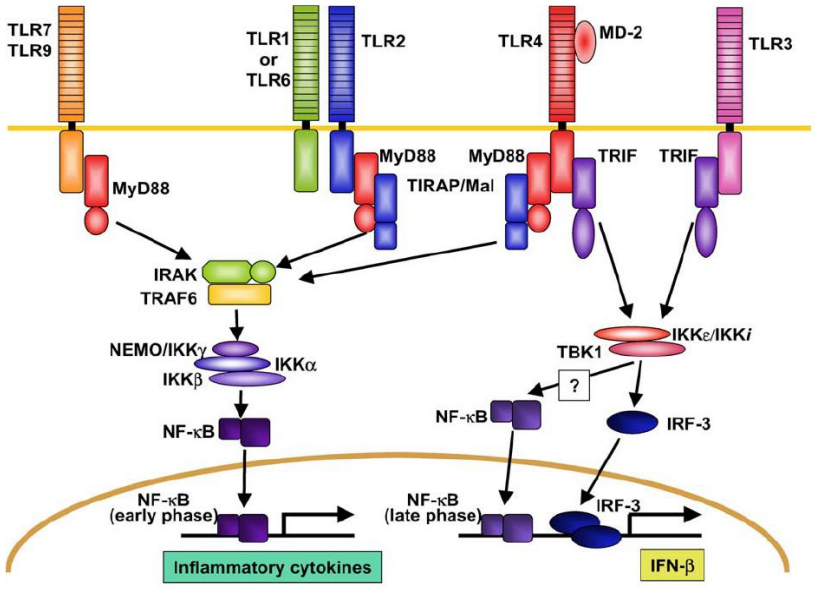
- dsRNA -TLR3
- ssRNA - RIG-1 ve TLR7

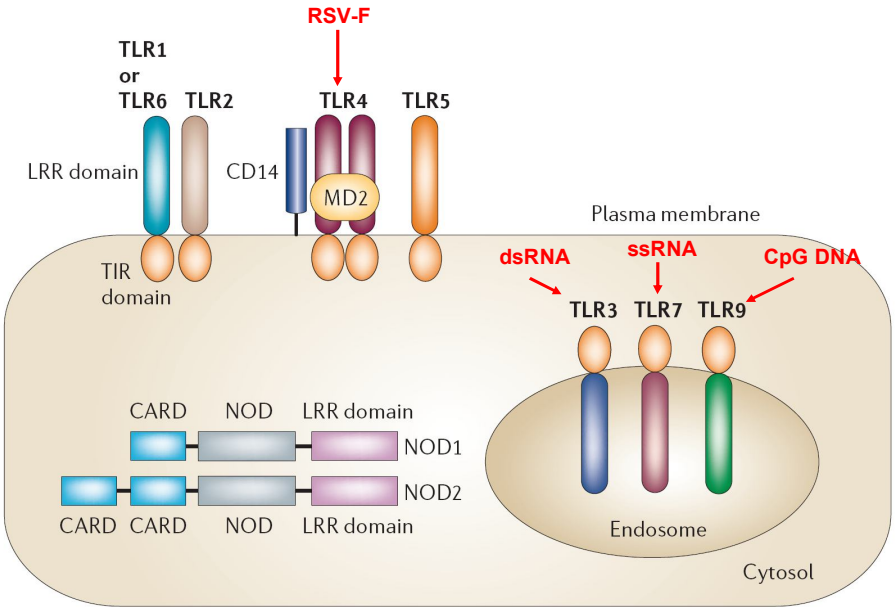
2- Doğal direnç

- NK'lar
- Nötrofiller
- Makrofajlar
- Kollektinler, defensinler

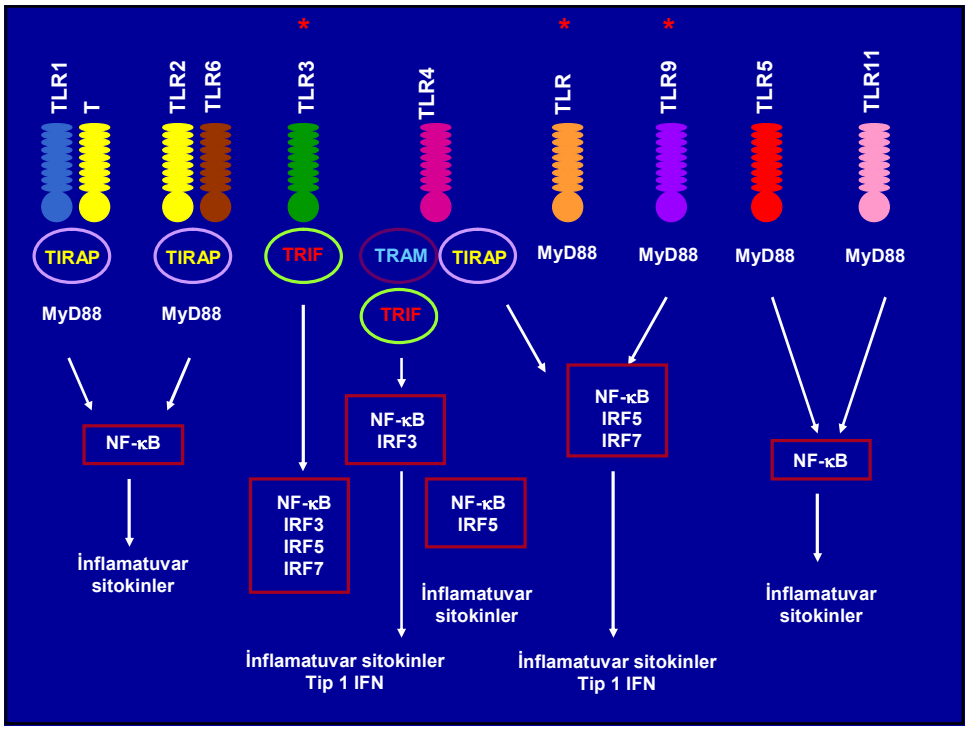
3- Özgül yanıt (Edinsel bağışıklık)

Toll benzeri reseptörler (TLR)





(Strober W et al: 2006)

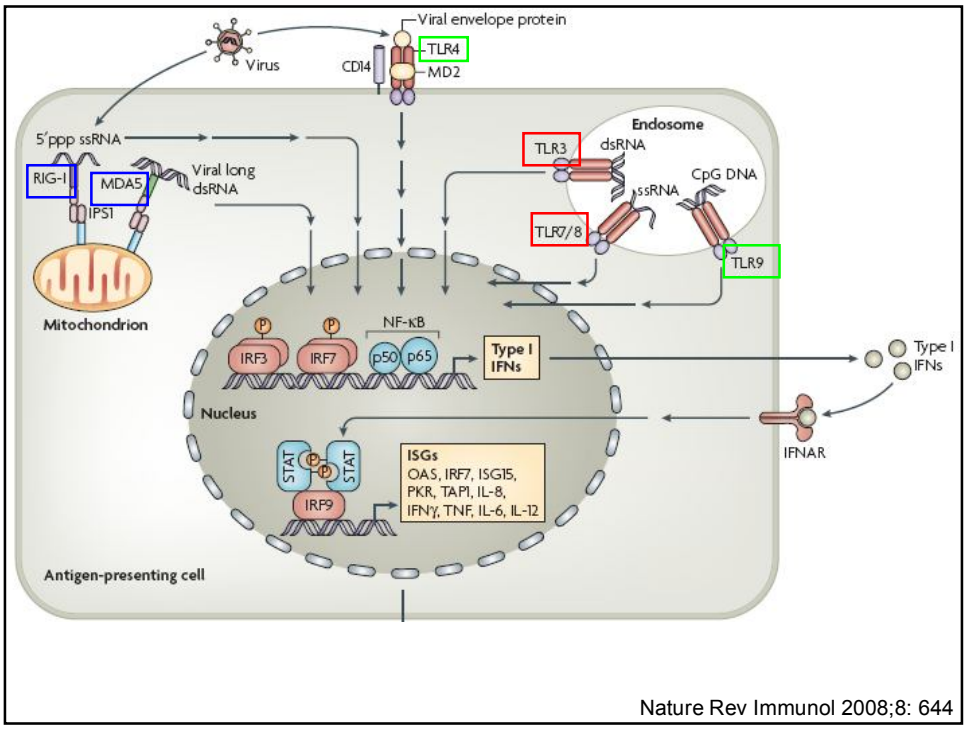


The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses

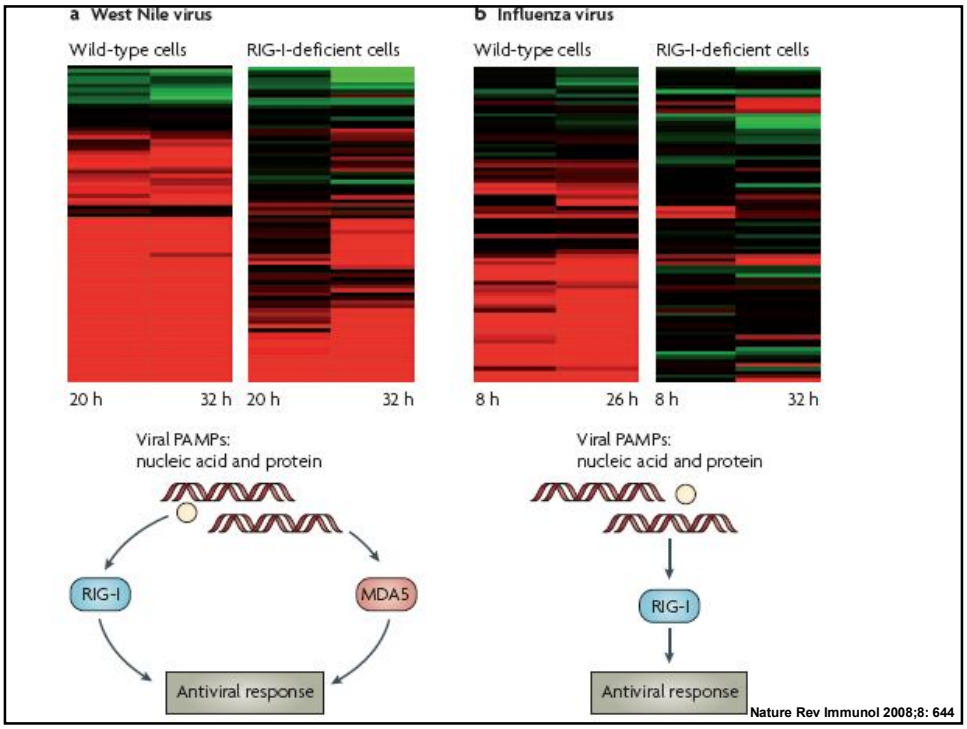
Mitsutoshi Yoneyama[1], Mika Kikuchi[1], Takashi Natsukawa[1], Noriaki Shinobu[1], Tadaatsu Imaizumi[2], Makoto Miyagishi[3], Kazunari Taira[3], Shizuo Akira[4] & Takashi Fujita[1]

Intracellular double-stranded RNA (dsRNA) is a chief sign of replication for many viruses. Host mechanisms detect the dsRNA and initiate antiviral responses. In this report, we identify retinoic acid inducible gene I (RIG-I), which encodes a DExD/H box RNA helicase that contains a caspase recruitment domain, as an essential regulator for dsRNA-induced signaling, as assessed by functional screening and assays. A helicase domain with intact ATPase activity was responsible for the dsRNA-mediated signaling. The caspase recruitment domain transmitted 'downstream' signals, resulting in the activation of transcription factors NF-κB and IRF-3. Subsequent gene activation by these factors induced antiviral functions, including type I interferon production. Thus, RIG-I is key in the detection and subsequent eradication of the replicating viral genomes.

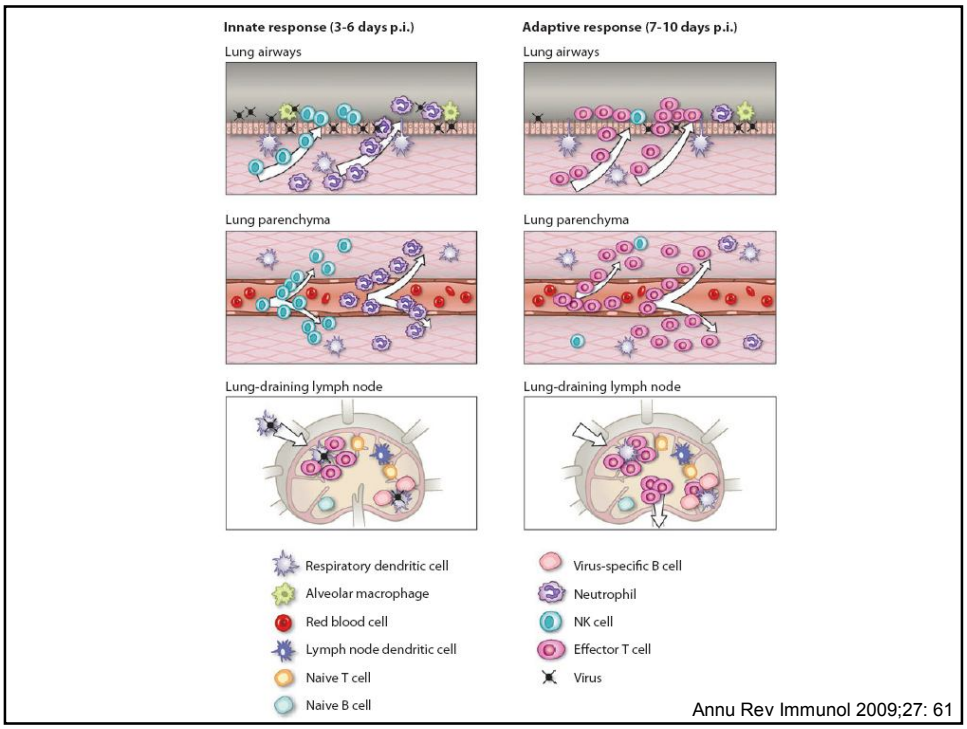
Nature Immunol 2004;5: 730



Nature Rev Immunol 2008;8: 644

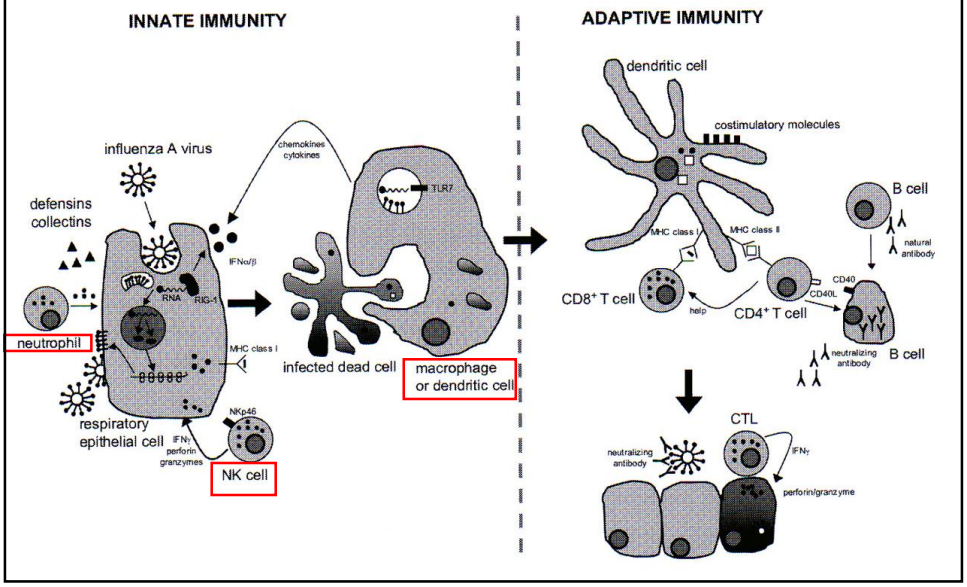


Nature Rev Immunol 2008;8: 644



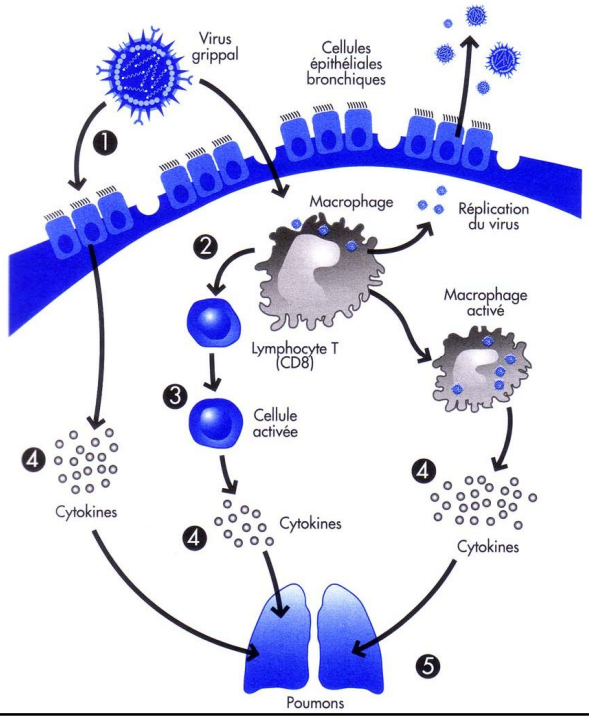
Annu Rev Immunol 2009;27: 61

Influenza Enfeksiyonlarında İmmün Yanıt



Sitokin bombardımanı-I

- Virüsün neden olacağı patolojilerden daha ağır hasarı pülmoner filtratlarda saptanan **inflamatuar sitokinler** gerçekleştiriyor.
- **Aşırı inflamatuar anti-viral aktivite** yarardan çok zarara yol açar!.
- Hayvan modellerinde 1918 Influenza A suşunun yüksek titrede sitokin/kemokin salımına neden olduğu gösterilmiş (IFN-γ, TNF-α, IL-1, IL-6, IL-12, IL-18, GCSF,MIP-2, MIP-1α/β, MCP-1)
- H5N1 enfeksiyonu sırasında >150 inflamatuvar mediyatörün (sitokinler, serbest oksijen radikalleri, koagülasyon faktörleri gibi) oluştuğu bildirilmektedir.



Sitokin bombardımanı-II

- Letal etki gösteren sitokin bombardımanı, enfekte makrofajlar tarafından yüksek düzeyde aktive edilen ve hızla prolifere olan **pDC**, **T ve NK** hücreleri tarafından oluşturulur.
- Çok sayıda sitokin indüksiyonu, **sitokin genlerinin transaktivasyonunu sağlayan bir transkripsiyon faktörünün (NF-kB) viral HA tarafından aktive edilmesinden** kaynaklanır.
- Ayrıca **viral NP** de, **monositlerden** TNF ve IL-1 üretimini uyarmaktadır.

"CYTOS"-"KİNEİN" ler !!!

- **İnsanda "Influenza" enfeksiyonlarının seyri:**
  - etken suşun özellikleri
  - konağın immün sistemi
  - fizyolojik / çevresel faktörler
- **Semptomlar:**
  - H1/3 vs H5/1918 suşu
  - direkt olarak suşlara bağlı değil
  - konak yanıtı olan sitokinler
  - *"cytokine storm"*
  - Nazal yıkantı suyunda artmış olan sitokinler: IFN-α, γ, TNF-α, IL-6, IL-8, IL-10, MIP-1α, MIP-1β, MCP-1...

Acute Respiratory Distress Syndrome Induced by Avian Influenza A (H5N1) Virus in Mice

Tong Xu, Jian Qiao, Lihong Zhao, Guirong Wang, Guimei He, Kai Li, Yong Tian, Mingyu Gao, Jianlin Wang, Huiyu Wang, and Changgui Dong

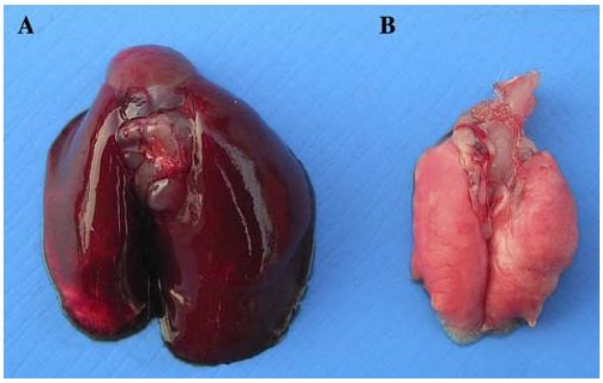


Figure 1. Gross pathology of H5N1 virus–infected lung. (*A*) H5N1 virus–infected lung 6 d postinoculation, displaying highly edematous, congestive, and hemorrhagic changes. (*B*) Noninfectious allantoic fluid–inoculated control lung 6 d postinoculation.

Am J Respir Crit Care Med 2006;174: 1011

Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia

Menno D de Jong[1], Cameron P Simmons[1], Tran Tan Thanh[1], Vo Minh Hien[2], Gavin J D Smith[3], Tran Nguyen Bich Chau[1], Dang Minh Hoang[1], Nguyen Van Vinh Chau[2], Truong Huu Khanh[4], Vo Cong Dong[5], Phan Tu Qui[4], Bach Van Cam[4], Do Quang Ha[1], Yi Guan[3], J S Malik Peiris[3], Nguyen Tran Chinh[2], Tran Tinh Hien[2] & Jeremy Farrar[1]

Table 3 Levels of chemokines and cytokines in the peripheral blood

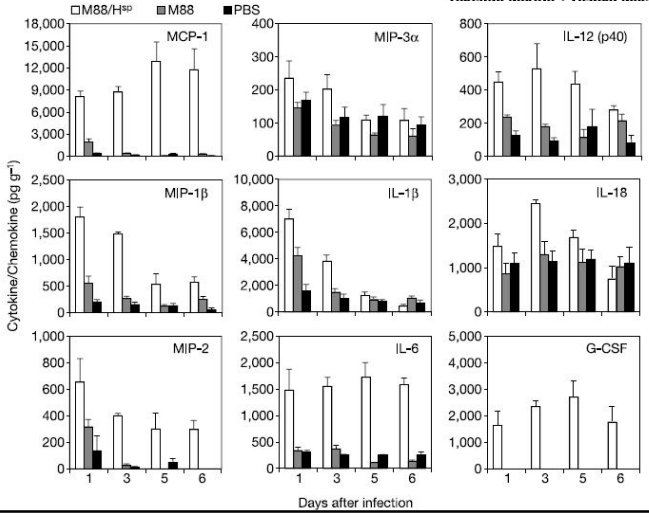
						H5N1		
	H5N1[a] ($n = 16$)	P^b	H3/H1 ($n = 6$)	P^c	Controls ($n = 15$)	Fatal ($n = 11$)	Not fatal ($n = 5$)	P
IP-10	5.1 (3.5–6.3)	0.005	3.8 (3.4–4.6)	0.001	2.7 (2.4–3.8)	5.4 (3.5–6.3)	4.2 (4.0–5.0)	0.031
MCP-1	2.4 (1.5–4.0)	0.083	1.9 (und.–2.4)	0.045	1.4 (und.–2.0)	2.8 (2.0–4.0)	1.8 (1.5–2.3)	0.015
MIG	4.3 (3.1–5.2)	0.013	3.2 (2.9–3.9)	0.002	2.6 (2.2–3.3)	4.6 (3.3–5.2)	3.3 (3.1–4.2)	0.011
IL-8	2.0 (0.7–3.2)	0.001	0.8 (0.4–1.5)	0.34	0.7 (und.–1.0)	2.4 (1.1–3.2)	1.7 (0.7–1.9)	0.020
IL-10	1.5 (und.–2.8)	0.002	–1.0 (und.–0.4)	0.85	–1.0 (und.–1.0)	1.6 (und.–2.8)	0.8 (und.–2.2)	0.6
IL-6	2.1 (und.–3.7)	0.001	–0.2 (und.–0.7)	0.30	–1.0 (und.–1.0)	2.2 (1.5–3.7)	1.0 (und.–2.4)	0.054
IFN-γ	2.0 (und.–4.2)	0.029	0.1 (und.–2.4)	0.42	–1.0 (und.–1.4)	2.3 (1.0–4.2)	2.0 (und.–2.6)	0.2

Levels of chemokines and cytokines in the peripheral blood of patients with influenza H5N1 and H3N2 or H1N1. Levels are given as median $\log_{10}$ pg per ml (range). [a]Plasma levels of chemokines and cytokines in H5N1 patients were all higher than in healthy controls at <0.001 significance levels. [b]Comparison between H5N1 and H3/H1 patients. [c]Comparison between H3/H1 patients and healthy controls. und., undetectable.

Nature Med 2006;12: 1203

Enhanced virulence of influenza A viruses with the haemagglutinin of the 1918 pandemic virus

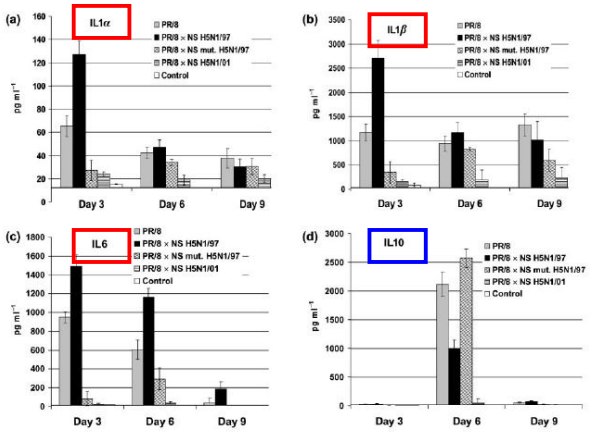
Darwyn Kobasa[1]*, Ayato Takada[2,3], Kyoko Shinya[2]*, Masato Hatta[1], Peter Halfmann[1], Steven Theriault[4], Hiroshi Suzuki[5], Hidekazu Nishimura[6], Keiko Mitamura[7]*, Norio Sugaya[7]*, Taichi Usui[8] Takeomi Murata[8], Yasuko Maeda[2], Shinji Watanabe[1], M. Suresh[1],



Nature 2004;431: 703

Pathogenesis of Hong Kong H5N1 influenza virus NS gene reassortants in mice: the role of cytokines and B- and T-cell responses

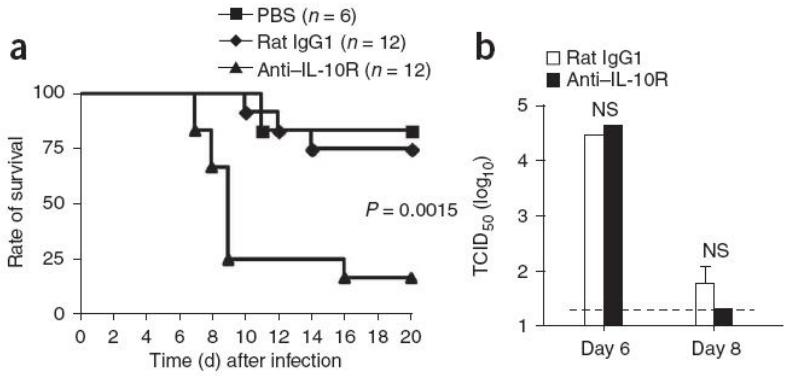
Aleksandr S. Lipatov,[1] Samita Andreansky,[2]† Richard J. Webby,[1] Diane J. Hulse,[1] Jerold E. Rehg,[3] Scott Krauss,[1] Daniel R. Perez,[1]‡ Peter C. Doherty,[2,5] Robert G. Webster[1,4] and Mark Y. Sangster[2]§



J Gen Virol 2005;86: 1121

Effector T cells control lung inflammation during acute influenza virus infection by producing IL-10

Jie Sun[1], Rajat Madan[2], Christopher L Karp[2] & Thomas J Braciale[1,3]

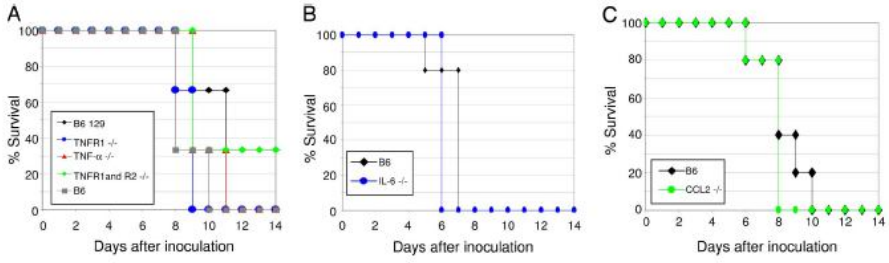


Nature Med 2009;15: 277

Bu arada SİTOKİNLERİN önemini tartışanlarda var !

Inhibition of the cytokine response does not protect against lethal H5N1 influenza infection

Rachelle Salomon*, Erich Hoffmann*, and Robert G. Webster*†‡

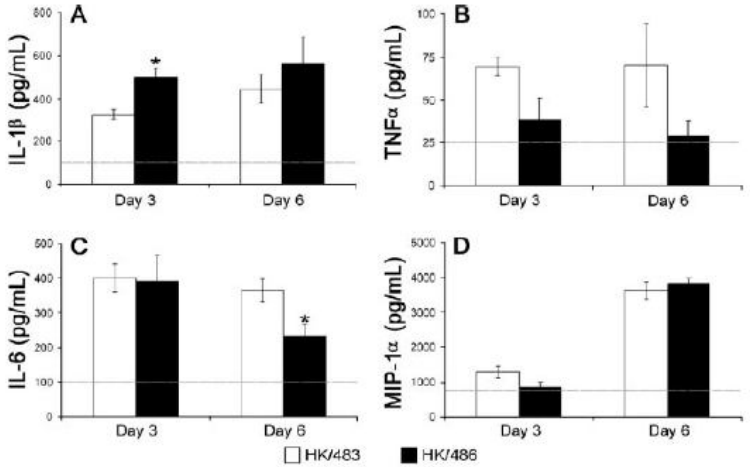


PNAS 2007;104: 12479

SİTOKİN inhibisyonu H5N1 modelinde ölümleri engellemiyor!

Role of Host Cytokine Responses in the Pathogenesis of Avian H5N1 Influenza Viruses in Mice▽

Kristy J. Szretter,[1,3] Shivaprakash Gangappa,[1]† Xuihua Lu,[1] Chalanda Smith,[2] Wun-Ju Shieh,[2] Sherif R. Zaki,[2] Suryaprakash Sambhara,[1] Terrence M. Tumpey,[1] and Jacqueline M. Katz[1]*



J Virol 2007;81: 2736

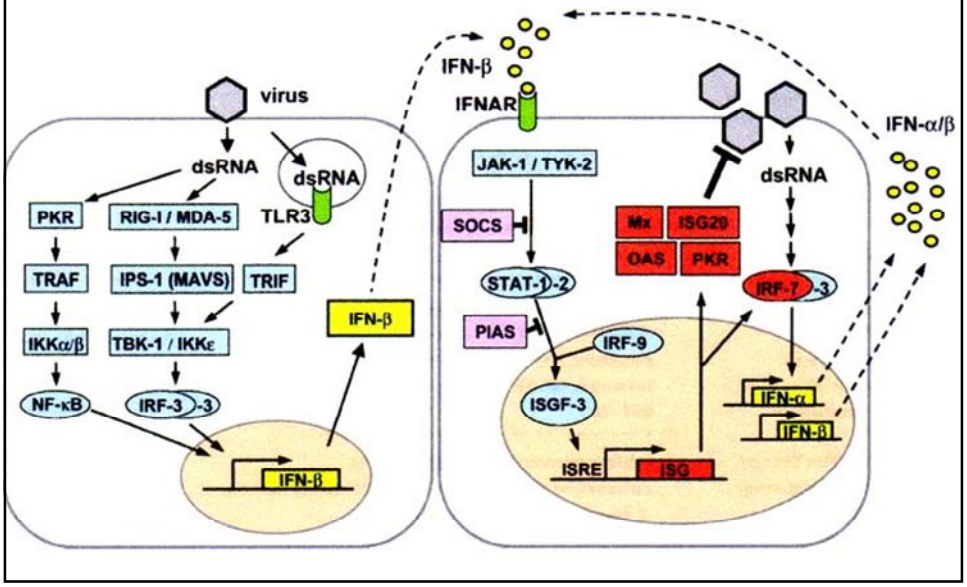
Sonuçta:

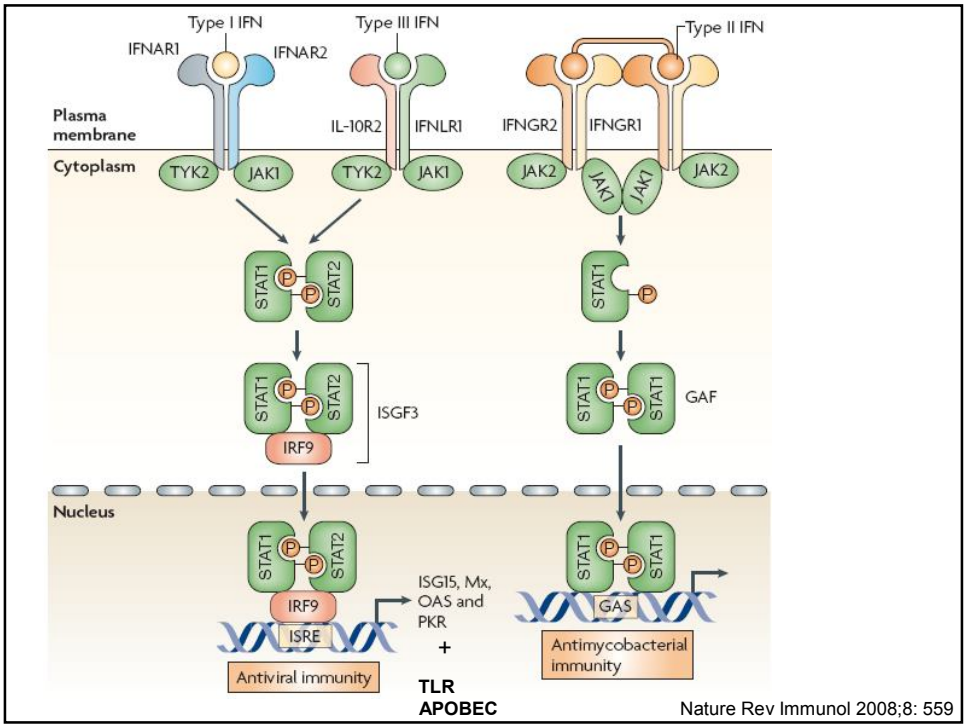
1- Yüksek patojeniteye sahip H5N1 gibi suşlar ile oluşan enfeksiyonlarda aşırı sitokin / kemokin üretimi akut solunum yetmezliği tablosunun ve yüksek fatalitenin hazırlayıcı nedeni

2- Ancak çelişkili bulgular da mevcut !

3- En iyi model Tip I INTERFERON'ların etkisi; özellikle viral NS1'in inhibisyonu sonucu elde edilen bulgular önemli

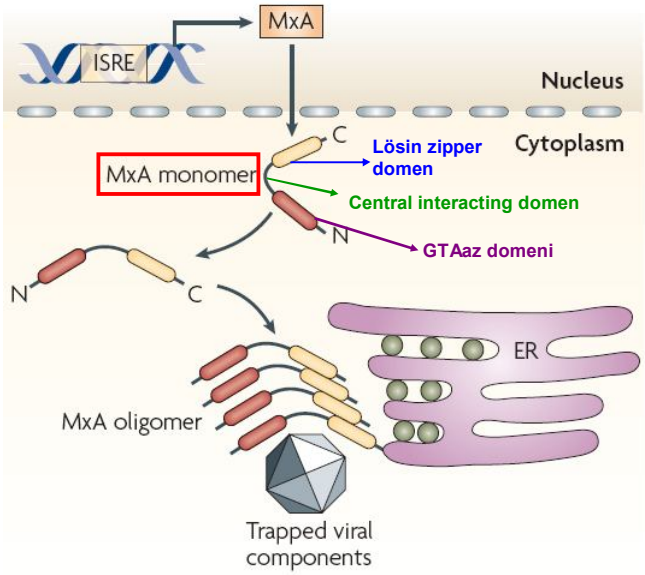
Sitokinler arasında INFLUENZA enfeksiyonlarında INTERFERON'ların ayrı bir önemi var...





Nature Rev Immunol 2008;8: 559

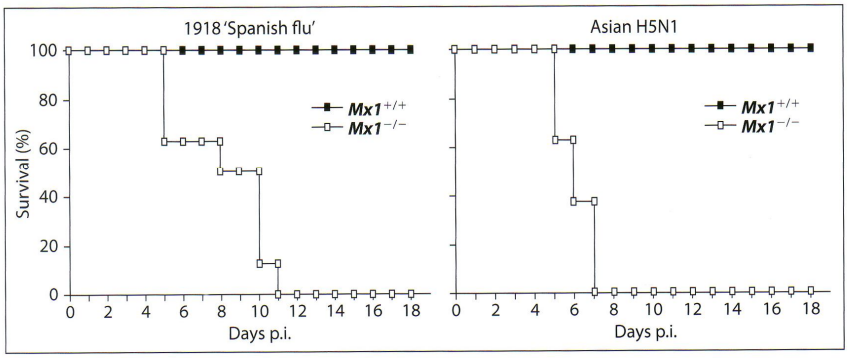
Tip I IFN'ların uyarısı sonucu oluşan proteinlere bir örnek: Mx



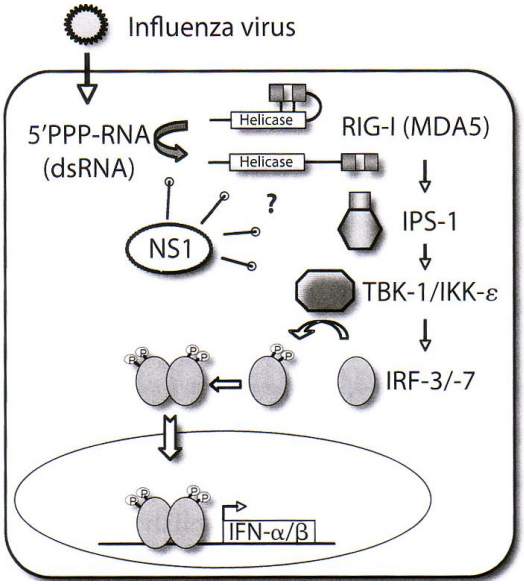
Mx'ler: - viral PB2 polimerazın transkripsiyonunu inhibe ederler
- viral nükleokapside bağlanıp, parçalarlar

Nature Rev Immunol 2008;8: 559

- **Mx (-) fareler Influenza'ya daha duyarlıdırlar**
- **Letal hastalık oluşturmak için Mx (+) farelere 100-1000 kez daha fazla virüs gerekli**



Viral NS genleri, tip I Interferon antagonisti kodlayarak virüsün çoğalmasına yardım ederler



NS1 Protein of Influenza A Virus Inhibits the Function of Intracytoplasmic Pathogen Sensor, RIG-I

Zhu Guo, Li-mei Chen, Hui Zeng, Jorge A. Gomez, Julie Plowden, Takashi Fujita, Jacqueline M. Katz, Ruben O. Donis, and Suryaprakash Sambhara

Am J Respir Cell Mol Biol 2007;36: 263

Inhibition of Retinoic Acid-Inducible Gene I-Mediated Induction of Beta Interferon by the NS1 Protein of Influenza A Virus∇

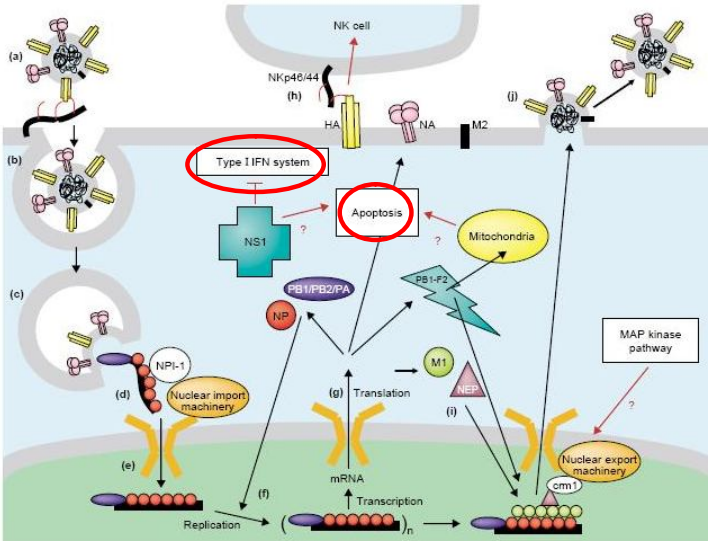
Masaki Mibayashi,[1] Luis Martínez-Sobrido,[1] Yueh-Ming Loo,[2] Washington B. Cárdenas,[1] Michael Gale, Jr.,[2] and Adolfo García-Sastre[1]*

J Virol 2007;81: 514

The NS1 Gene Contributes to the Virulence of H5N1 Avian Influenza Viruses∇

Zejun Li, Yongping Jiang, Peirong Jiao, Aiqin Wang, Fengju Zhao, Guobin Tian, Xijun Wang, Kangzhen Yu, Zhigao Bu,* and Hualan Chen*

J Virol 2006;80: 11115

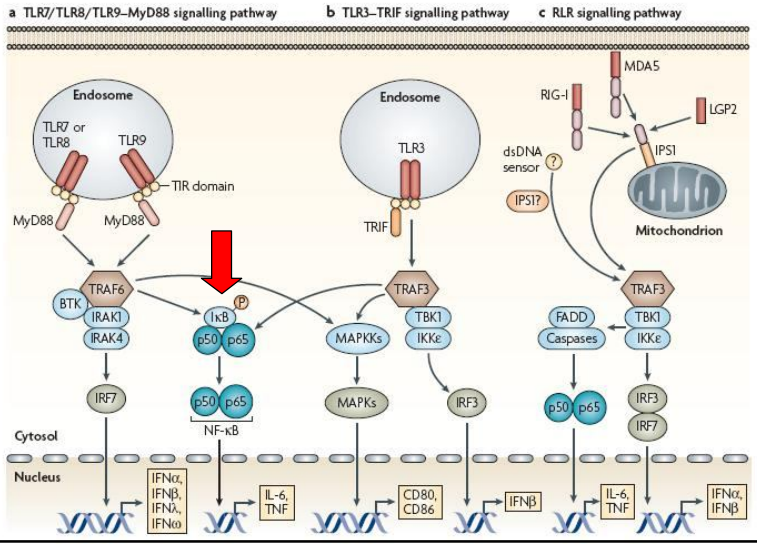


- NS1 kodlama özelliği zayıf olan tipler konağın savunma mekanizmalarına karşı koyamazlar
- NS1'i yüksek düzeyde kodlama özelliği olan tipler konak savunmasını etkisiz hale getirir ve viral replikasyon sürer.

Curr Opinion Microbiol 2002; 5: 414

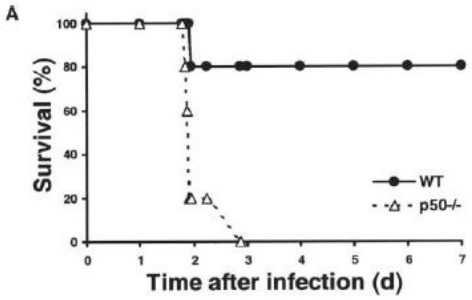
Nuclear Factor-κB p50 Limits Inflammation and Prevents Lung Injury during *Escherichia coli* Pneumonia

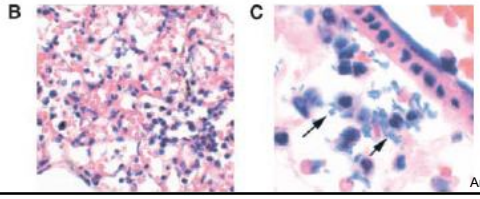
Joseph P. Mizgerd, Michal M. Lupa, Mariya S. Kogan, Henry B. Warren, Lester Kobzik, and George P. Topulos



Nuclear Factor-κB p50 Limits Inflammation and Prevents Lung Injury during *Escherichia coli* Pneumonia

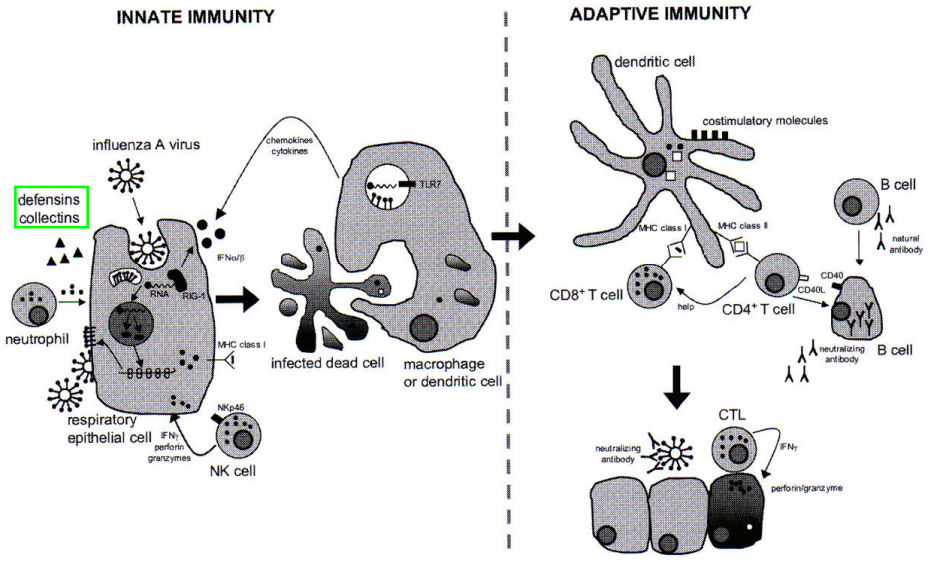
Joseph P. Mizgerd, Michal M. Lupa, Mariya S. Kogan, Henry B. Warren, Lester Kobzik, and George P. Topulos

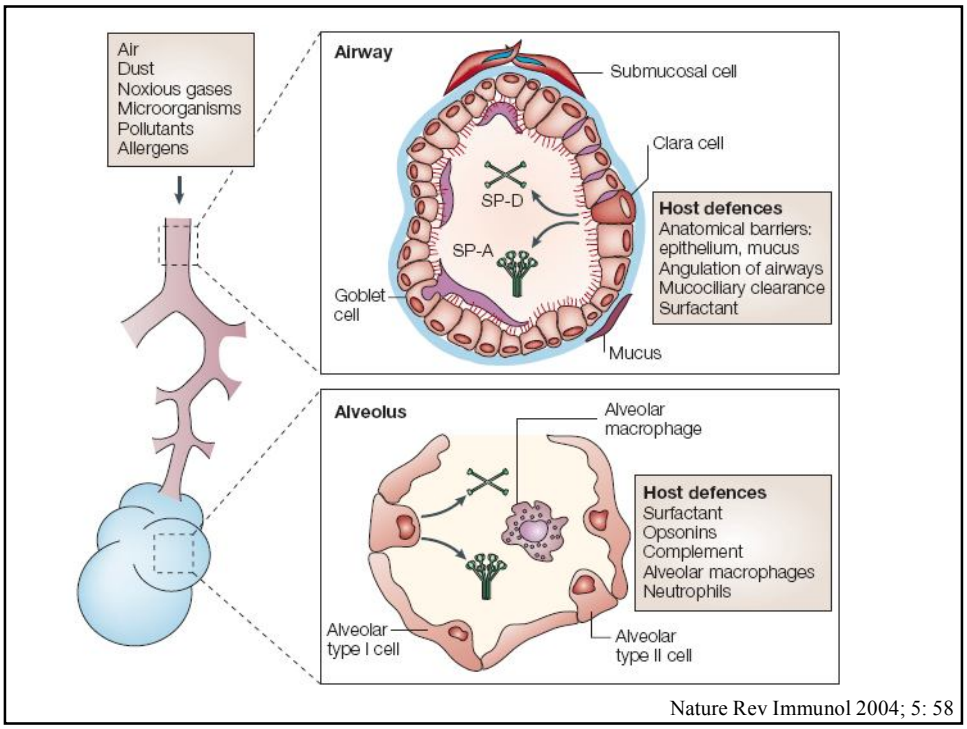




Am J Respir Crit Care Med 2003;168: 810

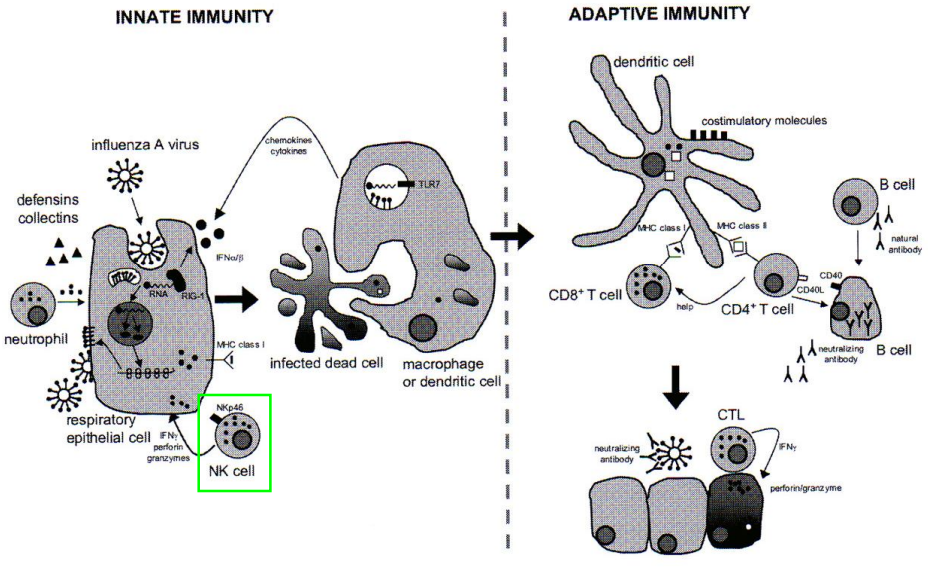
Influenza Enfeksiyonlarında İmmün Yanıt

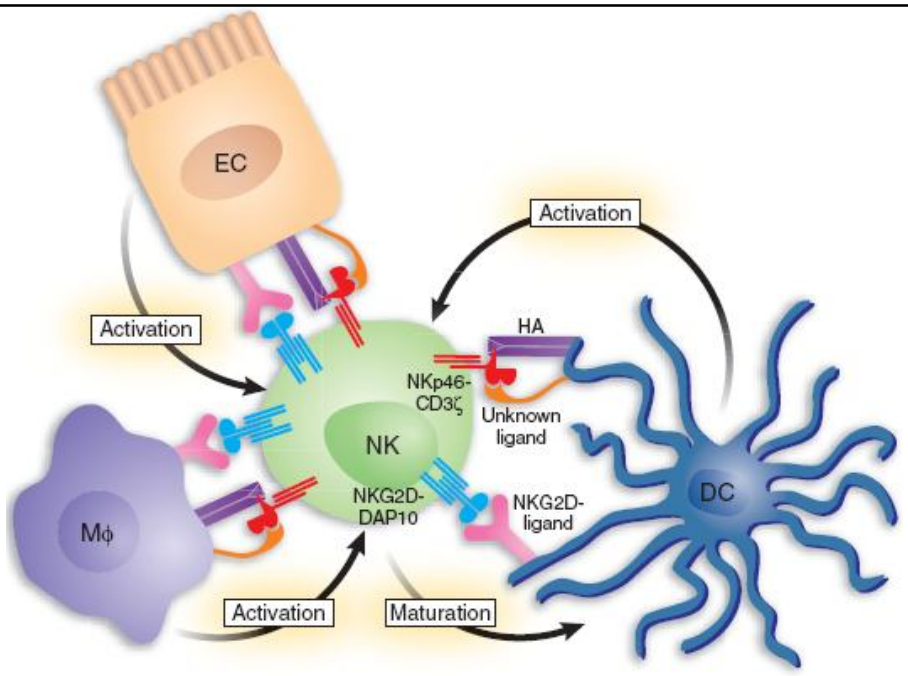




Nature Rev Immunol 2004; 5: 58

Influenza Enfeksiyonlarında İmmün Yanıt

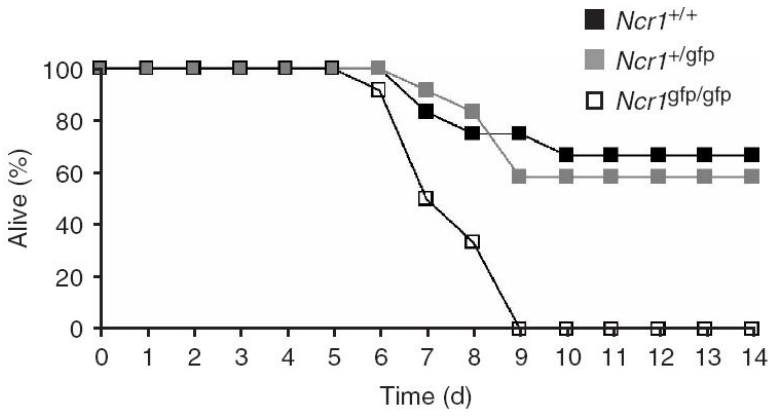




Nature Immunol 2006;7: 443

Lethal influenza infection in the absence of the natural killer cell receptor gene *Ncr1*

Roi Gazit[1], Raizy Gruda[1], Moran Elboim[1], Tal I Arnon[1], Gil Katz[1], Hagit Achdout[1], Jacob Hanna[1], Udi Qimron[2], Guy Landau[2], Evgenia Greenbaum[3], Zichria Zakay-Rones[3], Angel Porgador[2] & Ofer Mandelboim[1]



Nature Immunol 2006;7: 517

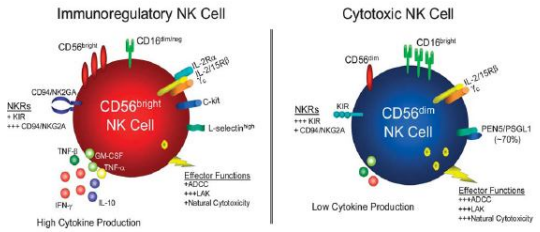
NK'ların işlevleri

1- Sitokin üretimi

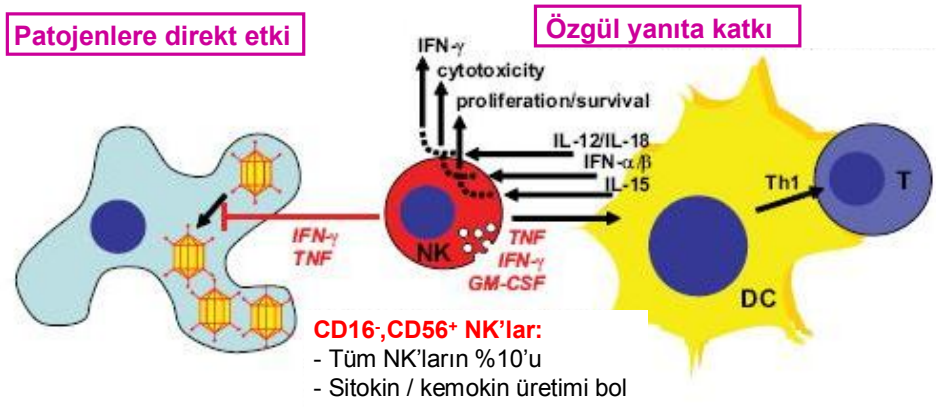
2- Hedef hücre yıkımı

* granül ekzositozu ile (granzim A, B)
* ölüm reseptörlerini (FasL, TRAIL) devreye sokarak
* antikora bağımlı hücresel sitotoksisite (FcγRIII ile)

3- DC'ler ile etkileşim



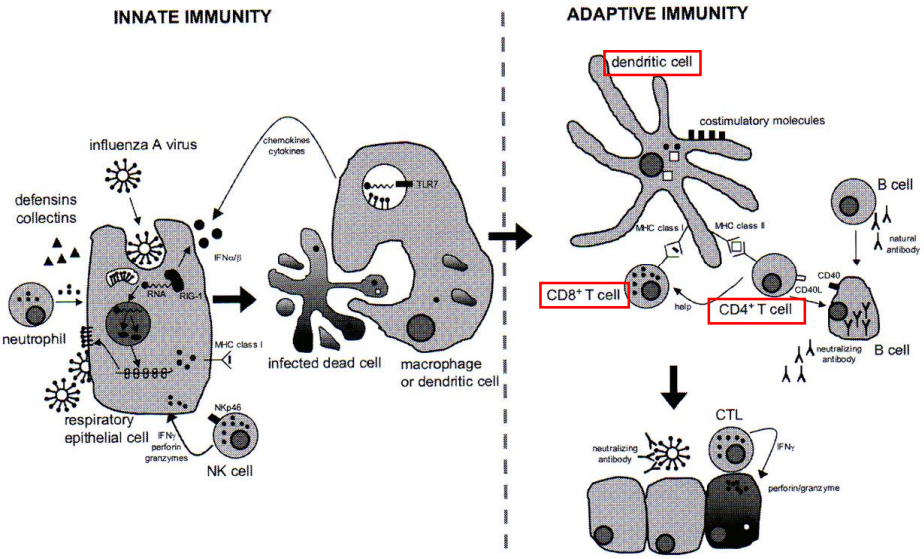
NK hücrelerin immün sistemde üstlendikleri görevler (Sitokin üretimi ile ilgili)

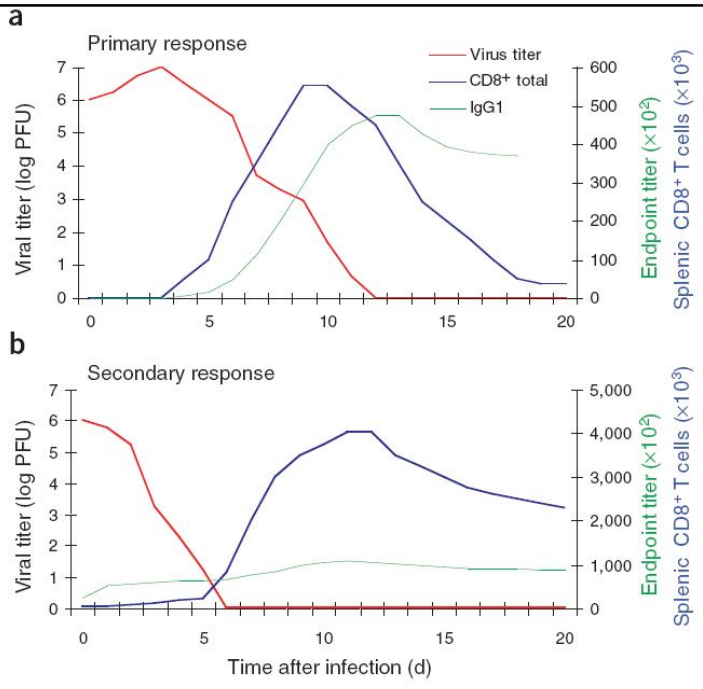


CD16⁻,CD56⁺ NK'lar:
- Tüm NK'ların %10'u
- Sitokin / kemokin üretimi bol

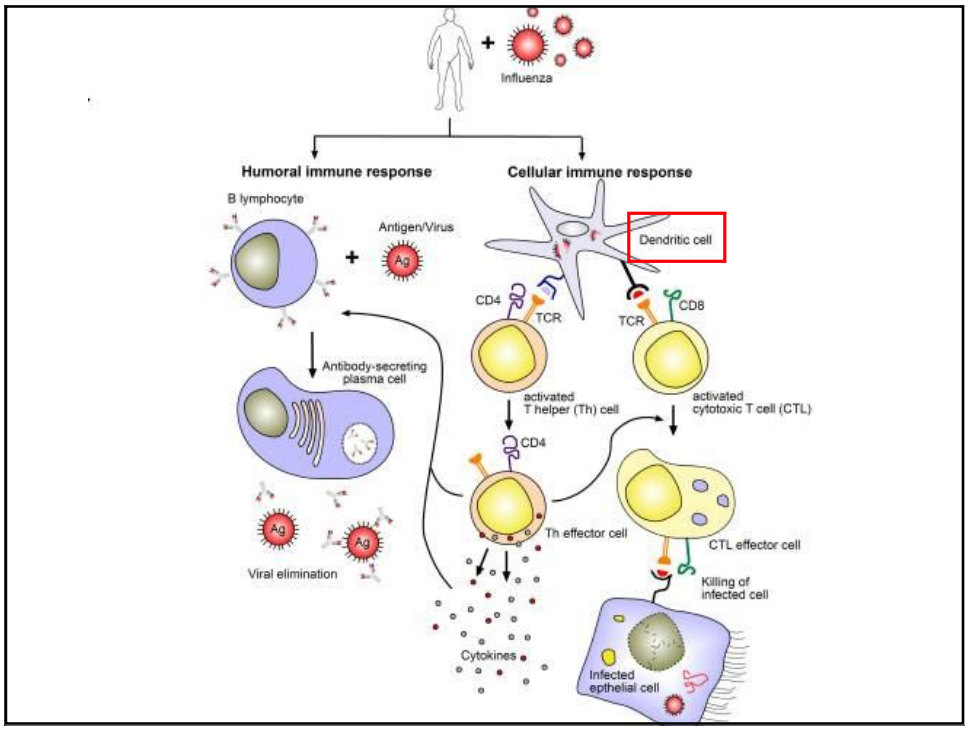
J Immunol 2008; 180: 7785

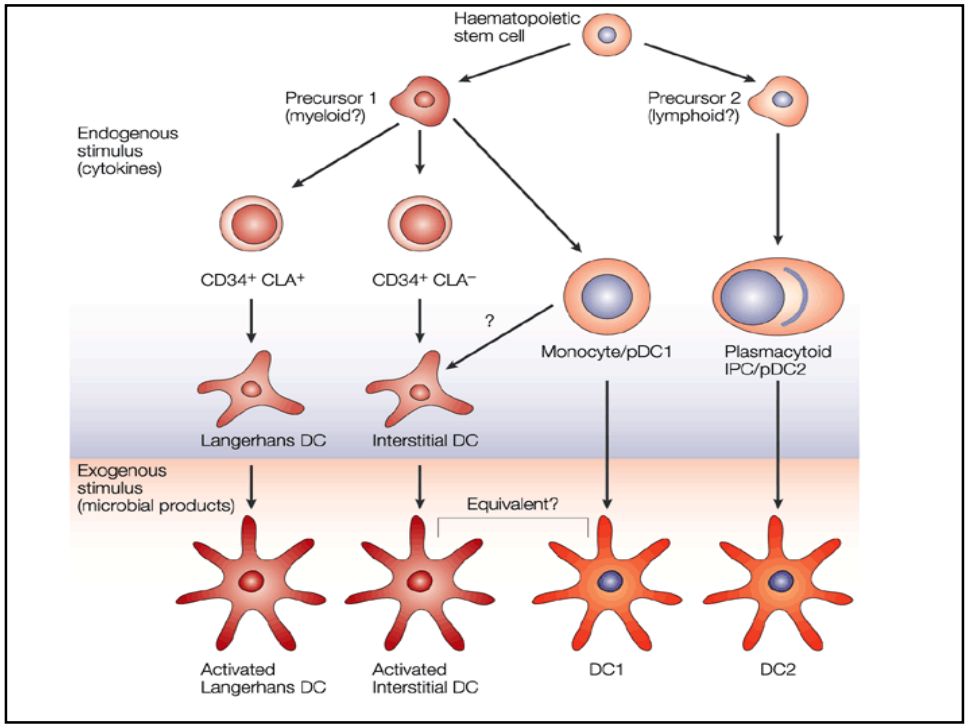
Influenza Enfeksiyonlarında İmmün Yanıt

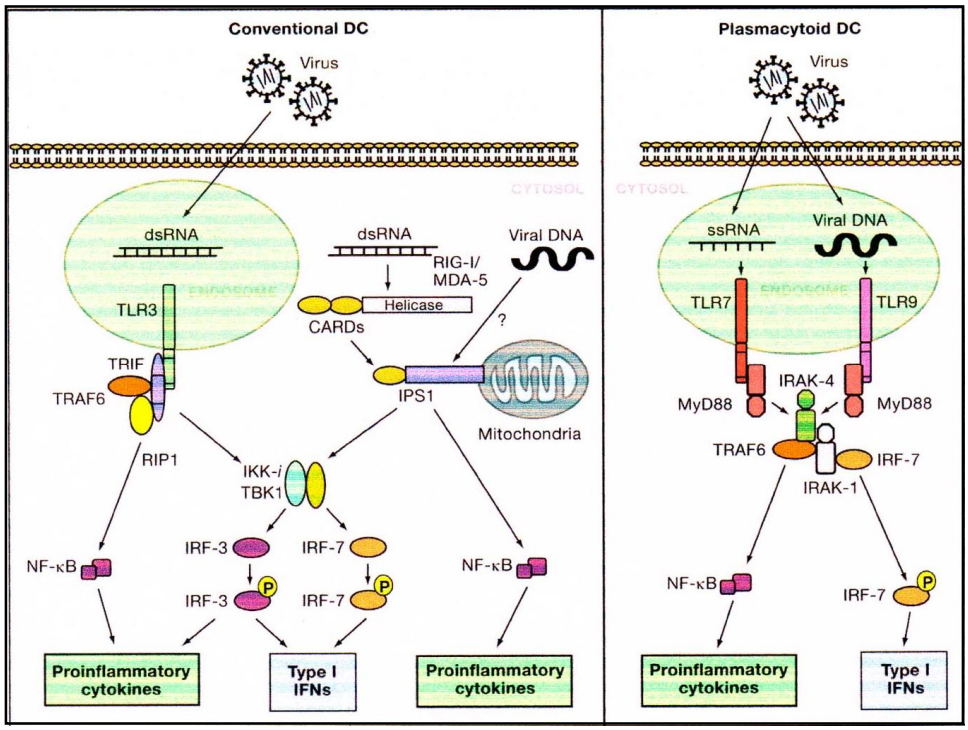


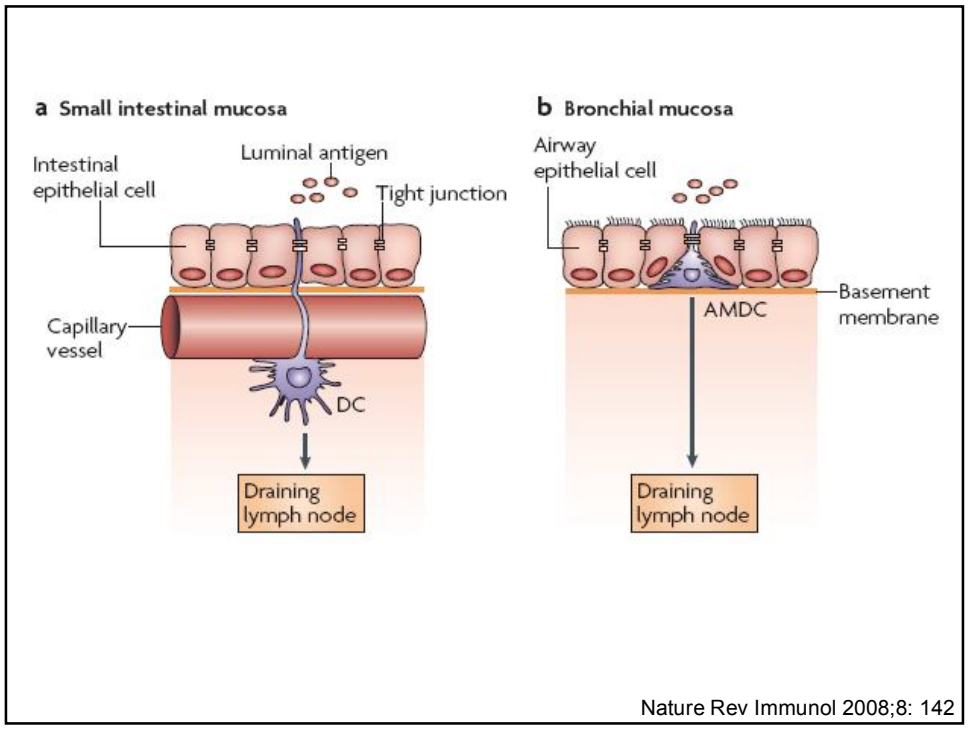


Nature 2006;7: 449


Influenza
Humoral immune response
Cellular immune response
B lymphocyte
Antigen/Virus
Ag
Dendritic cell
CD4
TCR
TCR
CD8
Antibody-secreting plasma cell
activated T helper (Th) cell
activated cytotoxic T cell (CTL)
CD4
Th effector cell
CTL effector cell
Killing of infected cell
Ag
Ag
Viral elimination
Cytokines
Infected epithelial cell

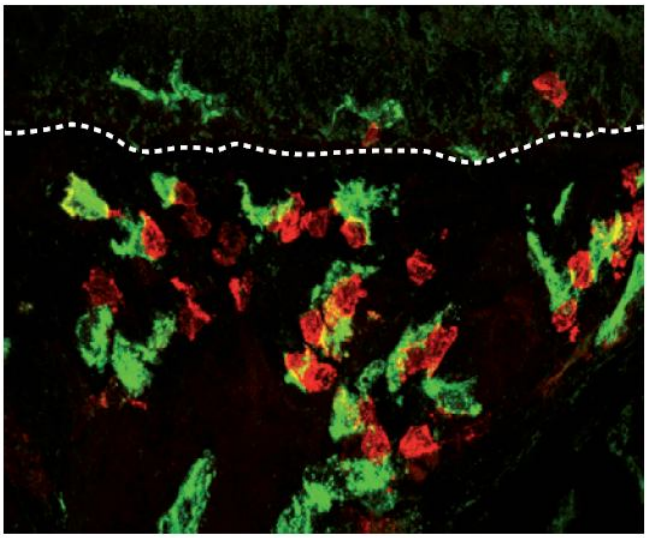

Haematopoietic stem cell
Precursor 1 (myeloid?)
Precursor 2 (lymphoid?)
Endogenous stimulus (cytokines)
CD34+ CLA+
CD34+ CLA−
?
Monocyte/pDC1
Plasmacytoid IPC/pDC2
Langerhans DC
Interstitial DC
Exogenous stimulus (microbial products)
Equivalent?
Activated Langerhans DC
Activated Interstitial DC
DC1
DC2



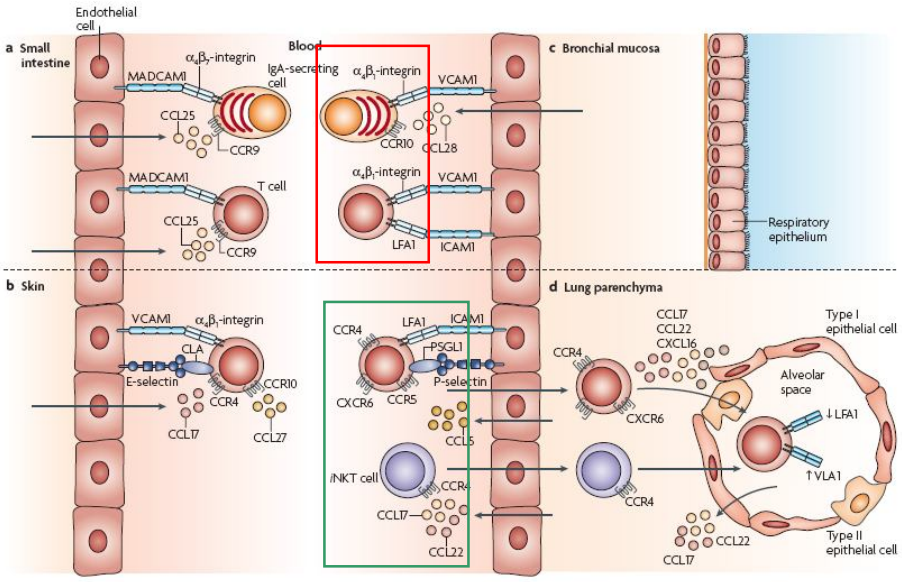


Nature Rev Immunol 2008;8: 142

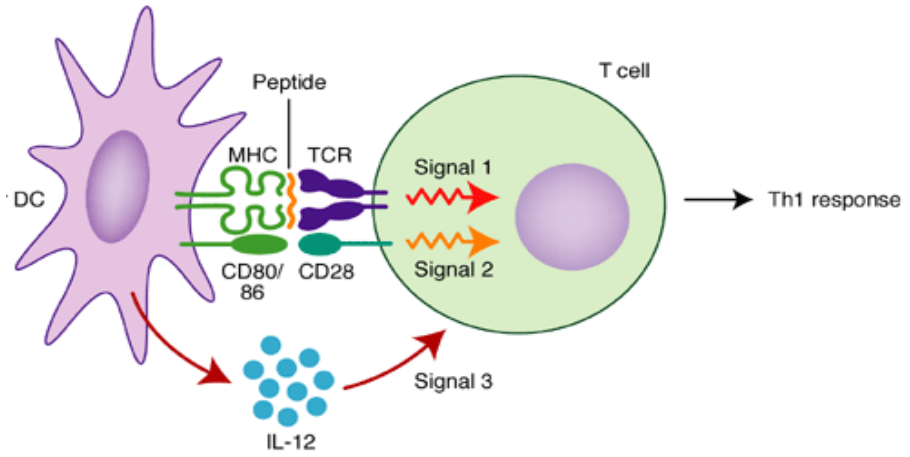
Trakeal mukozada DC ve T hücre dağılımı



Nature Rev Immunol 2008;8: 142



Nature Rev Immunol 2008;8: 142

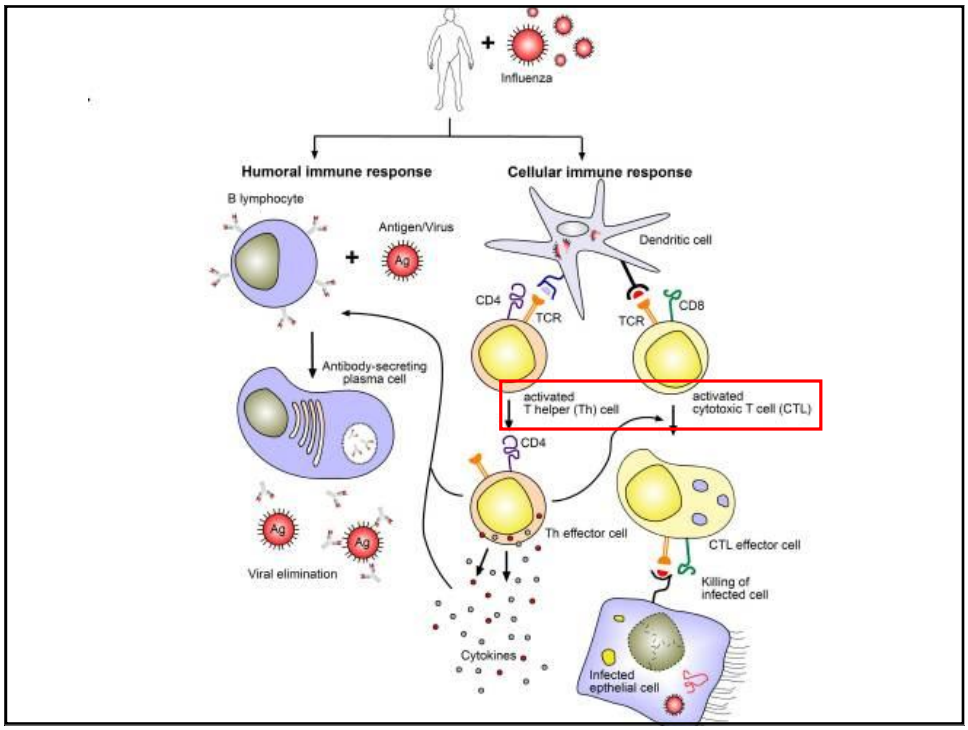


Airway epithelial cells modify immune responses by inducing an anti-inflammatory microenvironment

Anja K. Mayer, Holger Bartz*, Fabian Fey*, Lotte M. Schmidt and Alexander H. Dalpke*

The upper airways are prone to contact with pathogenic as well as non-pathogenic microbes, therefore immune recognition principles have to be tightly controlled. Here we show that human BEAS-2B bronchial epithelial cells inhibited secretion of the pro-inflammatory cytokines TNF-α and IL-12 by monocytes, macrophages and dendritic cells. This inhibitory effect could be transferred by supernatant of resting BEAS-2B cells and was also observed when primary murine tracheal epithelial cells were prepared. In contrast to inhibition of pro-inflammatory cytokine secretion epithelial cell-conditioned dendritic cells showed increased expression of IL-10 and arginase-1, thus displaying properties of alternative activation. Accordingly, Toll-like receptor-mediated up-regulation of CD40, CD86 and PD-L2 (CD273) on murine dendritic cells was reduced in the presence of bronchial epithelial cell supernatant. However, expression of negative regulatory PD-L1 (CD274) was increased and dendritic cell induced proliferation of T lymphocytes was diminished. Epithelial cells also showed a direct inhibitory effect on T lymphocyte proliferation and this was due to the constitutive secretion of TGF-β by bronchial epithelial cells. Moreover, epithelial cell-conditioned T lymphocytes showed increased differentiation towards IL-10-producing Tr1 cells. The results indicate that bronchial epithelial cells induce a non-inflammatory microenvironment that regulates local immune homeostasis.

Eur J Immunol 2008;38: 1689

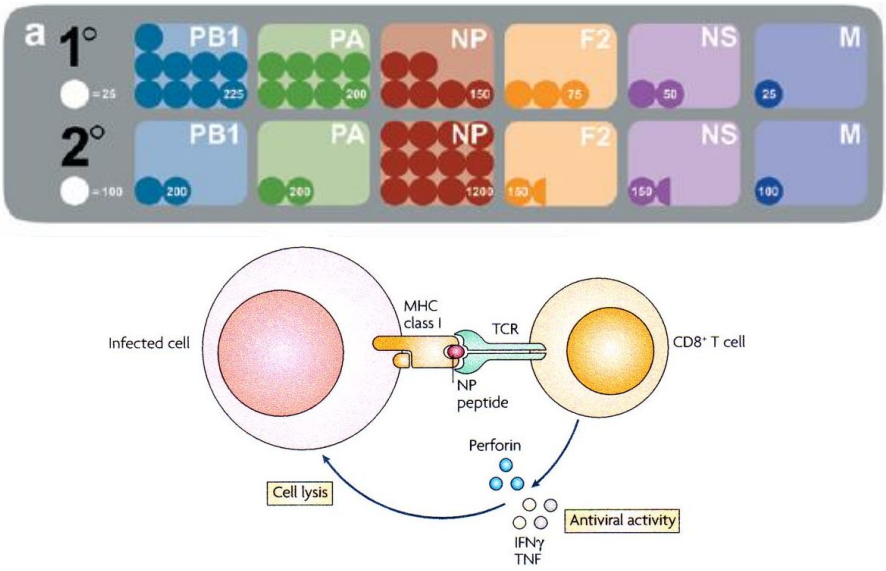


Influenza Enfeksiyonlarında T Lenfositlerinin İşlevleri

1- $CD4^+$ T hücreleri: - CD8'lere sitokin yardımı
- B lenfositlerine yardım
- İlk temasta gerekli değil (DC..)
- IFN-γ üretirler
- Sitotoksisite de yapar!

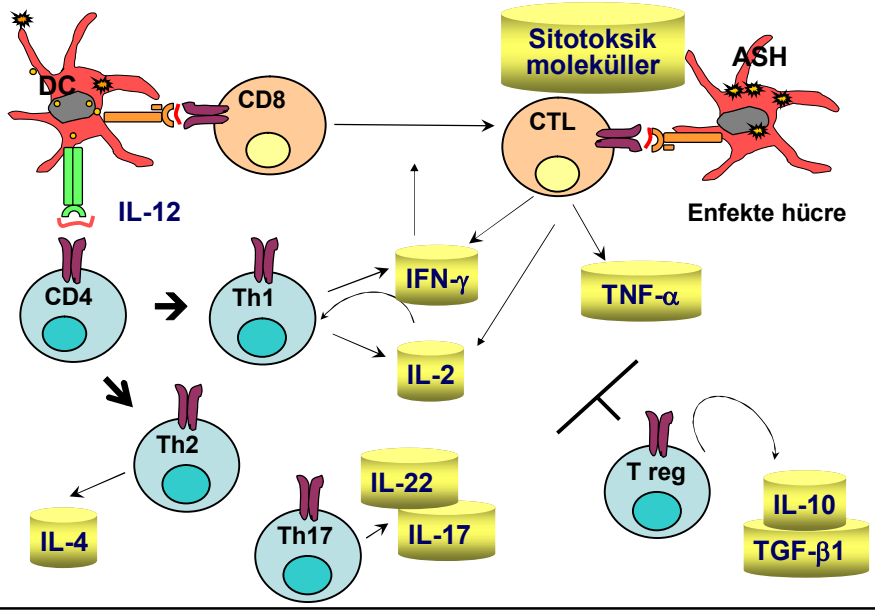
2- $CD8^+$ T hücreleri: - Enfeksiyonun 5-7. gününde
- Sitokin üretir+sitotoksisite yapar
- Çeşitli epitopları tanırlar
  * Primer – sekonder yanıtta farklı epitoplar ağırlıklı

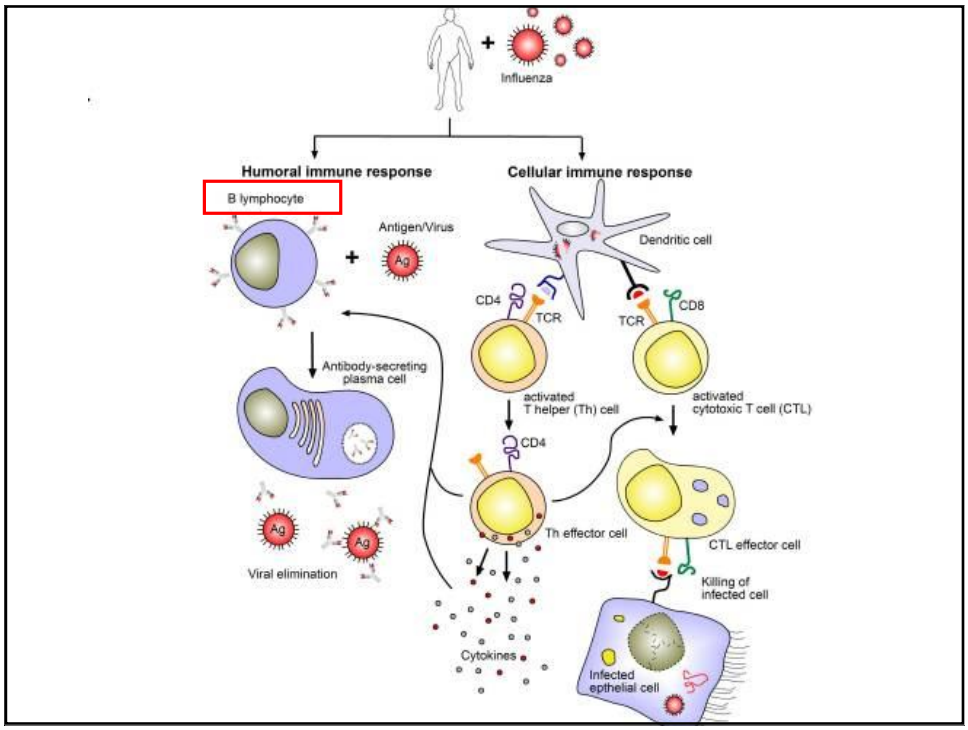
Influenza spesifik CD8⁺ T hücrelerinde epitop özgüllüğü

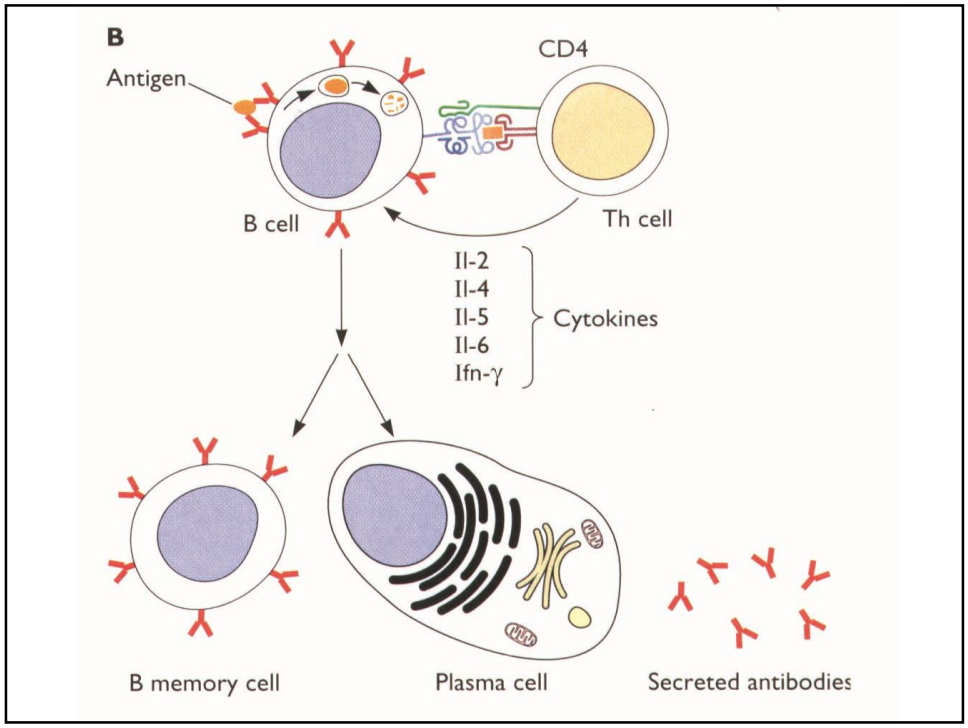


Nature Immunol 2006;7: 449

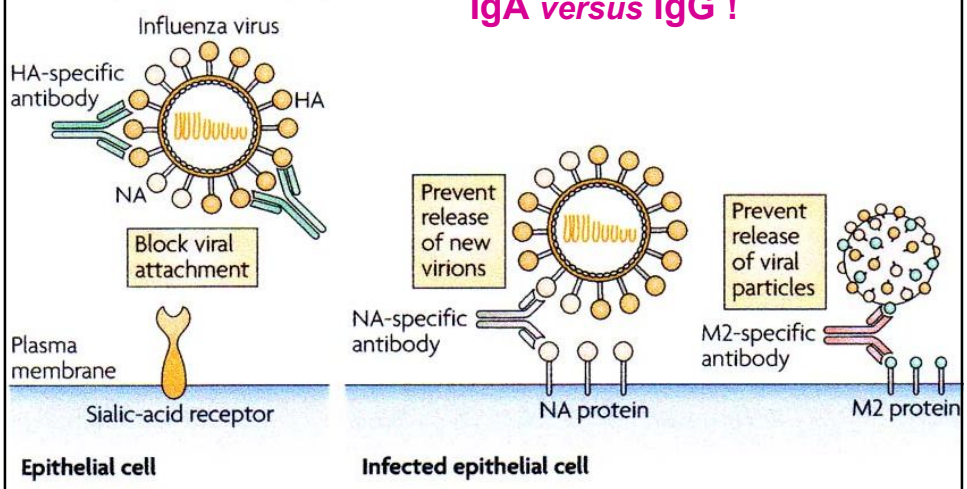
T Hücrelerinin Efektör işlevleri



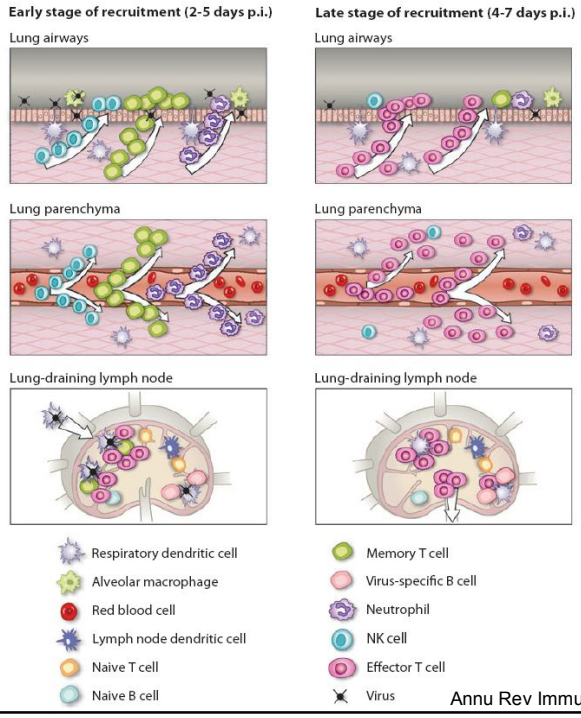

Influenza
Humoral immune response
Cellular immune response
B lymphocyte
Antigen/Virus
Ag
Dendritic cell
CD4
TCR
TCR
CD8
Antibody-secreting plasma cell
activated T helper (Th) cell
activated cytotoxic T cell (CTL)
CD4
Th effector cell
CTL effector cell
Killing of infected cell
Ag
Ag
Viral elimination
Cytokines
Infected epithelial cell


B
Antigen
CD4
B cell
Th cell
Il-2
Il-4
Il-5
Il-6
Ifn-γ
Cytokines
B memory cell
Plasma cell
Secreted antibodies

IgA *versus* IgG !

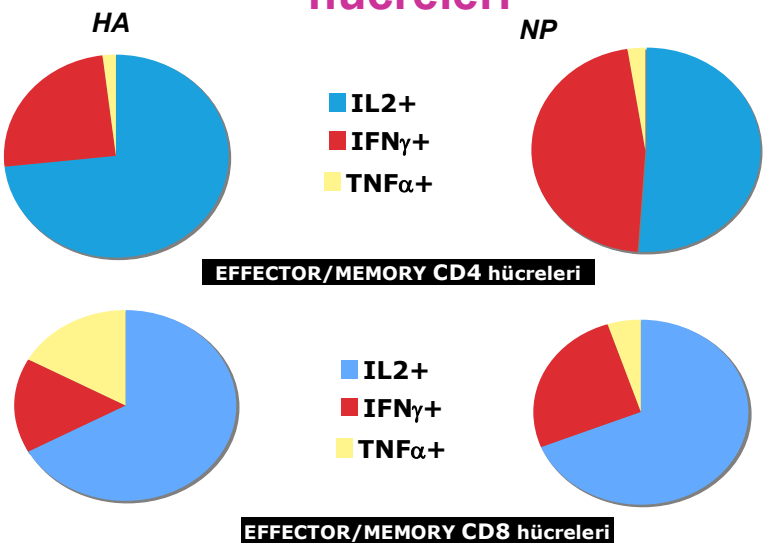


HÜCRELERİN BELLEK ÖZELLİĞİ



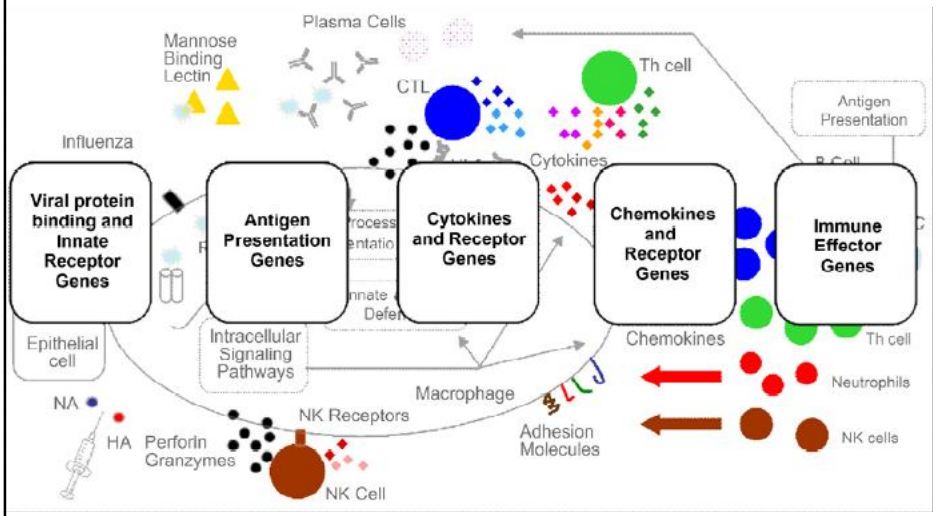
Annu Rev Immunol 2009;27: 61

Anti-Influenza özelliğindeki bellekli T hücreleri



Combadière et al.

INFLUENZA ENFEKSİYONLARINDA
Doğal Bağışıklık ve Edinsel yanıtta etkili Genler



Vaccine 2008;26S: D35

2009 Domuz Gribi Salgını ve Ülkemizdeki Durum

Prof. Dr. Selim Badur



News in Depth: Thain fires back at Bank of America

THE WALL STREET JOURNAL.

EUROPE

TUESDAY, APRIL

Global flu danger rises

U.S. issues travel advisory for Mexico and WHO raises warning level

By Betsy McKay

The number of confirmed cases of a deadly new strain of flu continued to rise Monday, as health officials took steps to limit its spread.

The U.S. issued a travel advisory for Mexico, urging Americans to avoid all "nonessential travel." The confirmed number of deaths there is now 26 and evidence emerged that the disease has spread to more regions of the country.

The U.S. Centers for Disease Control and Prevention and Mexico said 91 persons in the U.S. had been infected with the new A/H1N1 strain of swine flu, doubling the previous number. The 20 new cases, uncovered as a result of further testing rather than the spread of the virus, were all linked to the same outbreak at the Cristo Rey Jesuit High School in the Queens section of New York City where eight cases had already been identified. All 40 who were sick have recovered, said Richard Besser, the CDC's acting director.

Two people admitted to a Scottish hospital after traveling to Mexico were confirmed with the disease. Spain also confirmed one case.

A World Health Organization panel convened, accelerating a planned meeting by one day, and raised the public-health alert level to four from its current level of three, a move that confirms that the new swine flu virus can cause large outbreaks and urging governments to intensify pan-

Please turn to page 20

People wearing surgical masks due to Mexico's deadly swine flu outbreak gather after buildings in Mexico City were evacuated after the southern part of the country was hit by a 6.0-magnitude earthquake on Monday.

EU activates pandemic plans for swine flu

The first confirmed case of swine flu in the European Union, in Spain, prompted the bloc to activate plans drawn up in 2005 and 2006 during the avian flu crisis.

... have stockpiled billions of dollars worth of antiviral drugs meant for avian flu that could also be used to fight swine flu, for which there is no vaccine.

... EU officials said they four ... tions, all in travelers who returned from Mexico. Officials in the U.K., France, Sweden and Germany also are monitoring people with flu symptoms who have recently travelled to the U.S. or Mexico.

... mostly in Asia, since 2003. It didn't kill anybody in Europe, but forced the culling of millions of ...

The single confirmed case of swine flu in Spain is a 23-year-old student who had returned from Mexico on ...

... deadly flu preparations. The WHO panel had originally planned to meet Tuesday but instead convened Monday afternoon due to the growing number of confirmed cases and geographical spread, a WHO spokesman said. Dr. Besser of the CDC said relatively few cases of swine flu in the U.S., which he said are well under way. "Here we are acting aggressively," he said.

He said some schools in affected areas have been closed

Please turn to page 20



"Domuz" Gribi salgını: Neler oluyor?

Prof. Dr. Osman Şadi Yenen

FETHİYE – 24. ANKEM Kongresi'nde görüşlerine başvurduğumuz İÜ İstanbul Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD öğretim üyesi Prof. Dr. Osman Şadi Yenen, "domuz gribi" da şimdiye dek bilinmeyen yeni bir grip virüsüne rastlandığının bildirilmesiyle, dünya yeni bir salgınla karşı karşıya olduğu konusunda alarma geçti. İzleyen günlerde bilgiler hızla arttı. Meksika'nın üç kentinde (Mexico City, San Luis Potosi ve Mexicali) ortaya çıktığı anlaşıldı.

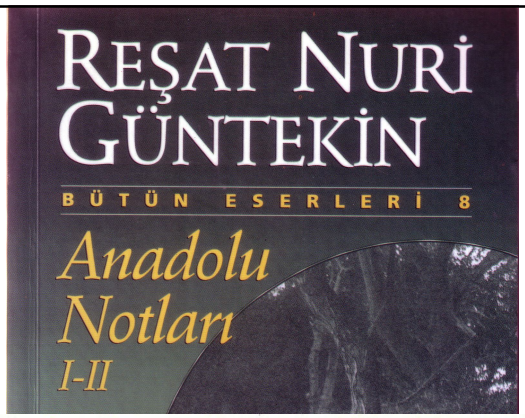
Olgulardan elde edilmiş virüs örneklerinin gen dizileme çalışmaları tamamlanmış olmasına rağmen, virüsün hangi tür ya da türlere özgü grip virüslerinden köken aldığına ilişkin yorumlamalar henüz tartışmalıdır. Bir gribi virüslerine ek olarak insan ve Amerika kıtası kanatlı grip virüslerinden de genetik izler taşıdığını belirtmektedirler. Bu tür araştırmalarda yorumlamalar kimi kez uzun sürdüğü ve kolay olmadığı için, tartışmalı olan bu konuda Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) ve CDC henüz resmi bir bildirimde bulunmamışlardır. Öte yandan, virüsün alışıldık domuz gribi virüslerinden önemli farklılıkları vardır.

Dünya Sağlık Örgütü: Hiçbir ülke güvenli değil

İnsandan insana yayılan domuz gribi salgını, Meksika'daki ölü sayısının 152'ye yükselmesi ve en az 18 ülkenin domuz gribi vakalarından şüphelendiğini açıklaması üzerine daha da derinleşti

Salgının kaynağı bu çocuk

Obama 1,5 milyar dolar istedi



Sonradan öğrendiğime göre şehir, her yıl, bu mevsimde, bu senekine benzememekle beraber, ufak tefek bir grip salgını geçirmiş. Sebep şu : Memleket yaz memleketi, güneş memleketi. Martı aşağı yukarı bizim illerin haziranına, hatta temmuzuna benziyor. Kendi haziranında, temmuzunda ise öyle günler oluyor ki havada uçan kuş vurulmuş gibi birdenbire sokağa düşüyor... Eski evlerin çoğu iklimin bu icaplarına göre yapılmış. Pencereler şehrin rüzgârlı ve se-

Grip, İstanbul gazetelerinin yazdığından çok fazlaydı.

Yerli gazetelerde çıkan listede ölüm vakaları yirmi, yirmi beş olarak gösteriliyordu. Demek ki her gün gripten ölenlerin sayısı kırk elliden aşağı değildi. Zaten bu, gözle de görülüyordu. Öğle ve ikindi saatlerinde Seyhan köprüsünden karşı kıyıdaki mezarlığa giden dizi dizi tabutlar uzaktan âdeta bir kervan manzarası gösteriyordu. Mektepler, sinemalar kapanmış, kahvelerle hamamların eli kulağında... Şehirde aksırıp öksürmeyen yok... Birçok kimselerin burun delikleri o sene yeni piyasaya çıkan *Pamflavin* damlalarından sapsarı... Portakal, limon bahçelerinin üstünde korkunç bir ölüm havası esiyor.

Tanımlar

Mevsimsel Grip

- İnsana adapte olmuş fakat her yıl mutasyonla değişime uğrayan influenza virüslerinin neden olduğu griptir.
(A: H1N1, H3N2; B)

Avian influenza "Kuş Gribi"

- Kanatlılarda görülen grip hastalığıdır. Kimi zaman sınırlı da olsa kanatlıdan insana da bulaşabilir ama insandan insana bulaş yok denecek kadar azdır.
(A: H5N1, H7N7…)

Pandemik Grip

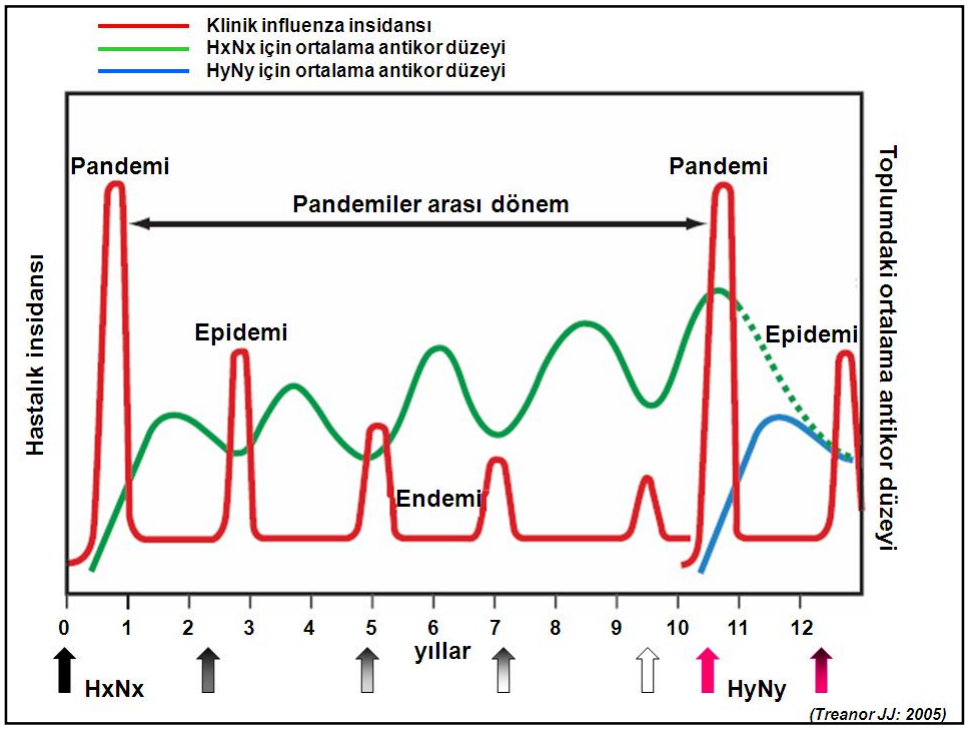
- Toplumda bağışıklığının çok az olduğu veya hiç olmadığı, yeni bir influenza virüs alt tipinin meydana getirdiği dünya genelinde gözlenen, morbidite ve mortalitesi yüksek grip tablosudur.
(A: H1N1, H2N2, H3N2…?)

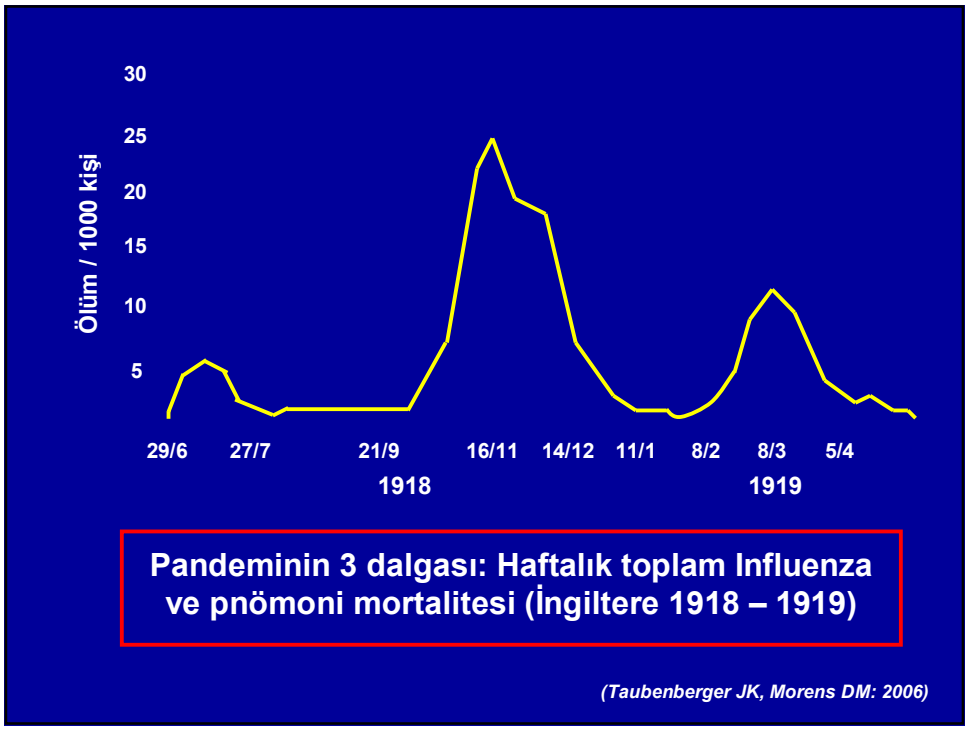
PANDEMİ ?

- Belli bir coğrafi bölgede ortaya çıkan enfeksiyon salgını dünya ölçeğinde yayılacak; çok sayıda birey enfekte olacak ve mortalite yükselecek
- Salgına yeni bir Influenza A subtipi, salgından hemen öncesinde varolan Influenza virüslerinden daha başka bir HA sahip subtip neden olacak; mutasyonlu virüslerden kaynaklanmayacak

INFLUENZA A: İnsanlar için risk

- **EN YÜKSEK RİSK: H1, H2, H3**
  İnsanlarda epidemiler ve pandemiler
- **YÜKSEK RİSK: H5, H6, H7, H9**
  İnsanlarda enfeksiyon yapar, yayılmaz: H5, H7, H9
  Evcil kanatlılarda enfeksiyon : H6
- **DÜŞÜK RİSK: H4, H10, H13**
  Memelilerde (domuz vb) ve/veya evcil kanatlılarda geçici infeksiyon
- **EN DÜŞÜK RİSK: H8, H11, H12, H14, H15, H16**
  Kümes hayvanlarında nadiren bulunurlar: H8, H11, H12
  Su kuşlarında nadiren bulunurlar: H8, H14, H15, H16





Pandeminin 3 dalgası: Haftalık toplam Influenza ve pnömoni mortalitesi (İngiltere 1918 – 1919)

(Taubenberger JK, Morens DM: 2006)

Domuz Influenza virüsleri

- Influenza A virüslerinin H1N1, H1N2, H1N3 ve H3N2 alt tipleri dünya ölçeğinde domuzlarda yaygındır (en yaygını H1N1)
- Virüslerinin çoğunluğu domuz ve/veya insan ve/veya kanatlı genlerinin yeni eşleşikleridir
- Domuzlarda çok bulaşıcı akut solunum hastalığı
- Yüksek hastalandırma oranı, düşük ölüm oranı (%1-4)
- Domuzlarda virüs: aerosoller ve dolaylı ya da dolaysız temasla bulaşır
- Avrupa'dakilerin antijenik ve genetik yapıları Kuzey Amerika'dakilerden farklıdır

1976'da ne oldu ?

- Grip semptomları gösteren 2 acemi erden Influenza A H1N1 (Sw) izole edildi
- Yaklaşık 230 enfekte hasta saptandı
- 13 askerde şiddetli solunum sistemi hastalığı gelişti, biri öldü
- Virüs sadece Ocak 19-Şubat 9 döneminde saptandı
- 1 Ekim-15 Aralık arasında 40 milyondan çok kişi aşılandı...



1976; aşılananlardan kimileri ölünce Başkan Gerald Ford toplumun korkusunu gidermek üzere aşılanıyor





Domuz gribi gündemdeyken şehre inen domuz yavrusu çocuklar tarafından dövülerek öldürüldü.

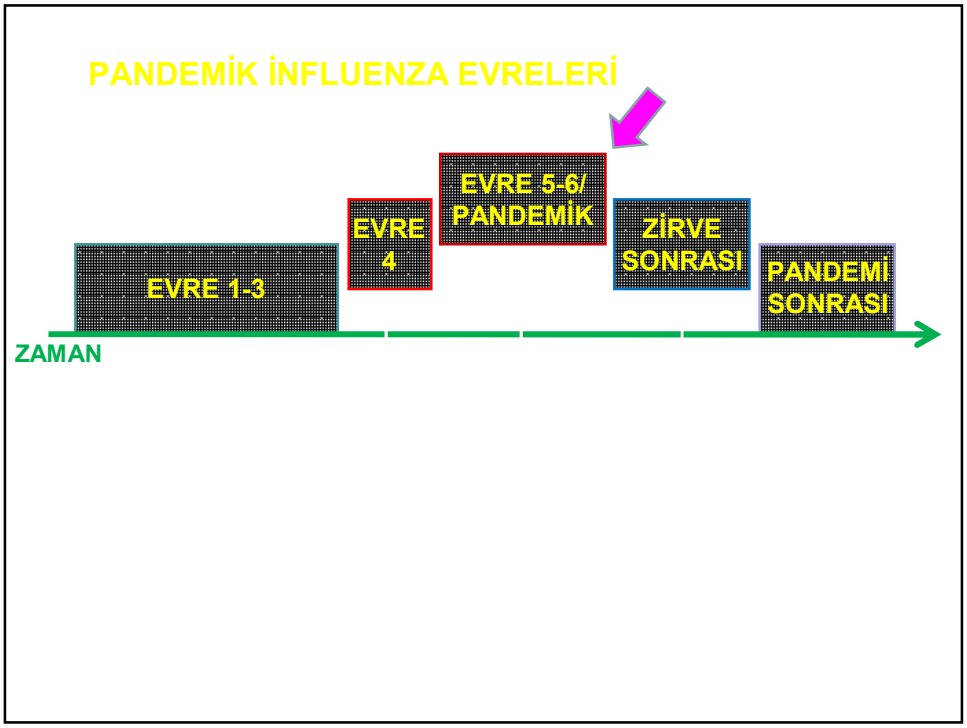
FOTOĞRAF: NAİL KAHRAMAN / DHA

Yavru domuza insan vahşeti 'bulaştı'

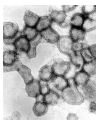
BURSA - Dünyada domuz gribi endişesi nin yaşandığı günlerde şehre inen yaban domuzu yavrusu sopalarla dövülerek öldürüldü. Bursa'nın merkez Osmangazi ilçesinin en yoğun semtlerinden olan Darmstad Caddesi üzerinde önceki akşam bir yavru yaban domuzu görüldü. Yavru domuzu fark eden madde bağımlısı çocuklar, kafasına sopalarla vurdu. Yere düşen yavru domuzun boynuna ip geçiren çocuklar, hayvanı bir otoparkın demirlerine bağladı.

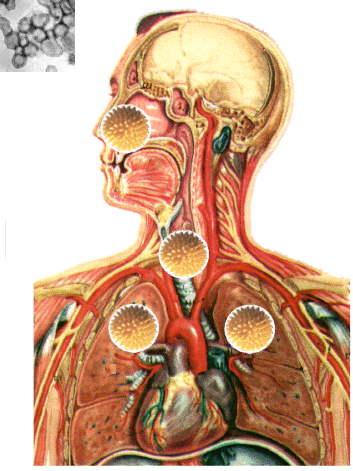
Vatandaşlar polise haber verdi. Ancak nöbetçi veteriner hekim olmadığı için olay yerine zabıta gönderildi. Bu sırada yavru domuz öldü. İki saat sonra gelen zabıtalar, yavru yaban domuzunun yaşayıp yaşamadığını ayaklarıyla vurarak kontrol ettikten sonra naylona sararak belediye aracının arkasına koydu. Gazetecilerin 'Domuz gribi' tehlikesine karşı neden önlem almadınız?' sorusuna karşılık, zabıtalar, "Yapacak bir şey yok. Nöbetçi veteriner hekim yok" dedi. (dha)

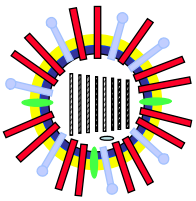



PANDEMİK İNFLUENZA EVRELERİ
EVRE 1-3
EVRE 4
EVRE 5-6/ PANDEMİK
ZİRVE SONRASI
PANDEMİ SONRASI
ZAMAN

İnsan Influenza virüsleri

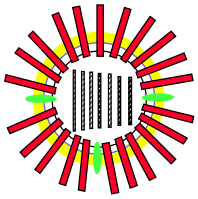






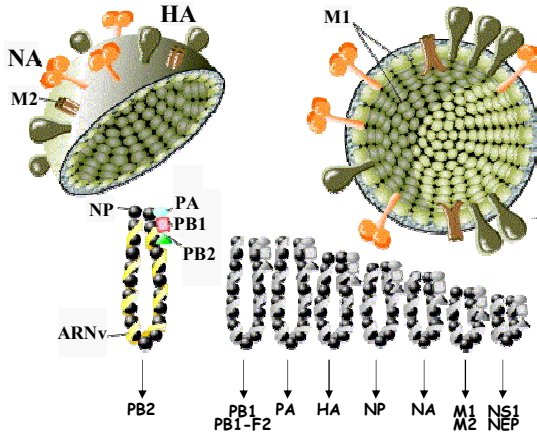
Tip *A*
sub-tip H1N1
sub-tip H3N2
Sub-tip H1N2

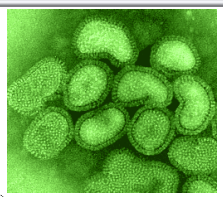
Tip B



Tip *C*

Influenza A virüsleri





9 NA
16 HA

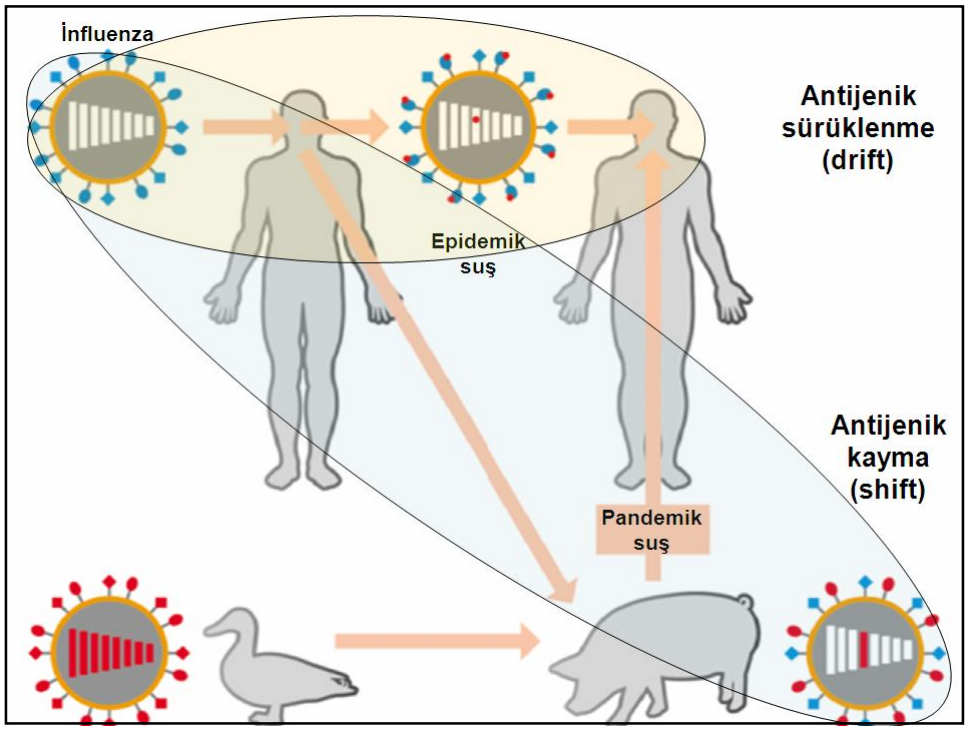
H1N1
H2N2
H3N2

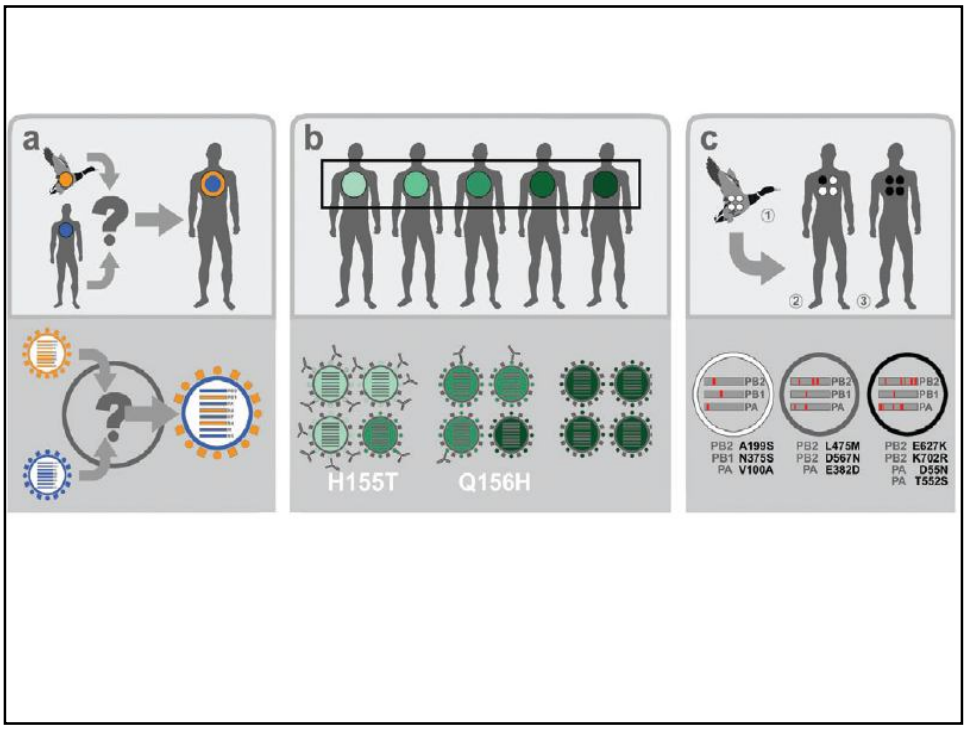
after Hatta *et al.*, 2002

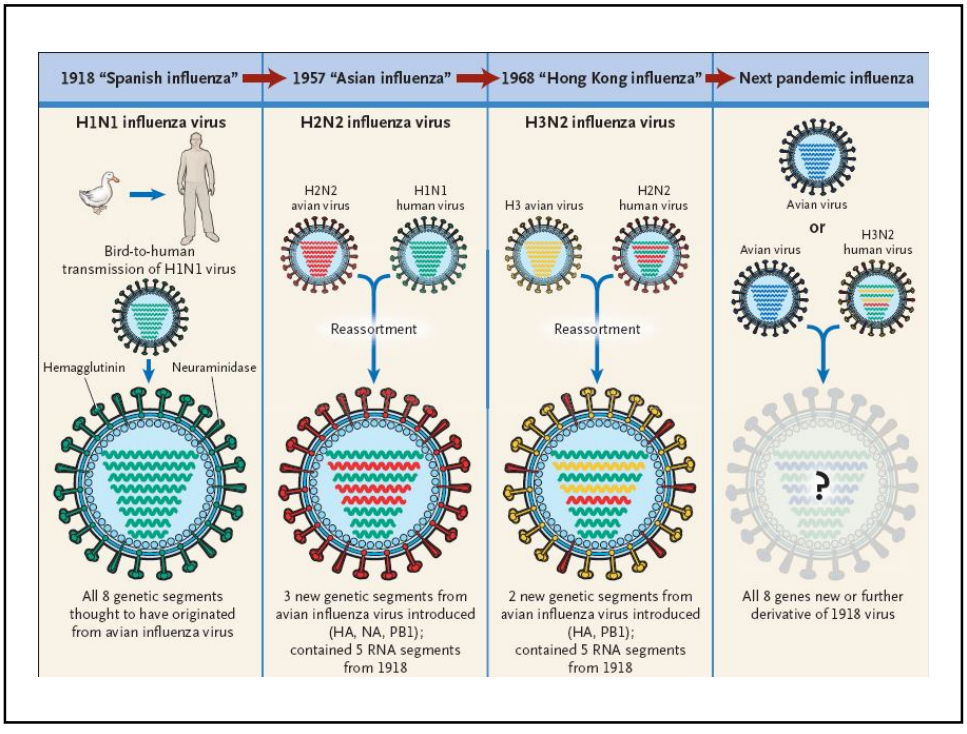
Tip A ve B:	8 segment; 2 glikoprotein	HA & NA
Tip C :	7 segment; 1 glikoprotein	HE

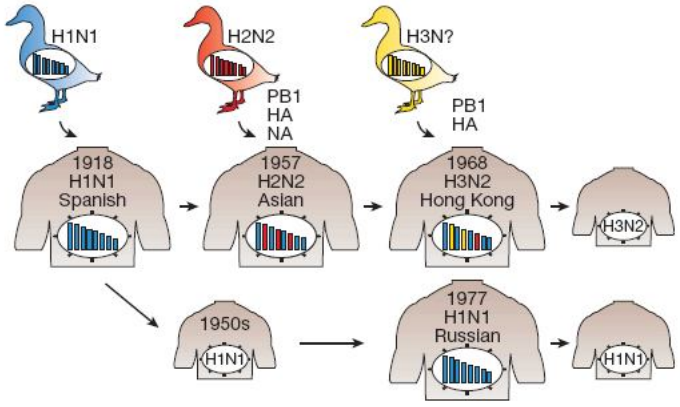
Influenza A yüzey antijenleri ve türlerdeki dağılımı

	Hemaglütinin tipleri															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
İnsan	X	X	X		!											
Domuz	X		X													
At			X				X									
Kuş	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	Nöraminidaz tipleri															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9							
İnsan	X	X														
Domuz	X	X														
At							X	X								
Kuş	X	X	X	X	X	X	X	X	X							

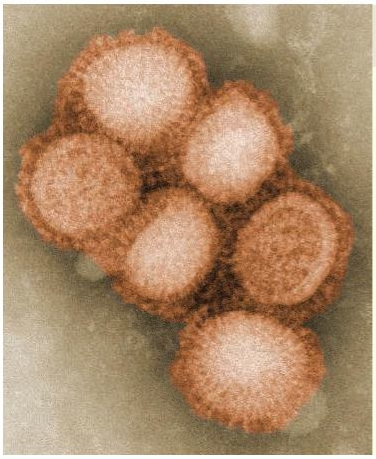


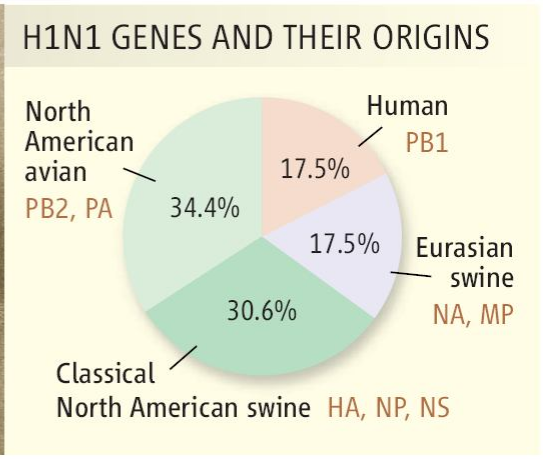

a
b
c
H155T
Q156H
PB2 A199S
PB1 N375S
PA V100A
PB2 L475M
PB2 D567N
PA E382D
PB2 E627K
PB2 K702R
PA D55N
PA T552S


1918 "Spanish influenza"
1957 "Asian influenza"
1968 "Hong Kong influenza"
Next pandemic influenza
H1N1 influenza virus
H2N2 influenza virus
H3N2 influenza virus
Bird-to-human transmission of H1N1 virus
Hemagglutinin
Neuraminidase
H2N2 avian virus
H1N1 human virus
H3 avian virus
H2N2 human virus
Reassortment
Avian virus
or
H3N2 human virus
All 8 genetic segments thought to have originated from avian influenza virus
3 new genetic segments from avian influenza virus introduced (HA, NA, PB1); contained 5 RNA segments from 1918
2 new genetic segments from avian influenza virus introduced (HA, PB1); contained 5 RNA segments from 1918
All 8 genes new or further derivative of 1918 virus

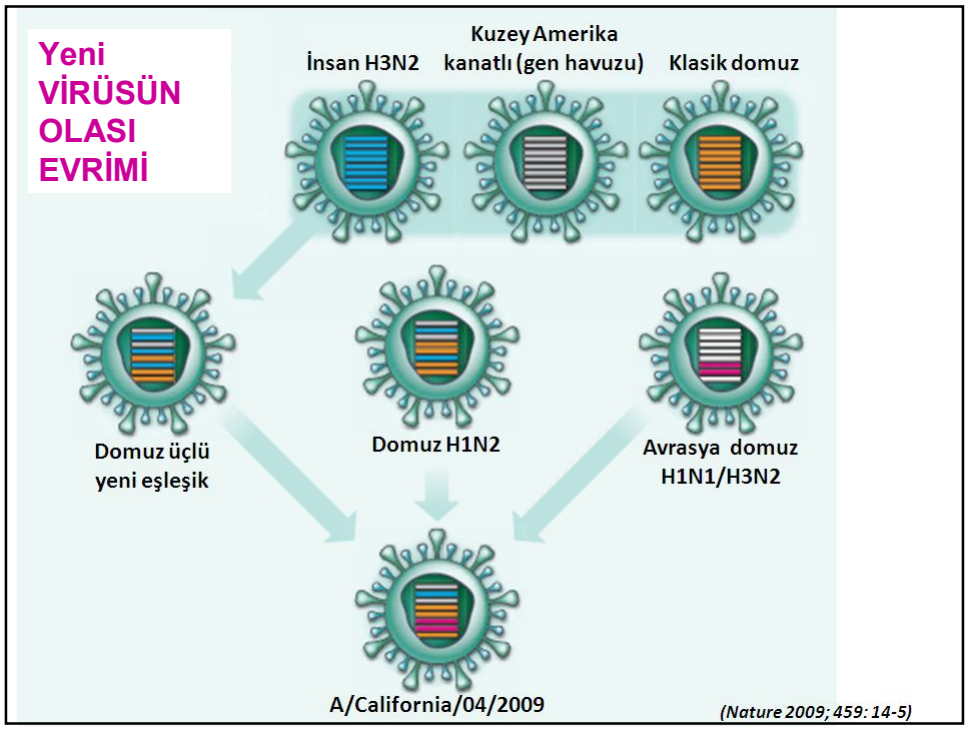


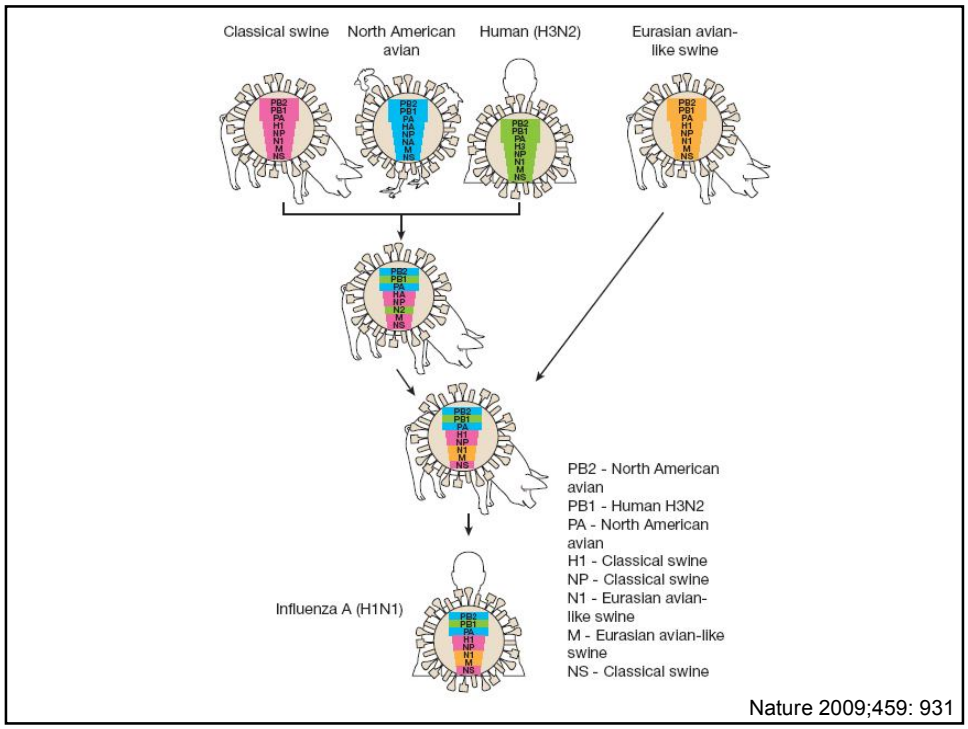
Nature 2009;459: 931



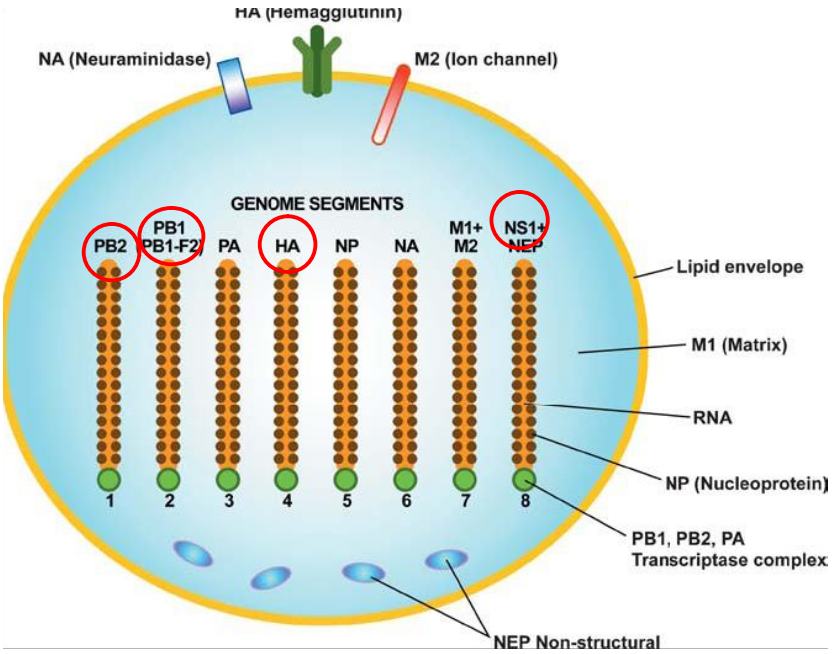


Science 2009; 324: 700


Yeni VİRÜSÜN OLASI EVRİMİ
Kuzey Amerika
İnsan H3N2
kanatlı (gen havuzu)
Klasik domuz
Domuz üçlü yeni eşleşik
Domuz H1N2
Avrasya domuz H1N1/H3N2
A/California/04/2009
(Nature 2009; 459: 14-5)


Classical swine
North American avian
Human (H3N2)
Eurasian avian-like swine
Influenza A (H1N1)
PB2 - North American avian
PB1 - Human H3N2
PA - North American avian
H1 - Classical swine
NP - Classical swine
N1 - Eurasian avian-like swine
M - Eurasian avian-like swine
NS - Classical swine
Nature 2009;459: 931

Patojeniteyi belirleyen gen bölgeleri



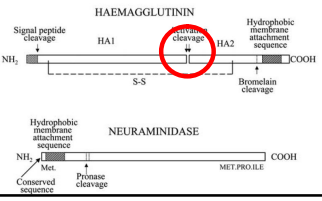
Inf. A suşlarının patojenitesinde rol oynayan gen bölgeleri

- **PB2**: Glu - Lys_{627}...
- **NS1**: Asp - Glu_{92} , (IFN etkisini bozarak...)
- **PB1-F2**: Asn - Ser
- **HA** : (PQRERRRKKRGLF) motifi

  Kırılma bölg. Proteazlaca kesilmesi belirleyici
  - **LPAI lerde** az sayıda bazik aa

    Enzimlerin etkisi zayıf, ..sadece sol+sindirim sisteminde.
  - **HPAI lerde** çok sayıda bazik aa

    Bu bölge fürin, PC6 gibi proteazlarca kesilir ve virus tüm vücuda yayılır.



Önemli suşlar ve patojenite ile ilgili gen bölge özellikleri

Suş	PB2 (627)	HA (kırılma noktası)	NS1 (92)
H1N1	Lys	Monobazik	Asp
H5N1/97	Lys/Glu	Mültibazik	Glu
H5N1/04	Lys	Mültibazik	5aa delesyon
H7N7	Lys	Mültibazik	Asp
H7N3	Glu	Mültibazik	As
Sw H1N1	Glu	Monobazik	Asp

Sorun yaratan etken domuzdaki Influenza virüslerinin özelliklerini almış, ve artık insandan-insana bulaşarak yayılan bir virüs.



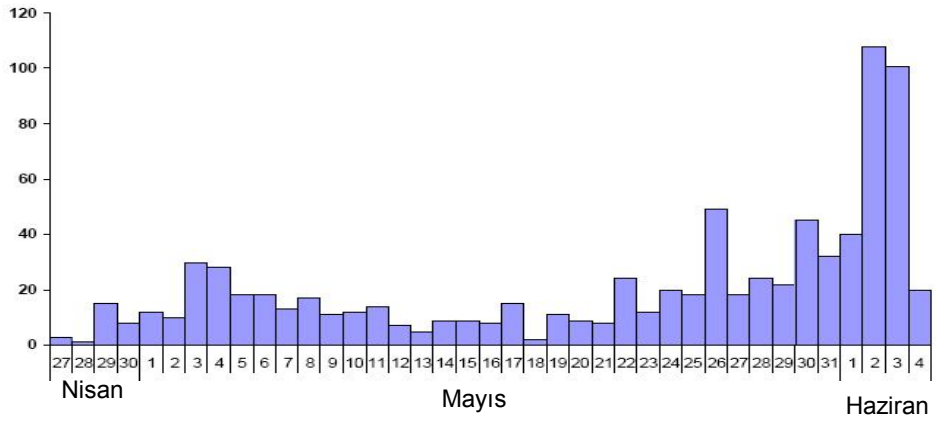
Bulaş: - hava yolundan
- hastalardan direkt yoldan
- kontamine olmuş eşya/yüzeylerden



Dünyada Son Durum (19.06.2009)

- Toplam 70 ülkede
- Olgu Sayısı: 44.287
- Ölüm: 180 (% 0,4)
- En yaygın Görüldüğü Ülkeler:
  - ABD: 17.855 (44 ölüm)
  - Meksika: 7.624 (113 ölüm)
  - Kanada: 4.905 (12 ölüm)
  - Japonya: 690 (0 ölüm)
  - Türkiye: 20 (0 ölüm)

Avrupa Birliği ve EFTA Ülkelerinde Konfirme Domuz Gribi Olgularının Bildirim Tarihine Göre Dağılımı, 27 Nisan - 4 Haziran 2009

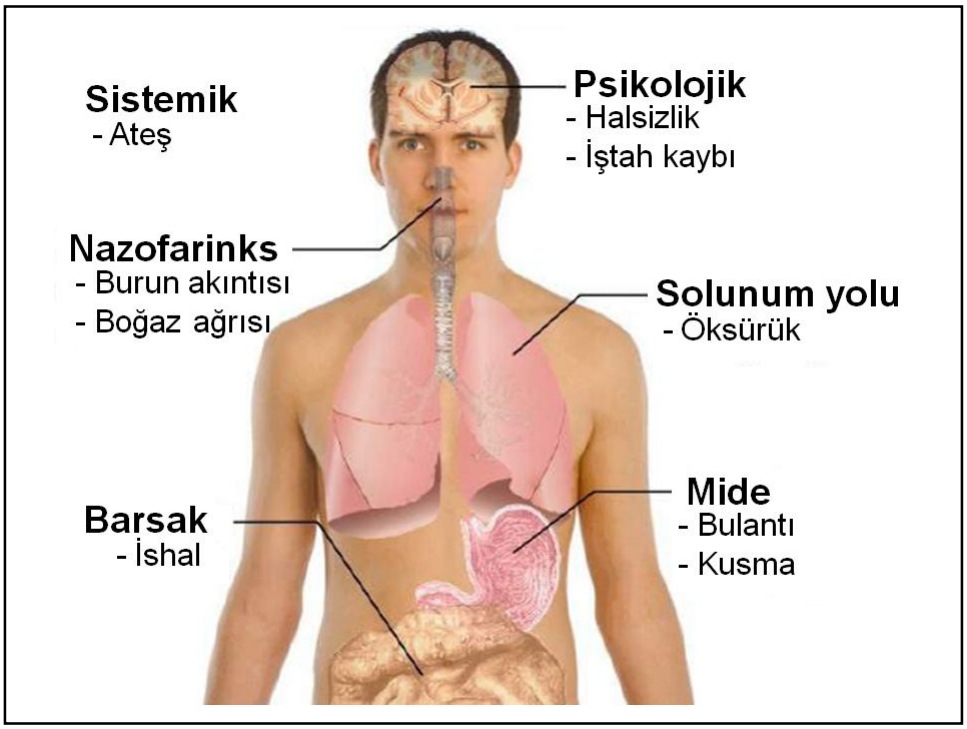


Kaynak: ECDC Situation Report Influenza A Infections Update 4 June 2009

Bildirimi Yapılan Domuz Gribi olgılarının epidemiyolojik Özellikleri

Yaş	**Çoğunlukla genç yaş grubu (<30 yaş) etkilenmektedir.** **Yaş grupları medyanı 16-25 yaş.** **Bütün Yaş grupları 3 ay-81 yaş.**
Cinsiyet	**Yaklaşık aynı (50/50)**
Klinik Atak Hızı	**Seçilmiş Gruplarda Yüksek Klinik Atak Hızı (Örn: 1996 öğrencide %33)**
İnkübasyon Süresi	**Medyan 3-4 gün (1-7 gün)**
Reprodüksiyon Sayısı (Ro)	**1,4 - 1,6**
Toplum Düzeyinde Yayılım	**Meksika ve ABD'de Konfirme Edildi.**

World Health Organization
Organisation mondiale de la Santé
Weekly epidemiological record
Relevé épidémiologique hebdomadaire



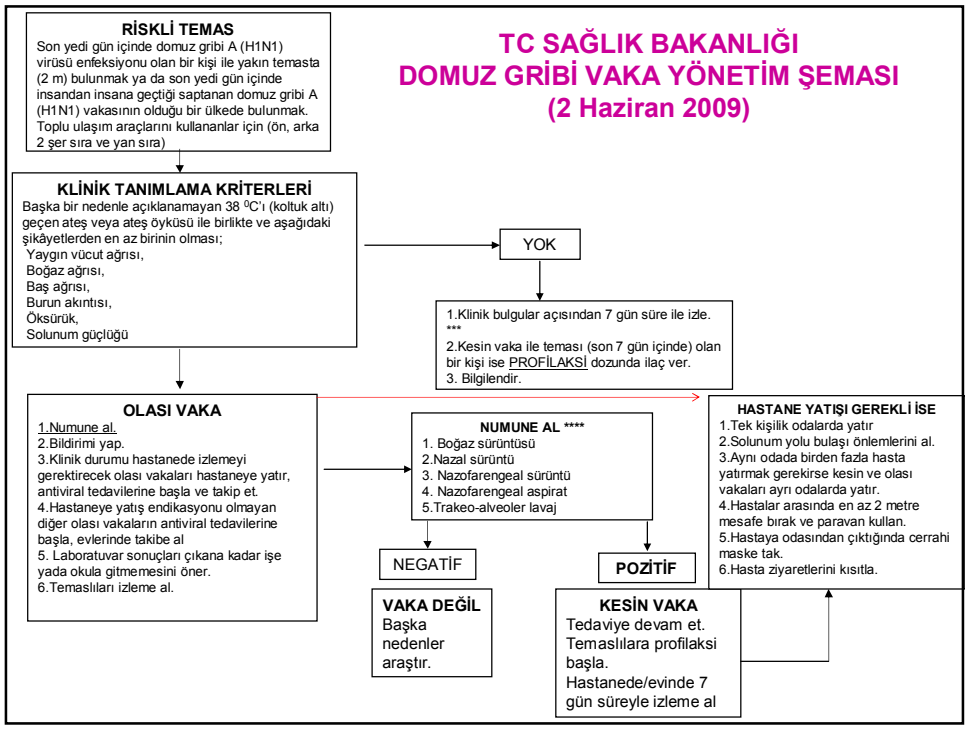
Bildirimi Yapılan Domuz Gribi olgularının klinik Özellikleri

Genel Klinik Özellikler	Etkilenen İnsanlarda Esas Olarak İnfluenza Benzeri Hastalık. Bazı ülkelerde **GIS semptomları** bildirilmiştir (Örn: ABD'de hastalığı ayakta geçirenlerin % 38'i)
Ağır Vakaların Klinik Özellikleri	Etkilenen ülkelerin çoğunda ağır vaka bildirilmemiştir. 65 yaş üstü bazı hastalarda pnömoni ve solunum yetmezliği. **Hastaneye yatırılarak tedavi edilen hastalarda nadir koenfeksiyon ve sekonder bakteriyel enfeksiyon.**
Hastane Yatışı	**Etkilenen ülkelerin çoğunda hastane yatışı yapılmamıştır.** **Kesin vakaların; Kanada ve ABD'de % 2-5'i,** **Meksika'da % 6'sı hastaneye yatırılarak tedavi edilmektedir.**
Hastalığın Ağır Seyretmesinde Altta Yatan Faktörler	**Kaliforniya'da hastaneye yatırılan hastaların % 64'ünde, Meksika'da ölen vakaların % 46'sında altta yatan başka tıbbi bir durum mevcut**. Kaliforniya'da hastaneye yatırılan hastaların % 17'si hamile.

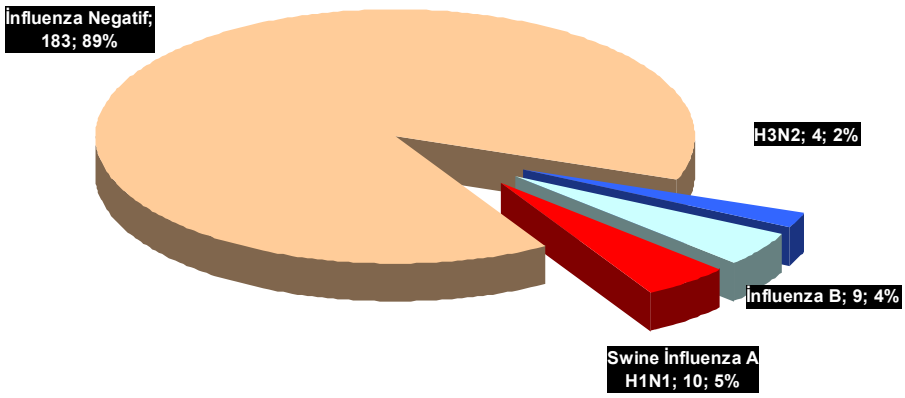
*Kaynak: World Health Organization Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire

Klinik Belirtiler	Yüzde (%)
Ateş	94
Öksürük	92
Boğaz Ağrısı	66
İshal	25
Kusma	25

**Kaynak: Emergence of a Novel Swine Origin Influenza A/H1N1 Virus in Humans, New England Journal of Medicine, 2009;360



Laboratuar Sürveyans Sonuçları (2 Haziran 2009)



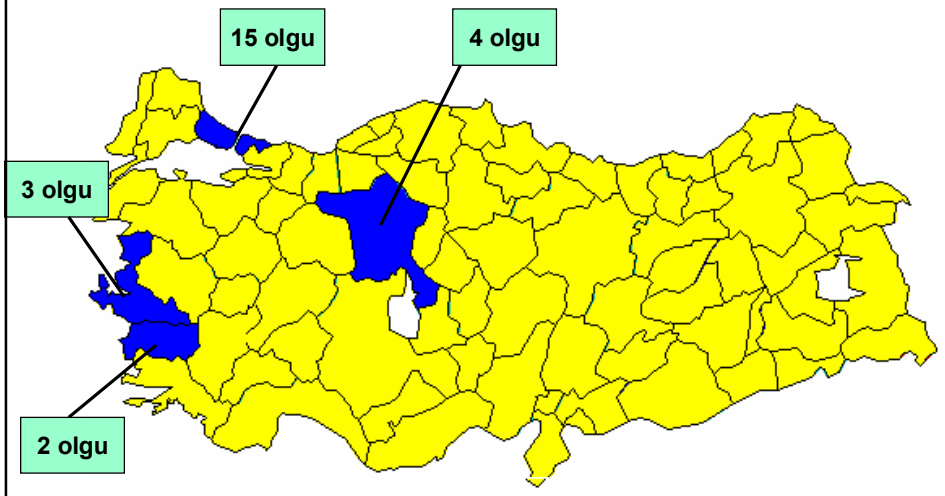
TOPLAM: 226 Numune

DOMUZ GRİBİ Ülkemizdeki Durum (22 Haziran 2009)

Olgu Görülen İl Sayısı: 4

- **Saptanan Toplam olgu Sayısı: 24**
- **Saptananların çoğunluğu importe olgulardır**
- **Olguların 2 tanesi termal kameralarda yüksek ateş tespit edilen kişilerdir.**
- **Olguların 4 tanesi ABD'de hekime başvurmuşlardır.**
- **Olguların:**
  - **12'si TC Vatandaşıdır.**
    - **11 olgu ABD'den,**
    - **1 olgu Kanada'dan gelmiştir.**
  - **8'i ABD, 1'i Kanada, 2'si Japonya, 1'i Danimarka vatandaşlarıdır**

Domuz Gribi Ülkemizdeki Durum



Dünya Sağlık Örgütü GRİP Referans Laboratuarları

ARM	Armenia			x
AUT	Austria			x
AZE	Azerbaijan			x
BLR	Belarus			x
BEL	Belgium	x		
BIH	Bosnia and Herzegovina 2x			x
BUL	Bulgaria			x
CRO	Croatia			x
CYP	Cyprus			x
CZH	Czech Republic		x	
DEN	Denmark		x	
EST	Estonia			x
FIN	Finland	x		
FRA	France		x (Paris NIC)	x (Lyon NIC)
GEO	Georgia		x	
DEU	Germany		x	
GRE	Greece x2		x (Athens)	x (Thessaloniki)
HUN	Hungary			x
ICE	Iceland		x	
IRE	Ireland		x	
ISR	Israel		x	
ITA	Italy		x	
KAZ	Kazakhstan			x
KGZ	Kyrgyzstan			x
LVA	Latvia			x
LTU	Lithuania		x	
LUX	Luxembourg		x	
MAT	Malta			
MNE	Montenegro			x
NET	Netherlands (2 labs)		x (NIC)	x (RIVM)
NOR	Norway	x		
POL	Poland			x
POR	Portugal	x		
MDA	Republic of Moldova			x
ROM	Romania			x
RUS	Russian Federation (4 labs)			x
SRB	Serbia			x
SVK	Slovakia	x		
SVN	Slovenia			x
SPA	Spain 3 NICs	x (Madrid)	2x	
SWE	Sweden			x
SWI	Switzerland		x	
TJK	Tajikistan			x
MKD	The former Yugoslav Republic of Macedonia			x
TUR	Turkey 2 labs		x (Istanbul)	x (NIC Ankara)
TKM	Turkmenistan			
UKR	Ukraine			x
UNK	United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland 4 labs		3x	x (Glasgow)
UZB	Uzbekistan			x

LABORATUVARLARA ÖRNEK GÖNDERECEK İLLERİN LİSTESİ

REFİK SAYDAM HIFZISIHHA MERKEZİ BAŞKANLIĞI VİROLOJİ LABORATUVARI	
1	Adana
2	Adıyaman
3	Ağrı
4	Amasya
5	Ankara
6	Artvin
7	Bingöl
8	Bitlis
9	Bolu
10	Çankırı
11	Çorum
12	Diyarbakır
13	Elazığ
14	Erzincan
15	Erzurum
16	Eskişehir
17	Gaziantep
18	Giresun
19	Gümüşhane
20	Hakkari
21	Hatay
22	Mersin
23	Kars
24	Kastamonu
25	Kayseri
26	Kırşehir
27	Konya
28	Malatya
29	Kahramanmaraş
30	Mardin
31	Muş
32	Nevşehir
33	Niğde
34	Ordu
35	Rize
36	Samsun
37	Siirt
38	Sinop
39	Sivas
40	Tokat
41	Trabzon
42	Tunceli
43	Şanlıurfa
44	Van
45	Yozgat
46	Zonguldak
47	Aksaray
48	Bayburt
49	Karaman
50	Kırıkkale
51	Batman
52	Şırnak
53	Bartın
54	Ardahan
55	Iğdır
56	Karabük
57	Kilis
58	Osmaniye

İSTANBUL Ü. İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ VİROLOJİ LABORATUVARI	
1	Afyonkarahisar
2	Antalya
3	Aydın
4	Balıkesir
5	Bilecik
6	Burdur
7	Bursa
8	Çanakkale
9	Denizli
10	Edirne
11	Isparta
12	İstanbul
13	İzmir
14	Kırklareli
15	Kocaeli
16	Kütahya
17	Manisa
18	Muğla
19	Sakarya
20	Tekirdağ
21	Uşak
22	Yalova
23	Düzce

DÜNYA SAĞLIK ÖRGÜTÜ ULUSAL İNFLUENZA MERKEZİ

İNFLUENZA A / H1N1 **ŞÜPHELİ VAKA BİLDİRİM FORMU**

HASTA KİMLİK BİLGİLERİ

TC Kimlik No											
Adı ve Soyadı											
Baba Adı											
Yaşı			Cinsiyet	☐ Erkek	☐ Kadın						
Adres / Telefon											
Meslek											
	GÜN		AY		YIL						
Şikayetlerin Başladığı Tarih											
Hastaneye Başvuru Tarihi											
Numune Alınma Tarihi											

HASTALIK BELİRTİLERİ	VAR	YOK
ATEŞ (^{0}C OLARAK BELİRTİNİZ)		
ÖKSÜRÜK		
MİYALJİ		
BAŞ AĞRISI		
NASAL AKINTI		
AKUT SOLUNUM YETMEZLİĞİ		
DİĞER		

ÖYKÜ	VAR	YOK
GRİP AŞISI YAPILMIŞ MI? NE ZAMAN (TARİH) ?		
EŞLİK EDEN HASTALIK VE/VEYA KOMPLİKASYON		
İŞ VEYA EV ORTAMINDA BENZER HASTALIK TABLOSU OLAN KİŞİ VAR MI? (TEMAS ÖYKÜSÜ)		
YURT DIŞI SEYAHAT ÖYKÜSÜ VAR MI? VAR İSE HANGİ ÜLKEYE?		
YURT DIŞI SEYAHAT ÖYKÜSÜ OLAN KİŞİ İLE TEMAS VAR MI? VAR İSE HANGİ ÜLKEDEN?		
DİĞER		

MATERYALİN CİNSİ	
NASAL SÜRÜNTÜ	
NASOFARİNGEAL SÜRÜNTÜ	
BOĞAZ SÜRÜNTÜSÜ	
DİĞER	

Hastane yada Sağlık Merkezi Adı	
Doktor Adı	
Telefon	
Faks	
E-Posta	

İstanbul Tıp Fakültesi Çalışmaları

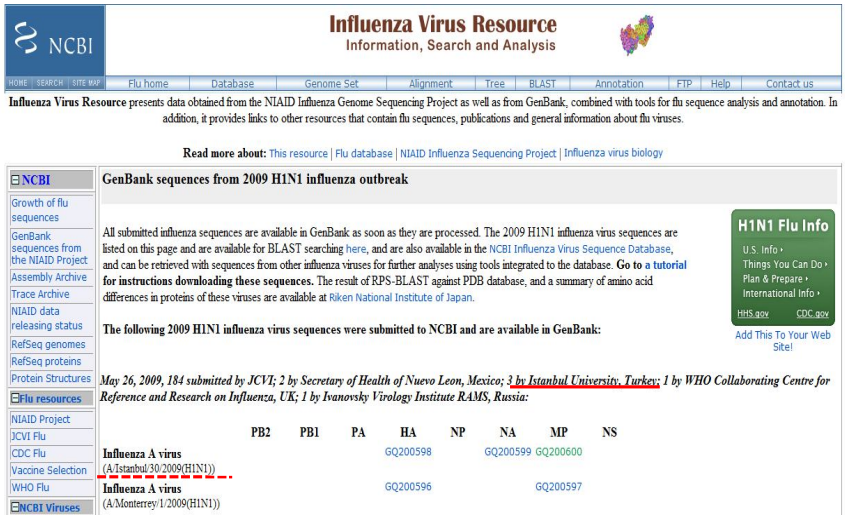
İncelenen Örnek Sayısı	>263
Pozitif Örnek Sayısı	18 (olgu RSHSM'de) Toplam: 24



1 Mayıs-16 Haziran 2009 Tarihleri arasında Gönderilen 225 Örnekten
15 Adet Swine A/H1N1 Pozitifliği Saptanmıştır (*: yabancı)

#	Örneğin Geliş Tarihi	İsim	Yaş	Geldiği Yer
1	14.05.2009	S.S.A*	26	İSTANBUL - HASEKİ
2	15.05.2009	Z.S.B*	57	İSTANBUL - HASEKİ
3	30.05.2009	A.Ö	11	İSTANBUL - KARTAL
4	30.05.2009	S.A	22	İZMİR ATATÜRK EAH
5	01.06.2009	F.A	28	İSTANBUL – HASEKİ
6	01.06.2009	G.Y	30	İSTANBUL - HASEKİ
7	04.06.2009	A.E.A	9	İSTANBUL - HASEKİ
8	07.06.2009	L.H.H*	36	İSTANBUL - HASEKİ
9	08.06.2009	S.G*	38	İSTANBUL - HASEKİ
10	11.06.2009	J.S*	2	İSTANBUL - HASEKİ
11	12.06.2009	A.A.S*	10	İSTANBUL - HASEKİ
12	12.06.2009	AL.A.S*		İSTANBUL - HASEKİ
13	14.06.2009	O.A.B	3.5	İSTANBUL - KARTAL
14	14.06.2009	T.T	74	İSTANBUL - KARTAL
15	16.06.2009	H.M.H*	51	İSTANBUL - HASEKİ

NCBI GenBankta yayınlanan genler
Influenza A virus (A/Istanbul/30/2009(H1N1))
Hemagglutinin (HA), Neuraminidase (NA) ve Matrix (MP) genleri



NCBI

Influenza Virus Resource
Information, Search and Analysis

HOME | SEARCH | SITE MAP | Flu home | Database | Genome Set | Alignment | Tree | BLAST | Annotation | FTP | Help | Contact us

Influenza Virus Resource presents data obtained from the NIAID Influenza Genome Sequencing Project as well as from GenBank, combined with tools for flu sequence analysis and annotation. In addition, it provides links to other resources that contain flu sequences, publications and general information about flu viruses.

Read more about: This resource | Flu database | NIAID Influenza Sequencing Project | Influenza virus biology

- NCBI
  - Growth of flu sequences
  - GenBank sequences from the NIAID Project
  - Assembly Archive
  - Trace Archive
  - NIAID data releasing status
  - RefSeq genomes
  - RefSeq proteins
  - Protein Structures
- Flu resources
  - NIAID Project
  - JCVI Flu
  - CDC Flu
  - Vaccine Selection
  - WHO Flu
- NCBI Viruses

GenBank sequences from 2009 H1N1 influenza outbreak

All submitted influenza sequences are available in GenBank as soon as they are processed. The 2009 H1N1 influenza virus sequences are listed on this page and are available for BLAST searching here, and are also available in the NCBI Influenza Virus Sequence Database, and can be retrieved with sequences from other influenza viruses for further analyses using tools integrated to the database. **Go to a tutorial for instructions downloading these sequences.** The result of RPS-BLAST against PDB database, and a summary of amino acid differences in proteins of these viruses are available at Riken National Institute of Japan.

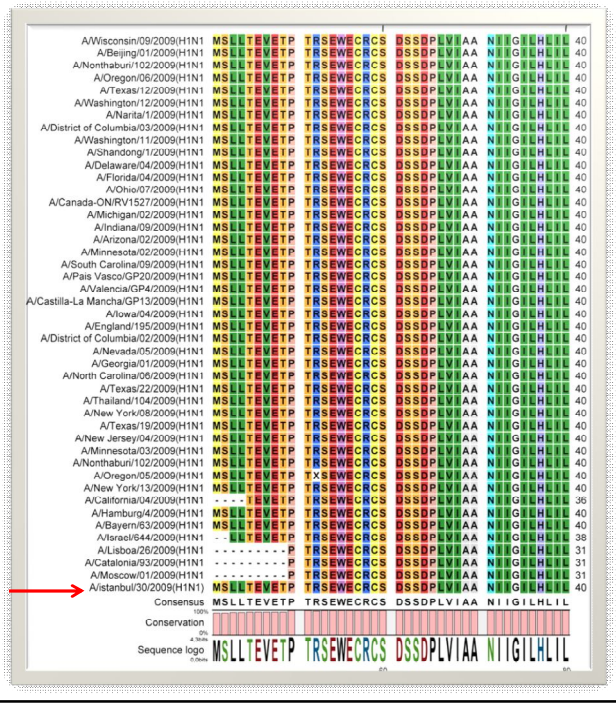
H1N1 Flu Info
U.S. Info ›
Things You Can Do ›
Plan & Prepare ›
International Info ›
HHS.gov CDC.gov
Add This To Your Web Site!

The following 2009 H1N1 influenza virus sequences were submitted to NCBI and are available in GenBank:

May 26, 2009, 184 submitted by JCVI; 2 by Secretary of Health of Nuevo Leon, Mexico; 3 by Istanbul University, Turkey; 1 by WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Influenza, UK; 1 by Ivanovsky Virology Institute RAMS, Russia:

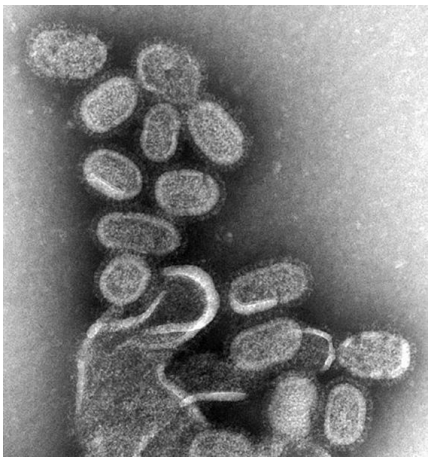
	PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	MP	NS
Influenza A virus (A/Istanbul/30/2009(H1N1))				GQ200598		GQ200599	GQ200600	
Influenza A virus (A/Monterrey/1/2009(H1N1))				GQ200596			GQ200597	

Swine-origine Influenza A virus (H1N1) Matrix 2 protein karşılaştırılması



PANDEMİ İZLEME BİLİM KURULU TOPLANTISI

5 Haziran 2009



ÜLKEMİZDE YAPILANLAR-1

1- Ulusal Faaliyet Planı gözden geçirildi ve DSÖ tarafından yeni yayınlanan rehber doğrultusunda revizyonu tamamlandı.

2- İlaç ve malzeme ihtiyaç planları gözden geçirildi.

– Tedavi ve korunmada kullanmak için;
  - 1.200.000 kutu Oseltamivir stoku 2.000.000'a
  - 1.000 kutu Zanamivir stoku 113.000'e çıkarılmıştır.
  - İllere ilk müdahale için gerekli sevkıyat yapılmıştır.

– Sağlık personeli için 400.000 set koruyucu kit temin edilmiştir.
(Bir koruyucu kitte; 5 adet maske, 5 çift eldiven, 500 cc el dezenfektanı, bir adet gözlük ve 5 çift galoş bulunmaktadır)

- 5.000.000 basit cerrahi maske satın alınmıştır.

146

ÜLKEMİZDE YAPILANLAR-2

3- Ülkemizde 2005 yılından bu yana yürütülmekte olan mevsimsel influenza sürveyansı 14 ilde yapılıp yaz döneminde sürveyansa ara verilmesi gerekirken, Bilim Kurulu kararı ile uygulama 81 ile tüm yıl olacak şekilde yaygınlaştırılmıştır.

4- Uluslararası havaalanlarında, limanlarda ve kara hudut kapılarında gerekli önlemler alınmıştır;

- Sağlık beyanı mecburiyeti,
- Sağlık kontrolü,
- Termal kamera ve ateş ölçerlerle ısı ölçümü,
- Yolcuların ve uçuş personelinin bilgilendirilmesi,
- Şüpheli durumlarda izolasyon tedbirleri ve numunelerin alınması.

147

ÜLKEMİZDE YAPILANLAR-3

5- Afiş, broşür, TV spotu hazırlanmış olup tüm iletişim mecralarında kampanya şeklinde bilgilendirme yapılacaktır. Bu amaçla;

- 500 bin adet afiş
- 15 bin (yurtdışı giriş çıkış noktalarında kullanılmak üzere) İngilizce-Türkçe afiş,
- 2 milyon adet el broşürü,
- 3 adet TV, 3 adet radyo spotu hazırlanmıştır.

- Kampanyanın ana teması, **el yıkama** ile öksürük ve hapşırık sırasında ağız ve burnun tek kullanımlık **mendil ile kapatılma**sıdır.





T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
HUDUT VE SAHİLLER
SAĞLIK GENEL MÜDÜRLÜĞÜ

Influenza A (H1N1)

Influenza A/H1N1 (domuz gribi) nedir?
Domuz gribi, **İnfluenza A/H1N1** tipi grip virüsünün sebep olduğu genellikle domuzlarda hastalığa yol açan çok bulaşıcı gribal bir enfeksiyondur. Virüs, domuzlarda görülmekte ve onlardan insanlara bulaşabilmektedir.

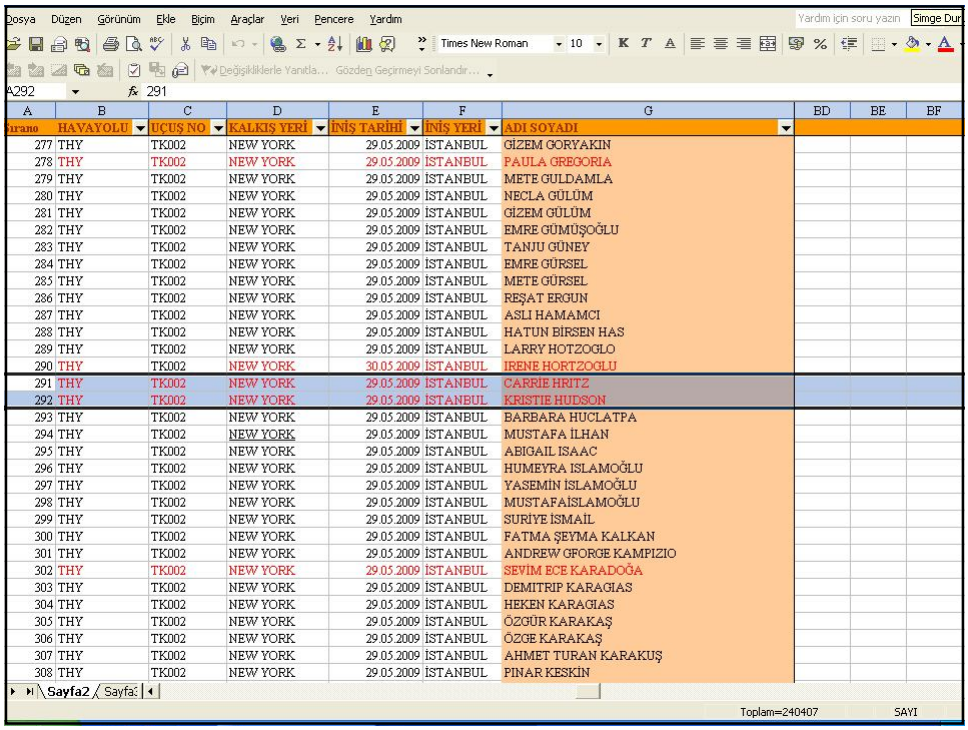
Influenza A/H1N1 (domuz gribi) belirtileri nelerdir, hastalandığınızı nasıl anlarsınız? Domuz gribi belirtileri, insanlarda görülen diğer gribal enfeksiyonlarda olduğu gibi;



REPUBLIC OF TURKEY
HEALTH DECLARATION CARD
(IMPORTANCE NOTICE)

T.C.
SAĞLIK DEKLARASYON KARTI
(ÖNEMLİDİR)

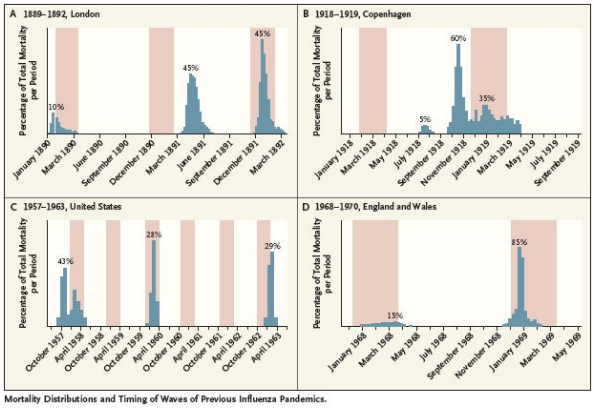
Complete every item in this health declaration card and submit it to the officer in charge **(Bu Sağlık Deklarasyon Kartındaki bölümlerin tamamını doldurun ve görevliye teslim edin.)**
Full Name as it appears in passport/travel document: **Pasaport/Seyahat belgesindeki tüm isim:** Selim BADUR
Nationality (**Uyruğu**): TC
Passport/NRIC No. (**Pasaport numarası**): U7728306 78



A	B	C	D	E	F	G	BD	BE	BF
Sıra no	HAVAYOLU	UÇUŞ NO	KALKIŞ YERİ	İNİŞ TARİHİ	İNİŞ YERİ	ADI SOYADI			
277	THY	TK002	NEW YORK	29.05.2009	İSTANBUL	GİZEM GORYAKIN			
278	THY	TK002	NEW YORK	29.05.2009	İSTANBUL	PAULA GREGORIA			
279	THY	TK002	NEW YORK	29.05.2009	İSTANBUL	METE GULDAMLA			
280	THY	TK002	NEW YORK	29.05.2009	İSTANBUL	NECLA GÜLÜM			
281	THY	TK002	NEW YORK	29.05.2009	İSTANBUL	GİZEM GÜLÜM			
282	THY	TK002	NEW YORK	29.05.2009	İSTANBUL	EMRE GÜMÜŞOĞLU			
283	THY	TK002	NEW YORK	29.05.2009	İSTANBUL	TANJU GÜNEY			
284	THY	TK002	NEW YORK	29.05.2009	İSTANBUL	EMRE GÜRSEL			
285	THY	TK002	NEW YORK	29.05.2009	İSTANBUL	METE GÜRSEL			
286	THY	TK002	NEW YORK	29.05.2009	İSTANBUL	REŞAT ERGUN			
287	THY	TK002	NEW YORK	29.05.2009	İSTANBUL	ASLI HAMAMCI			
288	THY	TK002	NEW YORK	29.05.2009	İSTANBUL	HATUN BİRSEN HAS			
289	THY	TK002	NEW YORK	29.05.2009	İSTANBUL	LARRY HOTZOGLO			
290	THY	TK002	NEW YORK	30.05.2009	İSTANBUL	IRENE HORTZOGLU			
291	THY	TK002	NEW YORK	29.05.2009	İSTANBUL	CARRIE HRITZ			
292	THY	TK002	NEW YORK	29.05.2009	İSTANBUL	KRISTIE HUDSON			
293	THY	TK002	NEW YORK	29.05.2009	İSTANBUL	BARBARA HUCLATPA			
294	THY	TK002	NEW YORK	29.05.2009	İSTANBUL	MUSTAFA İLHAN			
295	THY	TK002	NEW YORK	29.05.2009	İSTANBUL	ABIGAIL ISAAC			
296	THY	TK002	NEW YORK	29.05.2009	İSTANBUL	HUMEYRA ISLAMOĞLU			
297	THY	TK002	NEW YORK	29.05.2009	İSTANBUL	YASEMİN İSLAMOĞLU			
298	THY	TK002	NEW YORK	29.05.2009	İSTANBUL	MUSTAFAİSLAMOĞLU			
299	THY	TK002	NEW YORK	29.05.2009	İSTANBUL	SURİYE İSMAİL			
300	THY	TK002	NEW YORK	29.05.2009	İSTANBUL	FATMA ŞEYMA KALKAN			
301	THY	TK002	NEW YORK	29.05.2009	İSTANBUL	ANDREW GFORGE KAMPIZIO			
302	THY	TK002	NEW YORK	29.05.2009	İSTANBUL	SEVİM ECE KARADOĞA			
303	THY	TK002	NEW YORK	29.05.2009	İSTANBUL	DEMITRIP KARAGIAS			
304	THY	TK002	NEW YORK	29.05.2009	İSTANBUL	HEKEN KARAGIAS			
305	THY	TK002	NEW YORK	29.05.2009	İSTANBUL	ÖZGÜR KARAKAŞ			
306	THY	TK002	NEW YORK	29.05.2009	İSTANBUL	ÖZGE KARAKAŞ			
307	THY	TK002	NEW YORK	29.05.2009	İSTANBUL	AHMET TURAN KARAKUŞ			
308	THY	TK002	NEW YORK	29.05.2009	İSTANBUL	PINAR KESKİN			

Tartışılan konular-1

- **Etkenin patojenitesi?/bulaş özelliği?**
- **Mortalite oranı?**
- **2., 3. dalgalar ne getirecek?**



Mortality Distributions and Timing of Waves of Previous Influenza Pandemics.

Tartışılan konular-2

- Güney yarım kürede mevsim yeni başlıyor !!!
- Oseltamivire karşı “direnç” gelişme olasılığı !!!
- En kötü senaryo: H5N1 ile karşılaşması !!!
- Maske ve diğer önlemler:



Pandemiye hazırlık…

- Sürveyans ve tanı
- Sosyal mesafe
- Antivirallerin kullanımı (direnç izlemi)
- Pandemik aşıların üretimi (biyolojik esnek üretim)
- Erişilebilirlikte adalet (!)





ANTİVİRAL TEDAVİ

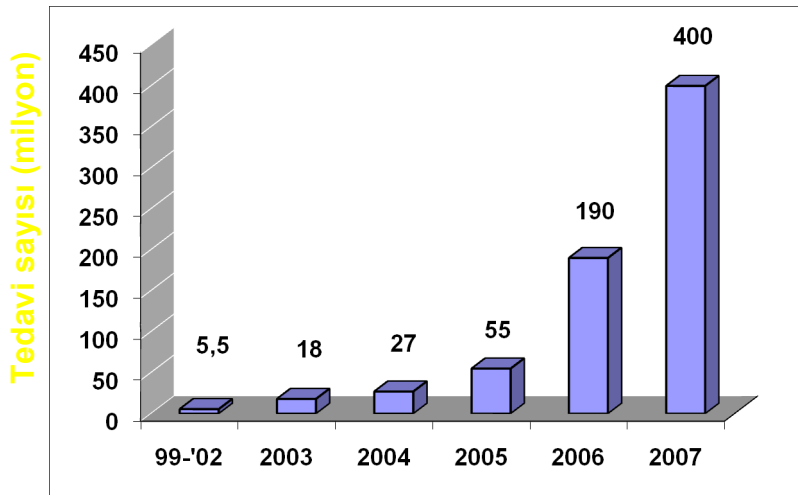
ADAMANTANLAR

- **Amantadin (*Symmetrel*)**
- **Rimantadin (*Flumadin*)**

NÖRAMİNİDAZ İNHİBİTÖRLERİ

- **Zanamivir (Relenza)**
- **Oseltamivir (*Tamiflu*)**
- **[Peramivir]**

Tamiflu üretim kapasitesi…

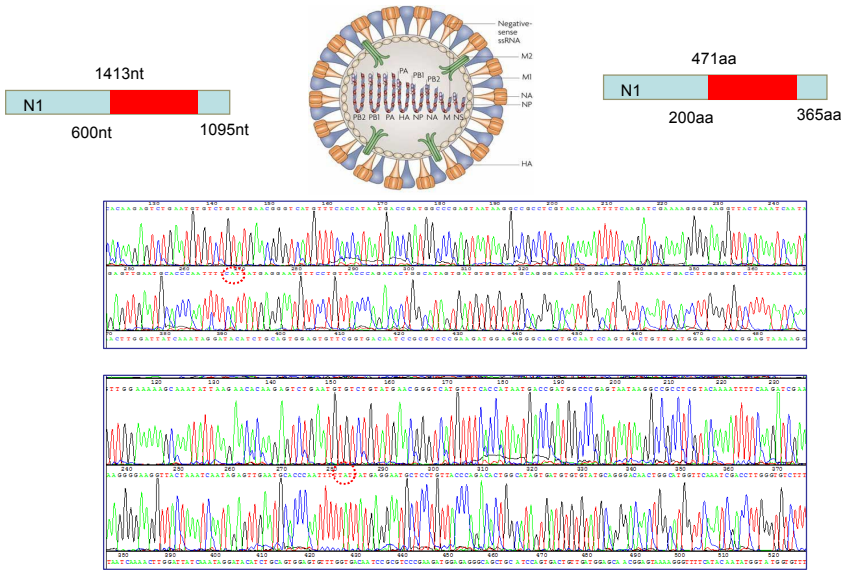


Antiviral Direnç Durumu (ABD)

	Test Edilen Örnek #	Dirençli Virüs #	
		Oseltamivir	Zanamivir
Mevsimsel Inf A(H1N1)	930	925 (%99.5)	0
Inf A (H3N2)	172	0	0
Sw Inf A (H1N1)	156	0	0
Inf B	491	0	0

İstanbul Tıp Fakültesi Oseltamivir Direnç çalışması

A/H1N1 (s:30) - H274Y mutasyon araştırması-



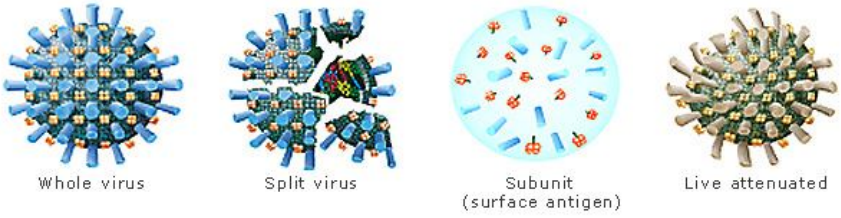
Oselatamivir Direnci

	Örnek sayısı	Direnç(%)
Türkiye	30	20
Norveç	>100	67
Fransa	>100	46.24
Çin	>100	14.6
Hollanda	>100	30
Japonya	>100	1.6
Italya	<10	0.9
Kanada	>100	26
ABD	>100	10.9

161

Aşılar…

- Virüs kaynak
  - İnaktif
  - Zayıflatılmış aktif
- Üretim yöntemi
  - Yumurtada
    - Hücre kültüründe



Aşı konusunda DSÖ Önerileri

- Virüsün yayılımının devam etmesi beklenmektedir.
- Daha önce bu virüs ile hiç karşılaşılmadığı için immünizasyonun 2 doz aşı ile yapılması gerekebilecektir.
- Adjuvan gereklidir.
- Trivalan mevsimsel grip aşısı ile yeni H1N1 virüsünü kombine etmek yerine monovalan A(H1N1) virüs aşısının ayrıca üretilmesi şu anda tercih edilen seçenek olmuştur



NOVARTIS

Novartis International AG
Novartis Global Communications
CH-4002 Basel
Switzerland
http://www.novartis.com

MEDIA RELEASE • COMMUNIQUE AUX MEDIAS • MEDIENMITTEILUNG

Novartis successfully demonstrates capabilities of cell-based technology for production of A(H1N1) vaccine

- *First results achieved with A(H1N1) wild type strain shows significant time savings of cell-based production over egg-based manufacturing approach confirming its value in pandemic situations.*
- *Based on this success Novartis expects to be able to achieve rapid production and scale up of influenza A(H1N1) vaccine manufacture with reassortant seed.*
- *More than thirty governments have made influenza A(H1N1) vaccine supply requests to Novartis for cell-based and egg-based antigen and MF59®.*

Basel, June 12 2009 — Novartis has successfully completed the production of the first

FT.com FINANCIAL TIMES

COMPANIES
Pharmaceuticals

FT Home > Companies > Health > Pharmaceuticals

Front page
World
Companies
Energy
Managed funds
Lex
Comment
Video & Audio
Management
Business Education
Personal Finance
Arts & Leisure



Novartis rejects call for vaccine donations

By Andrew Jack in London
Published: June 14 2009 17:08 | Last updated: June 15 2009 03:41

Novartis, the Swiss pharmaceuticals group, defied the World Health Organisation and some of its corporate peers by ruling out a donation to the poor of vaccines to counter the latest flu pandemic, and saying developing nations or donor nations should cover the costs.

Daniel Vasella, Novartis chief executive, told the Financial Times that he would consider offering discounted pricing to low-income nations, but unlike other drug companies, including **GlaxoSmithKline**, would not offer vaccines for free. He said: "If you want to make production sustainable, you have to create financial incentives."

His comments were a rebuff to Margaret Chan, WHO director-general, who last week said the H1N1 swine flu outbreak had become a pandemic. She has called on vaccine makers to show "solidarity" in offering vaccines to the poor.

The remarks highlight divisions in the industry. **GSK** has pledged 50m doses of its flu vaccine to the poor, and some smaller producers in developing countries say they will earmark 10 per cent of their production for free distribution.

EDITOR'S CHOICE
Scotland confirms first British swine flu victim - Jun-14
Lex: Novartis/Alcon - Jun-03
Cancer drug push at Novartis - May-20
Health blog - Mar-20
Swine flu vaccine manufacturers gear up - May-11
Novartis hires ex-Goldman banker - May-13

GSK Pandemik Influenza Aşısı

- Multi-dozluk 2 ayrı flakon (10 doz adjuvan ve 10 doz antijen)
- Doz başına 3.75 µg antijen
- Antijen raf ömrü 18 ay ve adjuvan raf ömrü 36 ay
- Standart uygulama 2 doz olmak üzere, 3 hafta arayla uygulanması önerilir

Aşılama öncesi iki flakon iyice karıştırılır



AS03 adjuvan 10 doz

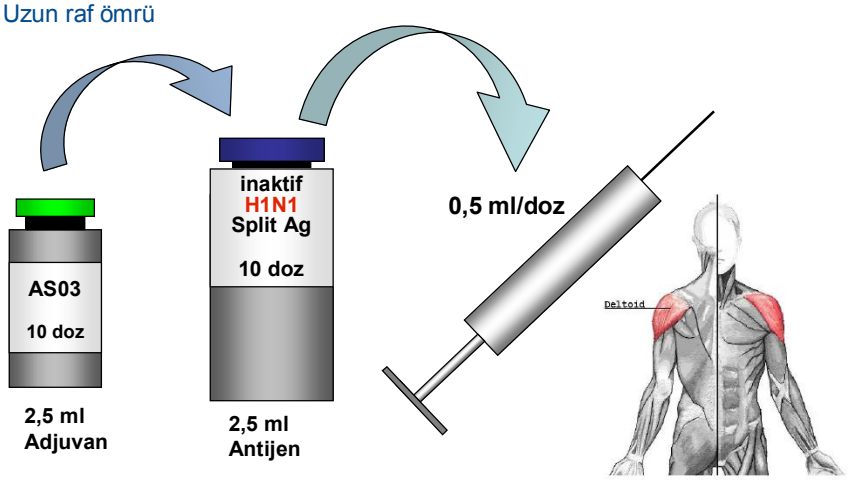
Antijen 10 doz

1 pakette (500 doz):
2 kutu adjuvan (2 x 25 flakon)
1 kutu antijen (1 x 50 flakon)



GSK - A (H1N1) Aşısı

- Her bir komponentin ayrı flakonlarda olması sayesinde ayrı olarak değiştirilebilme
- Adjuvan teknolojisi ile yüksek immünojenisite / çapraz koruma
- Esnek uygulama şeması
- Uzun raf ömrü



Pandemide Aşılanması Gereken Gruplar ve Muhtemel Aşılama Oranları

Aşılanacak Grup	Kişi Sayısı	Muhtemel Aşılama Oranı	Aşı ihtiyacı (tek doz)	Aşı ihtiyacı (iki doz ?)
Sağlık Personeli (Sağlık Bakanlığı personeli, Üniversiteler, Özel sektör, diş hekimleri, eczacılar)	450.000	%70	315.000	630.000
Diğer Kamu Personeli (Belediye çalışanları, emniyet ve jandarma, telefon, su, toplu taşım vb.)	640.000	%50	320.000	640.000
Kronik hastalığı olanlar ve 65 yaş üstü	11.000.000 *	%20-30	2.200.000	4.400.000
6-23 ay bebekler	2.000.000	%90	1.800.000	3.600.000
1.-8. Sınıf öğrenciler	8.500.000	%60	5.100.000	10.200.000
TOPLAM	22.590.000		9.735.000	19.470.000

*Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi tarafından Pnömokok aşısı risk grupları konusunda yapılan tahminlerden faydalanılmıştır. Bu grupta 3.630.000 kişi 65 yaş ve üzerinde yer almaktadır.

Pandemik Aşı İhtiyacı

- Aşılamada birinci öncelikli gruplar sağlık personeli, kamu çalışanları ve 65 yaş ve üzeri gruptur.

- Öngörülen aşılama oranlarına göre **minimum aşılanması gereken kişi sayısı 3.000.000'dur.**

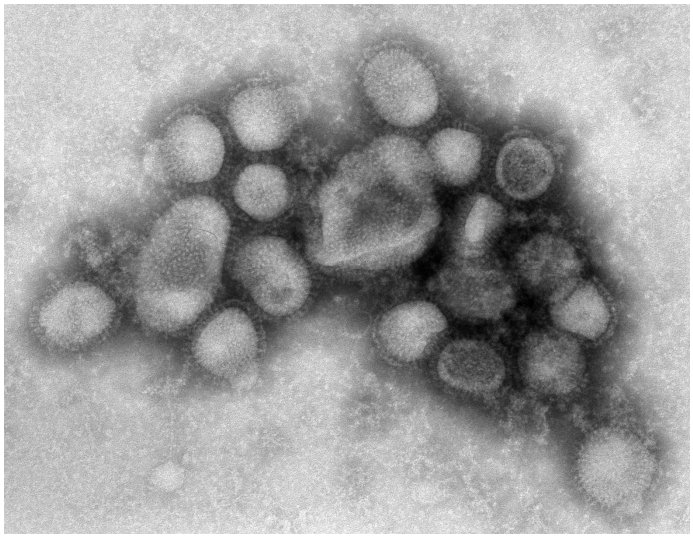
- İki doz üzerinden hesaplama yapıldığında minimum aşı ihtiyacı 6.000.000 dozdur.

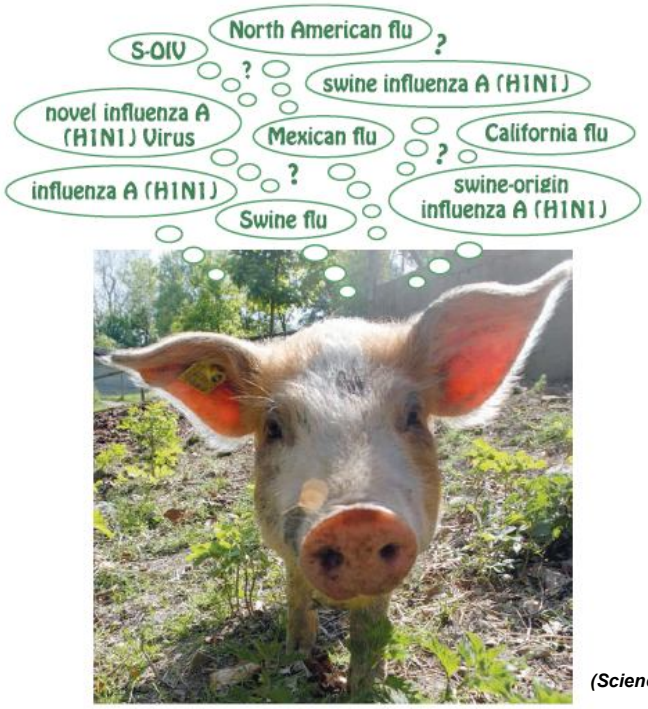
- Yapılan ön görüşmelerde aşı fiyatının 6 Avro/doz olabileceği ifade edilmiştir.

Olası senaryolar ?

- **Virus kendiliğinden kaybolur**
  (Olası görünmüyor!)
- **Hafif bir pandemi halinde sürer**
  (Asya gribi benzeri?)
- **Pandeminin şiddeti giderek artar**
  (Mutasyon ya da H3N2, H1N1 veya H5N1 gibi virüslerle yeni eşleşmeler sonrası !!!)

Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus: S-OIV





(Science 2009; 324: 871)

İNSANLARIN YENİ SOLUNUM VİRUSLARI

Emel Bozkaya

İstanbul Tıp Fakültesi Viroloji ve Temel İmmünoloji Bilim Dalı

İNSANLARIN YENİ SOLUNUM VİRUSLARI

- **İnsanların akut solunum yolu infeksiyonlarının çoğunun etkeni viruslardır. Bu infeksiyonların çoğu küçük çocuk, yaşlılar, immun yetmezlikli bireyler gibi belli risk gruplarında yüksek morbidite ve mortaliteye sahiptir.**

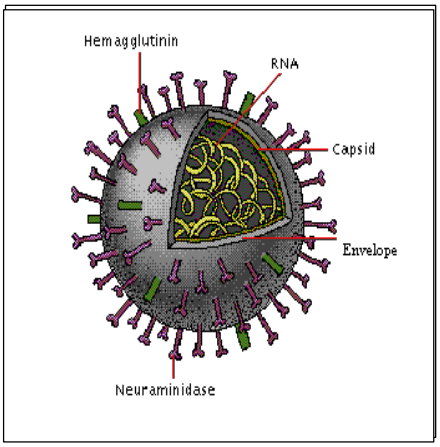
İNSANLARIN YENİ SOLUNUM VİRUSLARI

- **1.** ***Başka cins memeli veya kuş rezervuarlardan bulaşma***
- ***2. İnsanlarda yıllardır hastalık oluşturmakta olduğu halde bilinmeyen ancak teknolojinin gelişmesi sayesinde yeni bulunan etkenler***

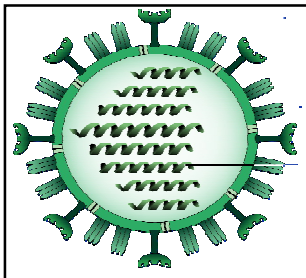
Solunum Sisteminde İnfeksiyon Yapan Viruslar

- İnfluenza viruslar
- Parainfluenza viruslar
- Solunum Sinsityal virus (RSV)
- Adenoviruslar
- Koronaviruslar
- Rinoviruslar
- HSV, CMV: bağışıklık yetmezliği olanlar

İnfluenza virusu

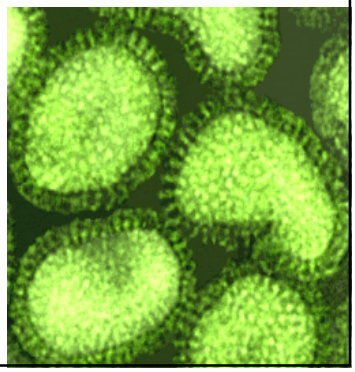


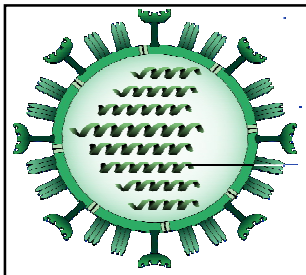
- Tek zincirli RNA virusu, genomu 8 segmentli
- Orthomyxovirus ailesinden, zarflı, sarmal, hemaglutinin ve nöraminidaz isimli 2 yüzey glikoproteini var
- Viriyonlar 80-120nm çapında yuvarlak şekilli
- 3 tip: A, B ve C
- Tip A antijenik shift ve drifte, tip B sadece antijenik drifte uğrar, tip C ise stabildir



ORTHOMYXOVIRIDAE

- İnfluenza A
- İnfluenza B
- İnfluenza C
- Thogoto virus → Thogoto virus
  Dhori virus



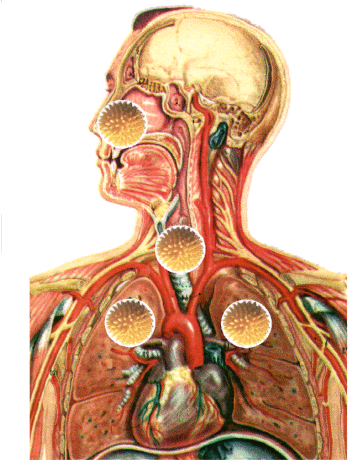


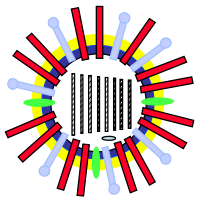
INFLUENZA A virus

- Mevsimsel influenza
- Pandemik influenza
- Kuş influenza
- İnfluenza A H1N1 (domuz)

İnsan İnfluenza virusları

Solunum yolları virusları





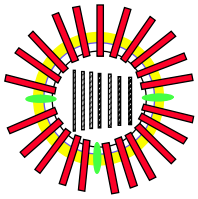
Tip *A*

sub-tip H1N1

sub-tip H3N2

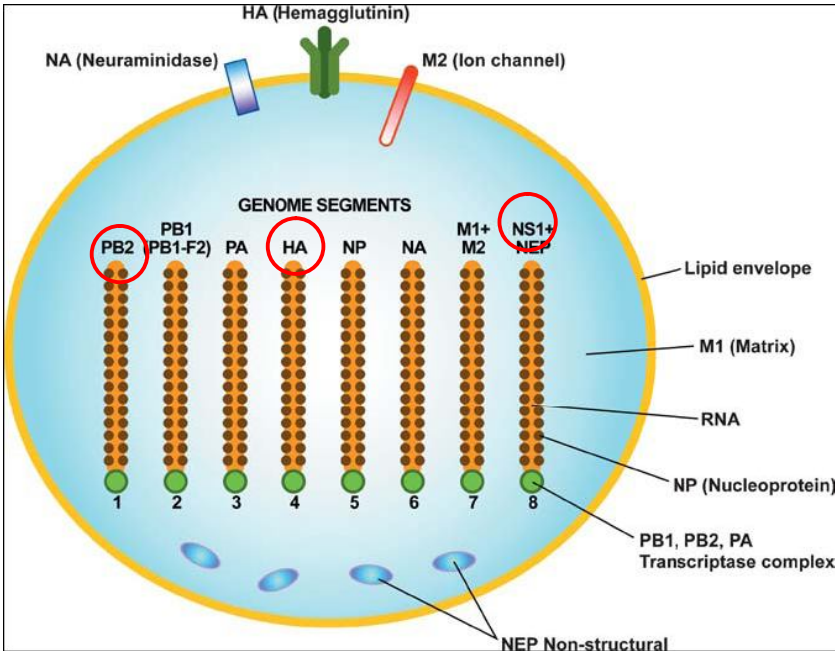
Sub-tip H1N2

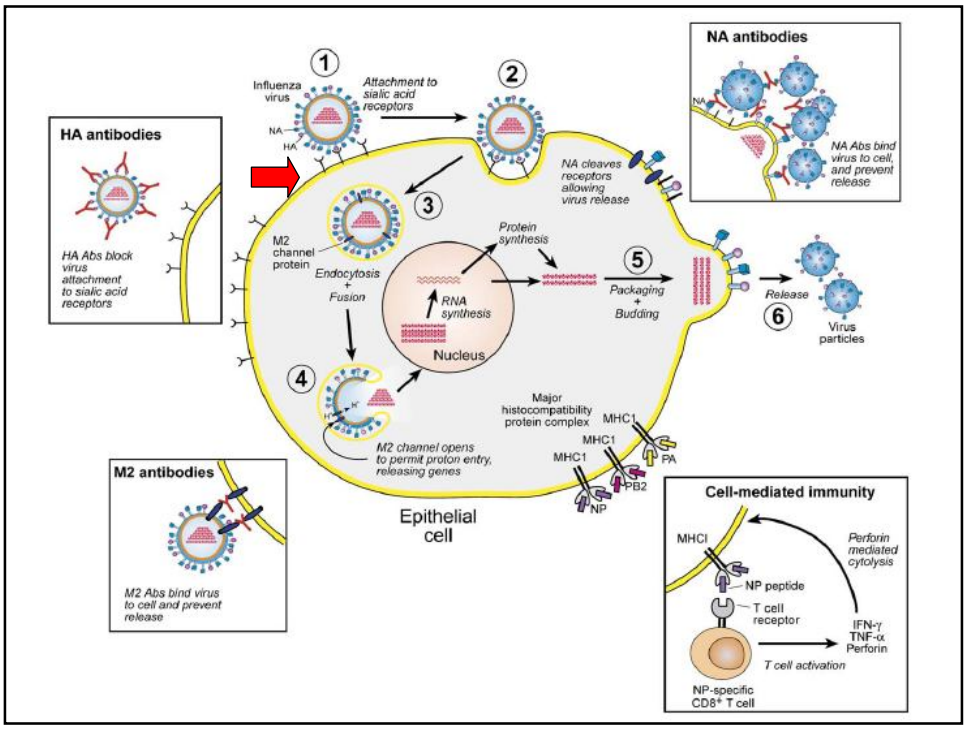
Tip *B*



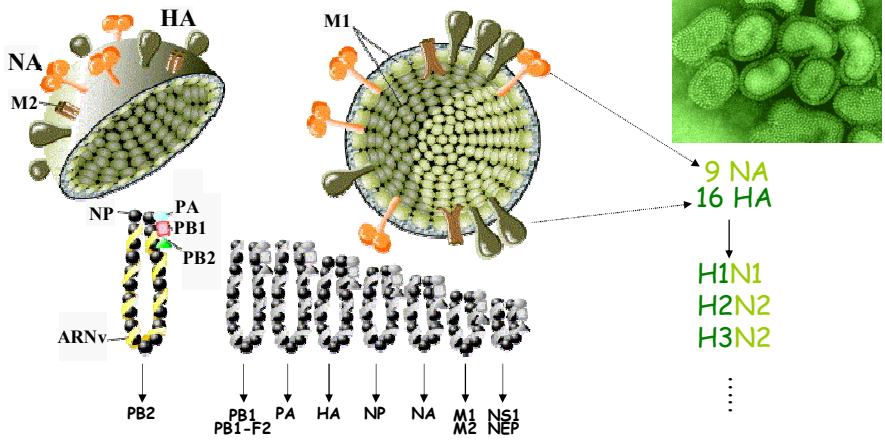
Tip *C*

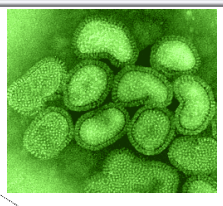
Patojeniteyi Belirleyen Gen Bölgeleri





Influenza virusları: antijenik "drift" ve "shift"





after Hatta *et al.*, 2002

Tip A ve B:	8 segment; 2 glikoprotein	HA & NA
Tip C :	7 segment; 1 glikoprotein	HE

Hücre kültüründe önemli noktalar

- Örnek tipi
- Kullanılan hücre dizisi-MDCK hücreleri (Madin-Darby canine kidney)
- Kültür; 2 tip
  - shell vial 1-3 gün
  - Klasik : 5-14
  - Virusun proteolitik aktivitesi (TPCK tripsin ilavesi),
  - Primer izolasyon 33 ^{o}C'de
- Üreyen virusun gösterilmesi ve identifikasyonu
  - Sitopatik etki
  - Hemaglutinasyon
  - Immunofloresans
  - Immunocapture ELISA

Influenza infeksiyonlarının moleküler tanısı

- **Viral nükleik asit RNA'nın tespiti**
- **Amplifikasyon teknolojisi: RT-PCR**
- **Avantajları**
  - **virusun saptanması**
  - **spesifikliği (Inf. viral genomunda tek bir sekansın saptanması)**
  - **Virusun alttiplendirilmesinin yapılması**
  - **Multipleks yapılabilmesi**
  - **Hızlı tanı**
- **Dezavantajları**
  - **Kontaminasyon**
  - **Virus izolasyonunun yapılamaması**
  - **Fiyatı**

Moleküler Yöntemler

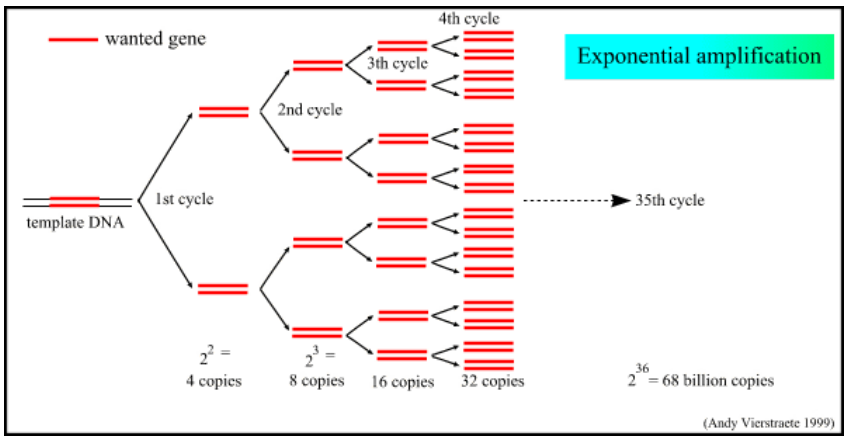
- **Mevcut kullanım alanı: Şüpheli sonuç/durum ve tiplendirme**
- **Hücre kültüründen daha duyarlı ?**
- **Real time PCR**

  - Light Cycler, SMart Cycler vb.

  - Hızlı sonuç: Surveyans takibinde kullanımı söz konusu
- **Multipleks PCR**

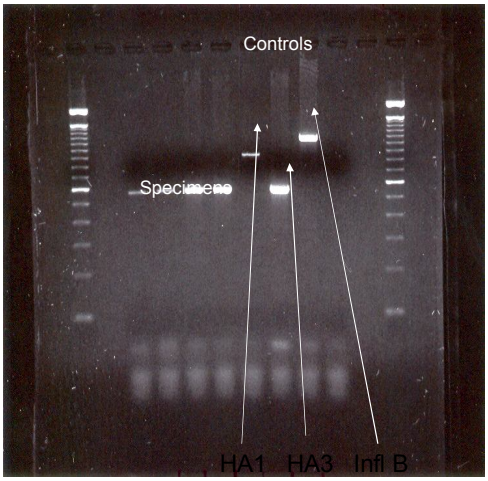
  - Birçok virusun eşzamanlı tespiti
- **"Oligonucleotide Microarray" Hibridizasyonu**

PCR - A little goes a long way

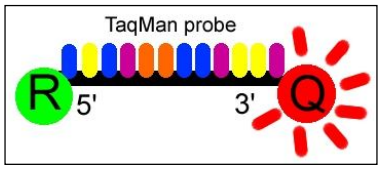


Influenza virus sub-tiplendirmesinde konvansiyonel PCR yöntemi

- HA genine spesifik primerler ile amplifikasyon
- Suşların identifikasyonu için sekans analizinde Amplikon
- Jelde yürütülür

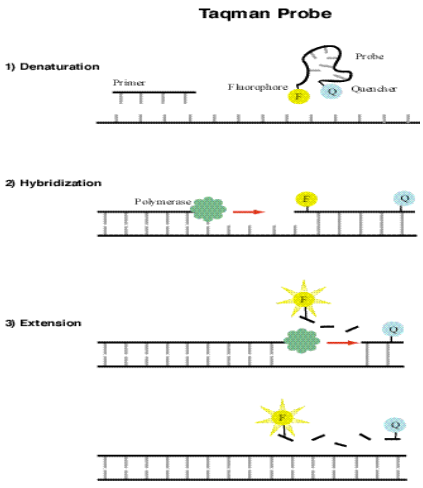


Real-time PCR için Taqman teknolojisi



Çok duyarlı, çok spesifik

Örneğin alınmasından 6-8 saat sonra sonuçlanır.



TEDAVİ

- M2 kanalı blokerleri: İnf A ya etkili
  Amantadin, rimantadin
- Ribavirin:Hem inf A, hem inf B ye etkili
- Nöraminidaz inhibitörleri:
  Oseltamivir, zanamivir

AŞI

- İnaktif, tüm virusu içeren ve subunit aşıların etkinliği kanıtlanmıştır. Canlı attenüe ve subunit aşılar çalışılmaktadır.

- İnaktif aşının her yıl içeriği önceki yıl saptanan influenza alt tipleri ve suşları esas alınarak hazırlanır. Son yıllarda aşılarda iki influenza A alt tipi (H3N2 ve H1N1) ve bir influenza B suşu yer almaktadır.

Mevsimsel influenza

- Sonbahar – Kış aylarında
- Solunum yolu sekresyonları ile
- İnsandan-insana bulaşır
- Üç-yedi gün sürer
- Tam iyileşme
- Yaşlı, küçük çocuk, altta yatan başka hastalığı olanlar, immün sistem baskılanmış kişilerde ağır/ölüm
- Her yıl hazırlanan aşı

Pandemik influenza
PANDEMİLER







1918: ispanyol gribi

40 milyon ölüm

A(H1N1)

1957: Asya gribi

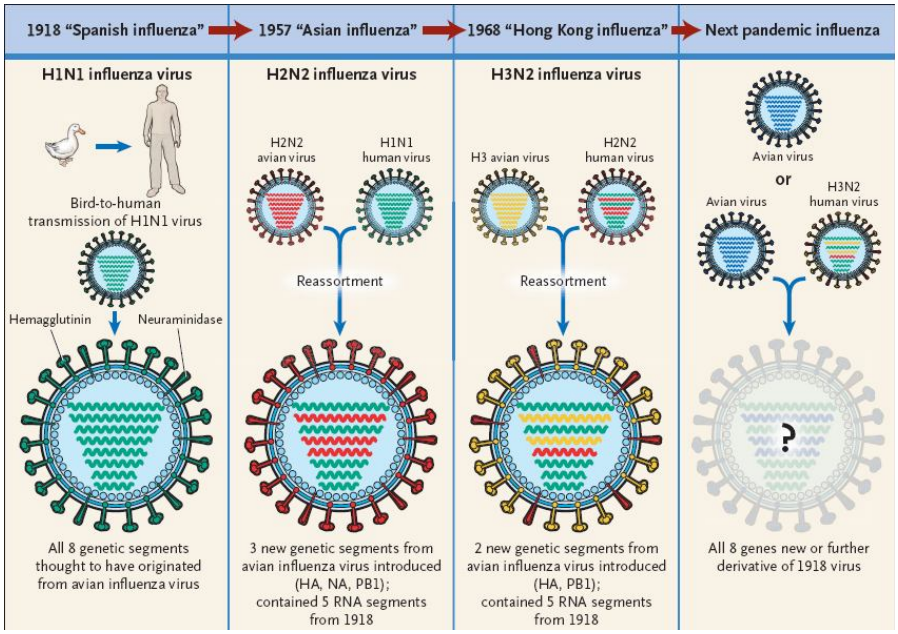
2 milyon ölüm

A(H2N2)

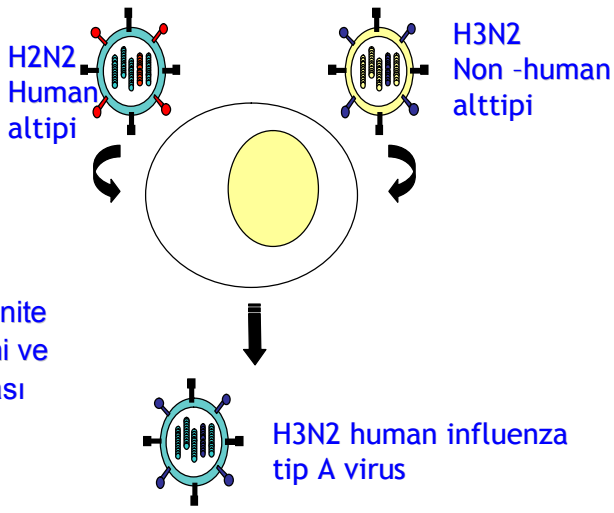
1968: Hong Kong gribi

2 milyon ölüm

A(H3N2)



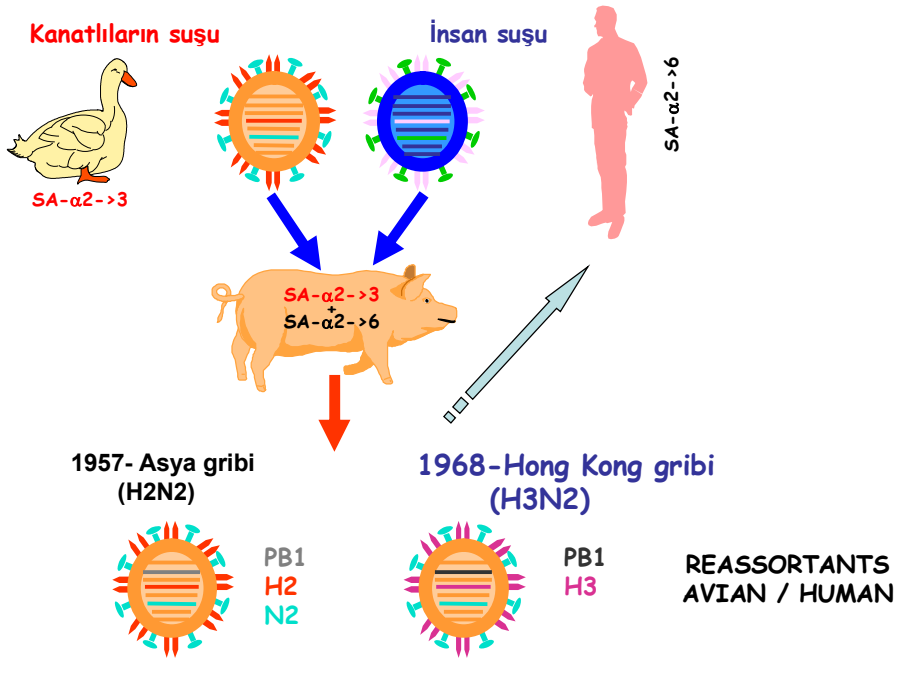
Antijenik şift:



- Ani ve majör genetik değişim ve yeniden yapılanma
- Sonuç: toplum immunite yokluğundan epidemi ve pandemilerin oluşması

Antijenik drift:

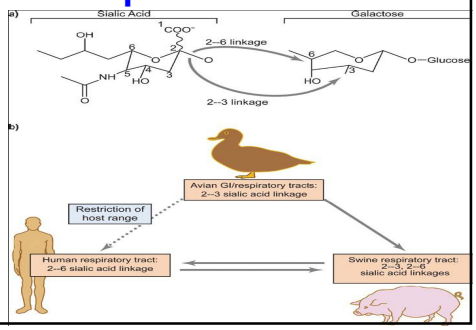
- Hemaglutinin geninde nokta mutasyonlarla olan minor antijenik değişikliklerdir
- Bir suşa ait sınırlı immünite gelişir
- Aşı suşlarının her sene yenilenmesi gerekir
- Antijenik "drift" mevsimsel epidemilere yol açar



RESEPTÖRE BAĞLANMA

- **İnsan (ve memeli) influenza virusları α 2,6-galaktoz bağları bulunan siyalik asit reseptörlerine (NeuAcα2,6Gal):**
- **Avian influenza virusları α 2,3-galaktoz bağları bulunan siyalik asit reseptörlerine (NeuAcα2,3Gal):**

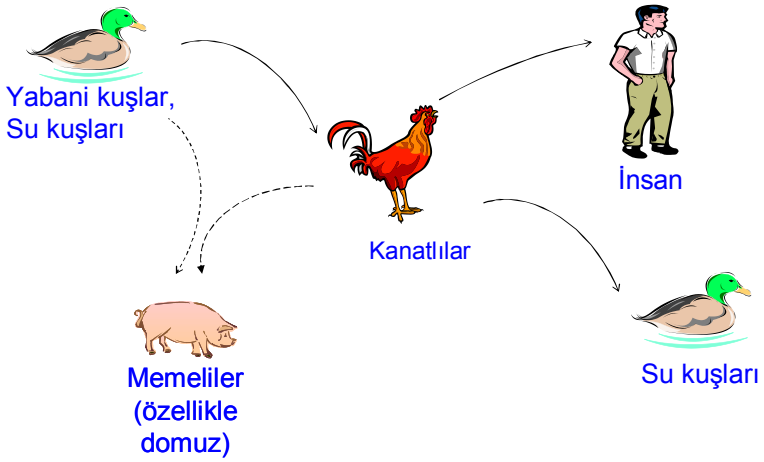
(DOMUZLARDA HER İKİ TÜR RESEPTÖR)



AĞIR HASTALIKLARA NEDEN OLAN YENİ SOLUNUM YOLU VİRUSLARI

- **Kuş İnfluenza Virusları**
- **SARS Koronavirus (SARS-CoV)**

KUŞ İNFLUENZA VİRUSLARININ DOĞADAKİ DÖNGÜSÜ



İNFLUENZA A : Zoonotik bulaşma

- **H7N7 İngiltere 1996 1vaka 0 ölüm**
- **H5N1 HongKong 1997 18 " 6 "**
- **H9N2 GD Asya 1999 2 " -**
- **H5N1 HongKong 2003 2 " 1 "**
- **H7N7 Hollanda 2003 89 " 1 "**
- **H7N2 USA 2003 1 " 0 "**
- **H7N3 Kanada 2004 2 " 0 "**
- **H5N1 2003-2007 330 " 210 "**
  GüneyDoğuAsya, OrtaDoğu, Avrupa, BatıAfrika

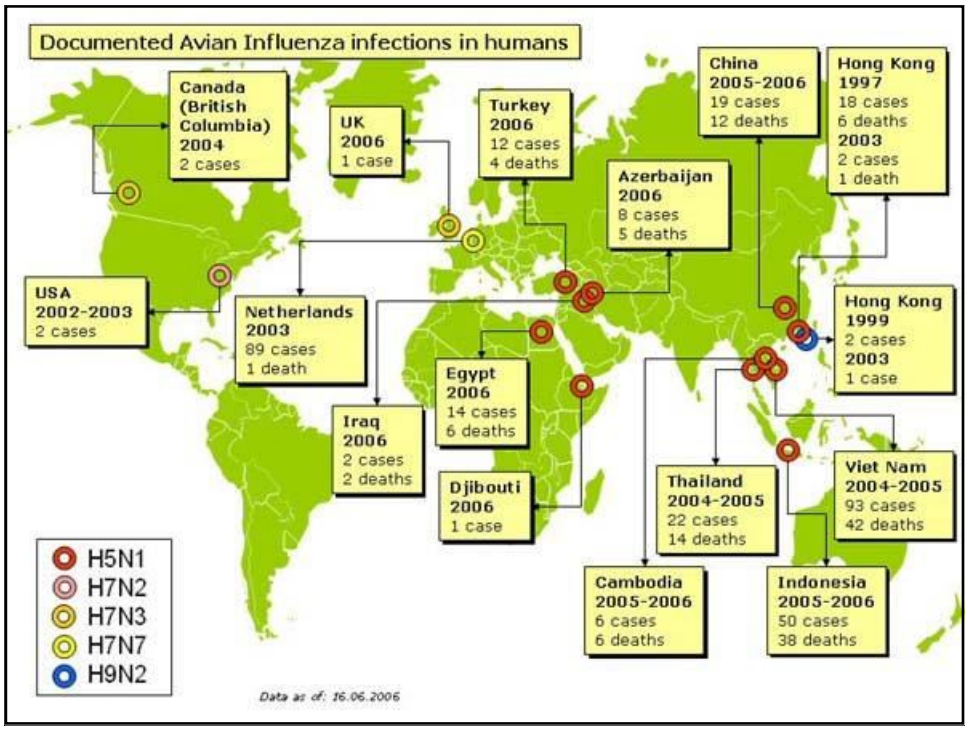
2009 Yılı Kuş Gribi Vak'aları

- 2 Ocak 2009 Hindistan tavuk çiftlik H5N1
- 4 Ocak 2009 Bengaldeş H5N1
- 7 Ocak 2009 Çin , Vietnam (107) H5N1
- 14Ocak 2009 Mısır (52) H5N1
- 16Ocak 2009 Nepal (tav.ç.) H5N1
- 19Ocak 2009 Çin H5N1
- 27Ocak 2009 Çin H5N1
- 2Şubat 2009 Çin (38vaka, 16ölüm) H5N1

- **Kanatlı hayvandan insana bulaşma**
  - İnfekte veya ölü hayvanla temas
- **Çevreden insana bulaşma**
  - İnfekte hayvanların salgıları (gözyaşı, burun ve boğaz akıntıları, dışkı) ile temas
  - İnfekte salgı ve dışkılarla kontamine olmuş yüzey ve eşyalarla temas
  - İnfekte tozların inhalasyonu
- **İnsandan insana bulaşma**
  - Şüpheli nadir olgular bildirilmekle birlikte insan-insan bulaşı kanıtlanmış değil

H5N1

- 1997 Hong Kong 18 kişi infekte oldu, 6 kişi öldü.
- Virus kaynağı infekte tavuklar kabul edildi, hepsi imha edildi.
- Tüm virus suşları kuş orijinli bulundu.
- Suşlar, tabii konakları için son derece virulan
- Güney Doğu Asya, Ortadoğu, Avrupa, Batı Afrika 2003-2007 yılları arasında 330 üzerinde olgu, 210 ölüm. İnfekte kümes hayvanları veya onların ürünleri ile direk veya indirek temas. Virusun coğrafik yayılımı doğadaki infekte göçmen kuşlar veya onların ürünleri .



Dünya salgın açısından şu an ne durumda?

- Pandemi (salgın) yeni bir virüsün ortaya çıkmasıyla başlayacak sıradan bir grip enfeksiyonu gibi insanlar arasında hızla yayılacaktır.
- Değişime uğrayan yeni virüsle bağışıklık sistemimiz daha önce tanışmadığı için, hastalık sıradan grip enfeksiyonuna göre biraz daha ciddi seyredecektir.
- Henüz insandan insana geçiş söz konusu değildir.



TEDAVİ

- **Destek tedavisi**
- **Antiviral tedavi: Oseltamivir, Sialik asit ünitelerini haraplayarak virusun yayılmasını önler.**
  Standart dozdan daha yüksek doz ile tedaviye başlanması önerilmektedir. (75-150mg günde iki kez, 7-10 gün)
  Dirençli suşlarda zanamivir tedavisi

Mutations in Influenza A Virus (H5N1) and Possible Limited Spread, Turkey, 2006

Ender Altiok,*† Fulya Taylan,* Osman Ş. Yenen,‡ Gülşah Demirkeser,* Mürvet Bozaci,‡
Derya Önel,‡ Birsen Akcadag,§ A. Selma Iyisan,§ Meral Ciblak,‡ Emel Bozkaya,‡
Sirin Yuksel,* and Selim Badur‡

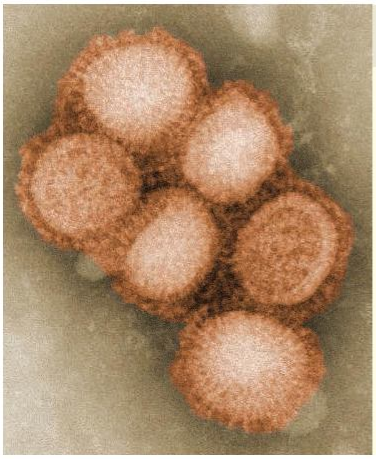
*Acibadem Genetic Diagnosis Center, Istanbul, Turkey; †Boğaziçi University, Istanbul, Turkey; ‡Istanbul University School of Medicine, Istanbul, Turkey; and §Pendik Veterinary Control and Research Institute, Istanbul, Turkey

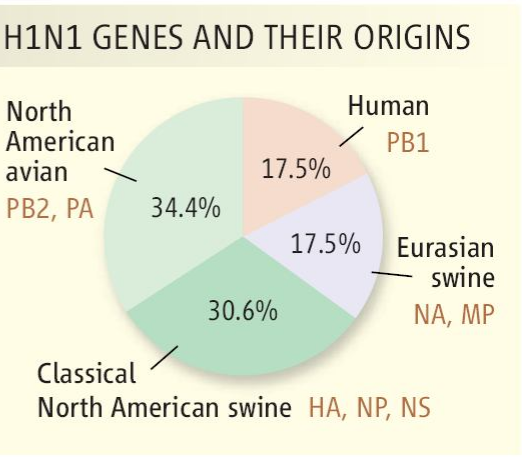
INFLUENZA A H1N1

“SWINE FLUE “

INFLUENZA A H1N1

- 21 Nisan 2009 CDC Haftalık raporunda iki olguda yeni bir grip virusuna rastlandığı bildirilmiş !!!
- İlk salgının Mart ayı içinde Meksika'da üç yerde: Mexico city, San Luis Potosi ve Mexicali'de ortaya çıkmıştır
- İnsanlarda tanımlanan bu virusun Kuzey Amerikada domuzlarda infeksiyon oluşturan influenza virusunun iki gen bölgesi ile Avrupa ve Asyada domuzlarda infeksiyon oluşturan influenza virusunun bir gen ve de kuş ile insanda grip oluşturan influenza virusunun bir gen bölgelerinin ortak olduğu belirlenmiştir. Dolayısı ile bu yeni virus dört farklı genin birleşmesi ile oluşmuş yeni bir virus olarak tanımlanmıştır.





Science 2009; 324: 700

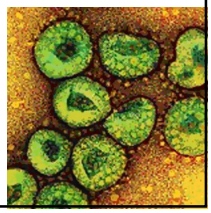
INFLUENZA A H1N1

- **Virusun yayılması devam ediyor**
- **DSÖ pandemi alarm düzeyini 6'ya çıkarmıştır**
- **Daha önce bu virus ile karşılaşılmadığı için 2 doz aşı yapılması gerekebilecek**
- **Trivalan mevsimsel grip aşısı ile yeni monovalan H1N1 aşısının üretilmesi gündemde**

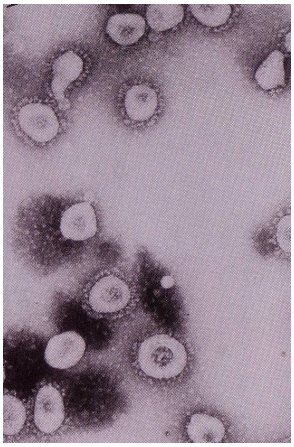


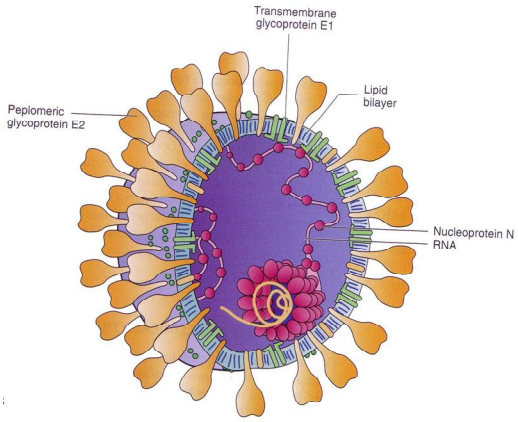
SARS -CoV

- 2002 Kasım ayında Çin Guangdong eyaleti
- "infeksiyöz atipik pnömoni"
- Vancouver'da British Colombia Üniversitesinde genom sekanslanarak önceden insanlarda bulunmayan yeni bir CoV olduğu saptanmış
- İnsanlarda antikor saptanmamış



KORONAVİRUS

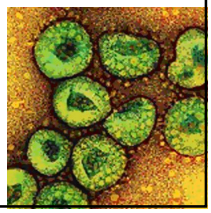






SARS-CoV

- "Horseshoe bat" yarasaları doğal rezervuar
- "Misk kedileri" nin doğal rezervuar kabul edilirse de aksi kanıtlar da var (Lai 2007)
- İnsanlara bulaşma ile ilgili iki görüş var
  - a)İnfekte yarasalardan marketteki misk kedilerine, kediden insana bulaşma
  - b)Yarasadan direk insana bulaşma(Li2005,Lau2005



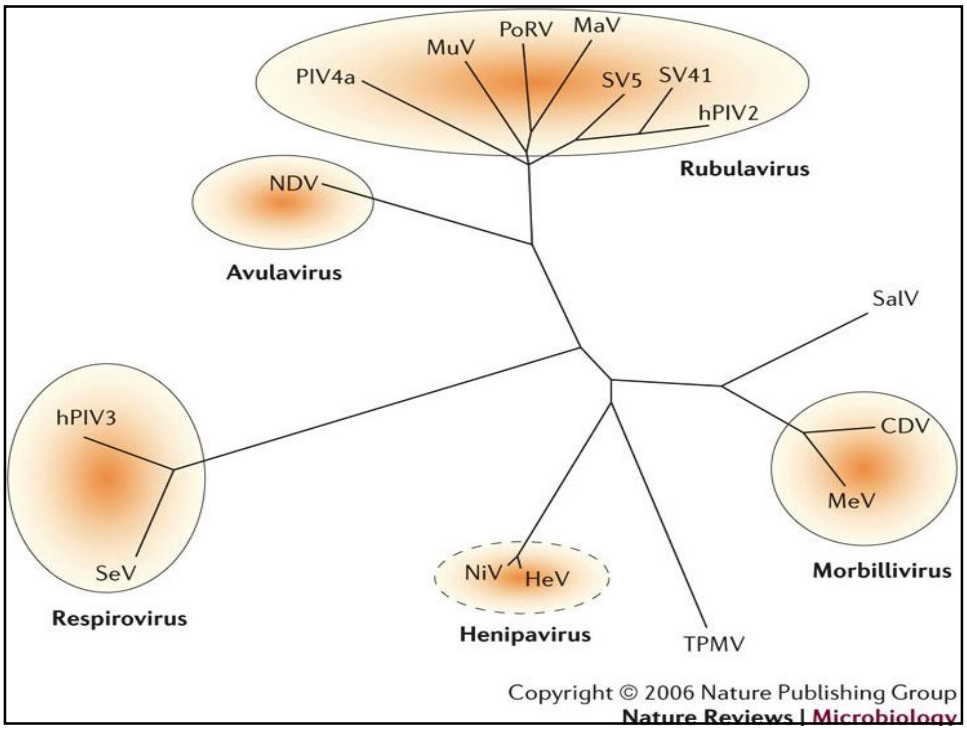
HENIPAVIRUS

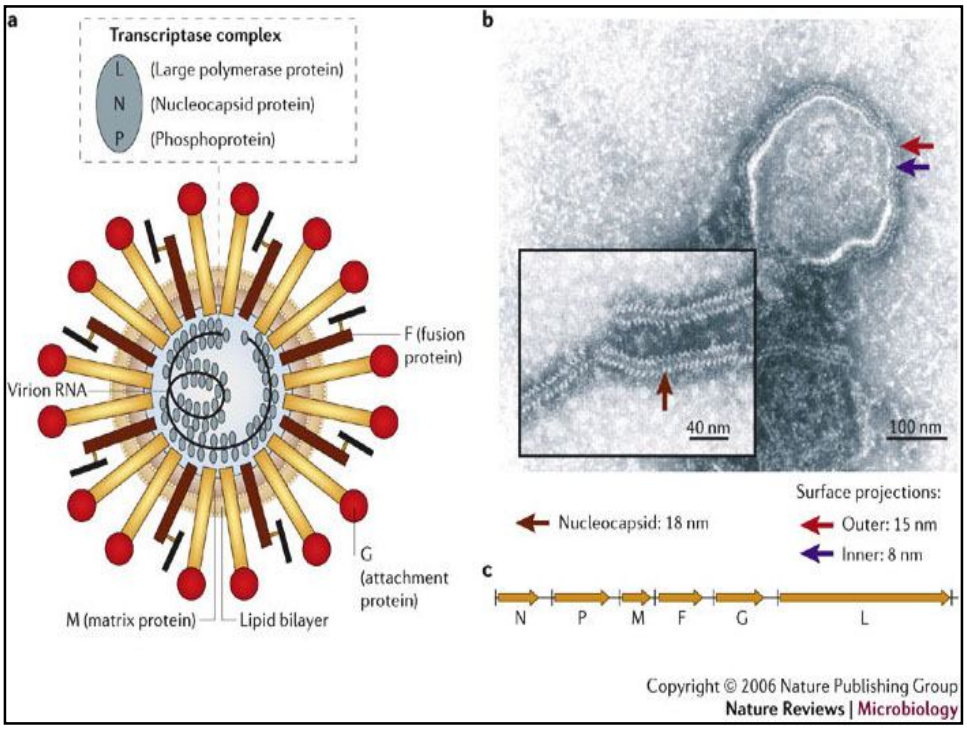
Hendra ve Nipah



HENDRA ve NIPAH virusları

- **Paramyxoviridae ailesi**
  Paramyxovirinae alt ailesi
  Respirovirus (parainfluenza v.)
  Rubulavirus (Kabakulak v.)
  Morbilivirus (Kızamık v.)
  Avulavirus (Newcastle v.)
  Henipavirus (Hendra ve Nipah v.)


PoRV
MaV
MuV
PIV4a
SV5
SV41
hPIV2
Rubulavirus
NDV
Avulavirus
SalV
hPIV3
CDV
MeV
SeV
Morbillivirus
NiV
HeV
Respirovirus
Henipavirus
TPMV
Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Microbiology


a
Transcriptase complex
L
N
P
(Large polymerase protein)
(Nucleocapsid protein)
(Phosphoprotein)
F (fusion protein)
Virion RNA
G (attachment protein)
M (matrix protein)
Lipid bilayer
b
40 nm
100 nm
Surface projections:
Nucleocapsid: 18 nm
Outer: 15 nm
Inner: 8 nm
c
N
P
M
F
G
L
Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Microbiology

HENDRA VIRUS

- Avustralya'da (Queensland) Hendra bölgesi
- 1994 Eylül Harada atlar arasında hastalık, atlar arasında ölüm
- Atlar ile ilgilenen iki kişide ağır grip benzeri hastalık gelişmiş, hastaneye yatırılmış, biri kaybedilmiştir. Önceleri "at morbilivirusu" denmişse de sonra "Hendra virus" olarak adlandırılmıştır.
- 1995 Ekim Avustralya'da at sahibinin ensefalit atakları sonucu ölmesi ile retrospektif bir araştırma ile salgın tanımlanmış
- 1996 Nisan Avustralya'da *Pteropus cinsi yarasalarda anti-Hendra antikorları saptanmış*
- *1996 Eylül* Pteropus poliocephalus türü yarasalardan, insan ve atlardakine benzer Hendra virus izole edilmiş
- *1999 Ocak Hendra virus infeksiyonu saptanan bir at fatal, insan veya başka bir at a bulaşma yok*

NIPAH VIRUS

- 1998 Eylül Malezyada domuzlarda çok bulaşıcı, düşük mortalite gösteren bir solunum yolu infeksiyonu
- 1999 ilk ayları insanlarda yüksek mortalite ile seyreden ateşli ensefalit tablosu oluşturan bir salgın (infekte olan kişiler: domuz çiftliklerinde çalışmakta olan veya domuzlarla teması olanlarda) 265 kişi hastalanmış 105 kişi hayatını kaybetmiştir.
- 1999 Mart Singapur'da domuz mezbahasında çalışan 22 kişi hastalanmış, bir kişi ölmüş. (Malezyadan gelen ithal domuzlara bakım verenler olduğu anlaşılmış)
- 2001, 2003, 2004 Bengaldeş'te tekrarlayan Nipah ensefaliti salgınları görülmüştür. 2004 salgınından etkilenen bölgelerde Pteropus cinsi yarasalarda Nipah virusu antikoru saptanmış

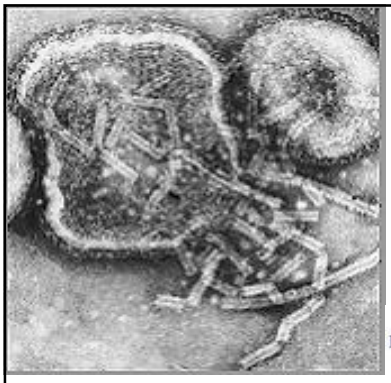
İNSANDA HASTALIK 0LUŞTURAN KORONAVİRUSLAR

- OC43
- 229E
- SARS-CoV
- NL63
- HKU1

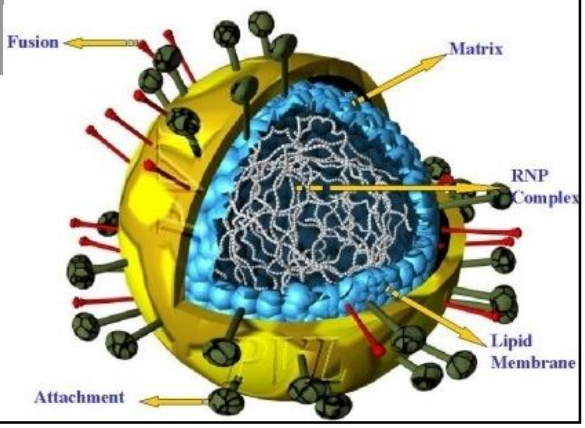


YENİ BULUNAN İNSAN SOLUNUM VİRUSLARI

- **İnsan Metapnömovirus (hMPV)**
- **İnsan Koronavirusları:**
  HCoV-NL (Hollanda)
  HCoV-HKU1 (Hong Kong)



Parainfluenza virus



Paramyxoviridae

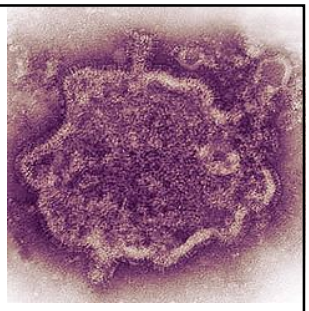
Paramyxovirinae

Respirovirus	Rubulavirus	Morbillivirus
PIV-1 PIV-3	PIV-2 PIV-4A PIV-4B Kabakulak virusu	Kızamık virusu

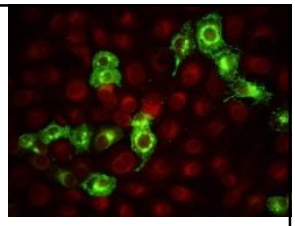
Pneumovirinae

Pneumovirus	Metapneumovirus
RSV	MPV

METAPNÖMOVİRUS

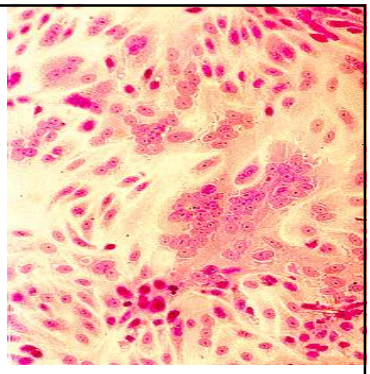


- 2001 yılında tanımlanmıştır.
- Solunum yolu patojeni
- Maymun böbrek hücrelerinde üretilmiştir
- Sitopatik etkisi RSV'ye benzer
- 1958 yılında Hollanda'da 8-99 yaş arası insanlardan alınan serum örneklerinden %100 var olduğu saptanmış



- Paramyxoviridae ailesi
- Pneumovirinae alt ailesi'nde yer alır
- Morfolojik özellikleri paramyxoviruslar gibi
- Paramyxoviruslardan farklı olarak hemaglutinin, nöramindaz içermez.
- Tavuk ve hindilerde infeksiyon oluşturmaz (human metapneumovirus)
- RSV ile benzer CPE oluşturur

Metapnömovirus İzolasyon

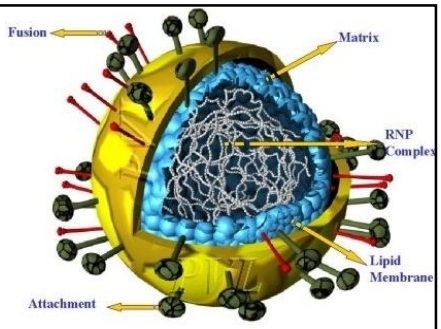


- Nazofaringeal aspirasyon sıvısı
- Endotrakeal aspirasyon sıvısı
- Bronkoalveolar lavaj sıvısı

Maymun böbrek hücre kültürlerinde üretilir.

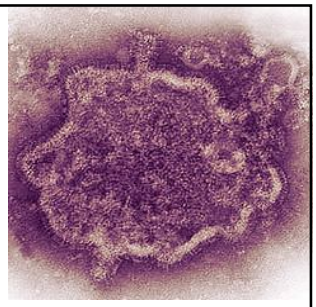
- Yavaş ürer
- Fokal, granüler hücreler şeklinde CPE oluşturduğu bildirilmektedir.

Metapnömovirus



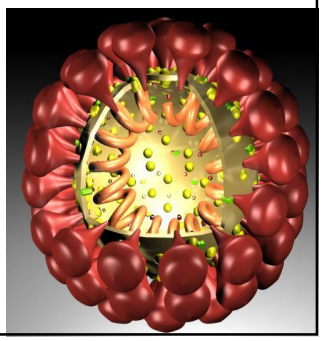
- Dünyada yaygın
- 2 yaş altı çocuklarda özellikle bir yaşın altındakilerde sık; yaşlılarda soğuk algınlığının major etkeni
- Reinfeksiyon sık görülmekte
- Beyaz ırk diğerine oranla daha fazla etkilenmekte (%65 - %35)
- Kuzey yarımkürede kış - bahar aylarında
- İmmun kompromize hastalarda ağır/ölümcül
- Influenza ve RSV ile birlikte dolanımda

- ABD'de 5 yaşın altında akut solunum hastalığı ile yatırılan hastaların %4'ünde
- Tennessee'de 25 yıl boyunca etkeni belirlenmemiş solunum yolu infeksiyonuna ait nazal sürüntü örneklerinin %20'sinde hMPV saptanmış
- Tüm çalışanların ortak sonucu virus saptanmayan çocukluk çağı alt solunum yolu infeksiyonlarının %10'undan hMPV sorumlu



KORONAVİRUS'LAR

- **Coronoviridae ailesinden**
- **Tek zincirli RNA virusları**
- **Solunum sistemi ve gastrointestinal sistem patojeni**
- **Çocuklarda üst solunum yolu infeksiyonlarında %5-15 etken**
- **Genomik RNA poliadenilatlı**



İNSANDA HASTALIK 0LUŞTURAN KORONAVİRUSLAR

- OC43
- 229E
- SARS-CoV
- NL63
- HKU1

Genotipik ve Serolojik Özelliklerine Göre:

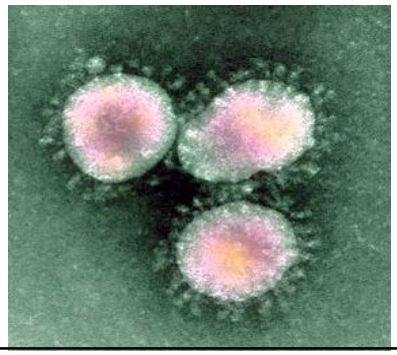
- 1. grup: 229E , NL63
- 2. grup: OC43 , SARS CoV , HKU1
- 3. grup: Avian infeksiyöz bronşit virusu (İnsana patojen virus yok)

KORONAVİRUS

TANI

- Kültürde üretilmeleri zordur. (İnsan trakea kültürleri duyarlı)
- İmmunfloresan tekniği kullanılmakta
- ELISA yaygın değil
- Moleküler yöntemler:
  - . RNA-RNA hibridizasyon
  - . RV transkriptaz (CoV-OC43, CoV-229E)

- Koronaviruslar fare, sıçan, tavşan, tavuk, hindi, yarasa, kedi, köpek, domuz, sığır, at gibi birçok konaktan izole edilmiştir.
- Gastrointestinal sistem ve solunum yollarında hastalık yaparlar.
- Rekombinasyon oranları transkripsiyon ve polimeraz atlamalarına bağlı olarak çok yüksek.
- Grup 2 koronaviruslar hemaglutinin esteraz (HE) geni taşırlar.
- Mutasyon oranı yüksek

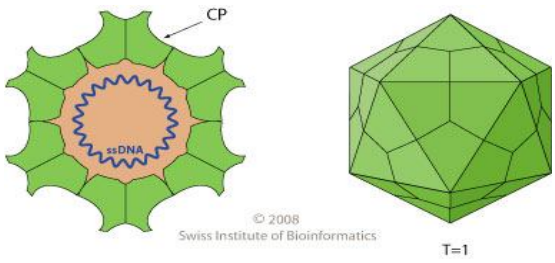


DİĞER YENİ İDANTİFİYE EDİLEN İNSAN SOLUNUM VİRUSLARI

Yeni Parvoviruslar: Human Bocavirus
Polyomavirus: KI ve WU polyomavirus

YENİ BULUNAN SOLUNUM VİRUSLARI

- İnsanların solunum yolu örneklerinde yeni virusların araştırılması büyük ölçüde yeni geliştirilmekte olan moleküler virus araştırmaları ile olmaktadır.
- Bu çalışmalar ile yeni bir parvovirus : human Bocavirus, polyomavirus KI, WU bulunmuştur.



BOCAVIRUS

- Genetik olarak "bovine parvovirus" ve "canine minute virus" ile yakındır.
- Öncelikle solunum yolu örneklerinden izole edilmişse de virus dışkı ve serumda da gösterilmiştir.
- Üst solunum yolu ve alt solunum yolu infeksiyonlarından izole edilmiştir.
- Öksürük, nezle, hırıltılı solunum, ateş sık görülen belirtileridir.
- Sıklıkla çocuklarda görülür.

POLYOMAVIRUS

- Solunum yollarından alınan muayene maddelerinde bulunmuştur.
- Yeni bulunan bu virusların infeksiyonlar ile ilişkileri hakkında daha çok araştırmaya ihtiyaç vardır, bugünkü bilgilerimiz yetersizdir.

SONUÇ

- Geçtiğimiz son on yılda insanlarda ciddi hastalıklara neden olan viruslar; göçmen kuşlar, karnivorlar ve yarasalar gibi hayvan rezervuarlardan yayılmıştır.
- Bunların çoğunda HPAI H5N1 virusu veya Nipah infeksiyonlarında görüldüğü gibi virus insandan insana bulaşma göstermemiştir. Halbuki SARS'ta insandan insana bulaşma çok etkili olup, pandemi oluşturma olasılığı yüksektir. HPAI H5N1 influenza veya Nipah virusu infeksiyonları ancak insandan-insana kolay bulaşma özelliği kazanırlarsa pandemik potansiyel kazanmış olacaklardır.

SONUÇ

- Etkeni araştırmada kullanılan klasik ve moleküler yöntemler son on yılda yeni bulunmuş ve bulunmakta olan solunum yolu viruslarının identifikasyonunda önemli rol oynamıştır.
- Bu virusların: global prevalansı, değişkenliği, hastalığın çıkışı ile ilişkisi , sürveyans aktiviteleri, aşı stratejileri ve tedavi olasılıkları gibi pek çok özelliklerinin araştırılmaya ihtiyacı vardır.