

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

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**AKUT SOLUNUM YOLU İNFEKSİYONLARINDA HUMAN
CORONAVIRUS İNSİDANSI**

FADİME GÜL

**DANIŞMAN
PROF. DR. EMEL BOZKAYA**

**MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI / MİKROBİYOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2009

TEZ ONAYI

Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

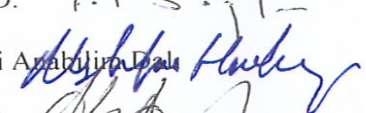
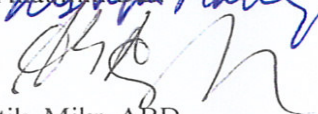
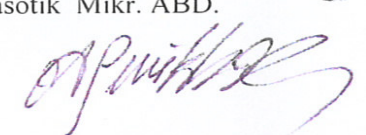
02 / 03 / 2009

Prof.Dr.Emine Kökoğlu
Enstitü Müdürü

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Program Adı : Mikrobiyoloji
Programın seviyesi : Yüksek Lisans ☒ Doktora ☐
Anabilim Dalı : Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD
Tez Sahibi : Fadime Gül
Tez Başlığı : Akut Solunum Yolu Enfeksiyonlarında Human Coronavirus İnsidansı
Sınav Yeri : Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD.
Sınav Tarihi : 02 / 03 / 2009

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı

- | | | |
|--|--|---|
| 1.Prof.Dr Bülent Gürler | İstanbul Tıp Fak. Mikrobiyoloji AD. |  |
| 2.Prof.Dr Emel Bozkaya (Danışman) | İstanbul Tıp Fak. Mikrobiyoloji AD. |  |
| 3.Doç Dr Mustafa Hasöksüz (2.danışman) | İstanbul Üniv.Veteriner Fak.Viroloji Anabilim Dalı |  |
| 4.Prof.Dr Ali Ağaçfıdan | İstanbul Tıp Fak. Mikrobiyoloji AD. |  |
| 5.Prof Dr Adile Çevikbaş | Marmara Üniv.Sağ.Bil.Enst. Farmasötik Mikr. ABD. |  |

BEYAN

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

FADİME GÜL*F. Gül*

İTHAF

Aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

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

Tez konumun belirlenmesi ve yürütülmesi de dahil olmak üzere, yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, ilgi ve hoşgörüsünü esirgemeyen, öğrencisi olduğum için kendimi şanslı hissettiğim değerli hocam ve danışmanım Sayın Prof. Dr. Emel Bozkaya' ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, hiçbir konuda yardımını esirgemeyen ikinci danışmanım değerli bilim adamı Sayın Doç. Dr. Mustafa Hasöksüz' e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Rahmiye Berkiten, Sayın Prof. Dr. Selim Badur, Sayın Prof. Dr. Şengül Derbentli, Sayın Prof. Dr. Mine Anğ Küçüker, Sayın Prof. Dr. Nezahat Gürler, Sayın Prof. Dr. Yıldız Yeğenoğlu, Sayın Prof. Dr. O. Şadi Yenen, Sayın Prof. Dr. Ali Ağaçfidan, Sayın Prof. Dr. Çiğdem Kayacan, Sayın Prof. Dr. Betigül Öngen, Sayın Prof. Dr. Salih Türkoğlu, Sayın Prof. Dr. M. Derya Aydın, Sayın Prof. Dr. Y. Ali Öner, Sayın Prof. Dr. Meltem Uzun, Sayın Prof. Dr. Zayre Erturan, Sayın Doç. Dr. Özden Büyükbaba Boral' a teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca laboratuvar bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan Araş. Gör. Meral A. Çıblak ve Araş. Gör. Bülent Çakal' a çok teşekkür ederim.

Değerli arkadaşlarım Erdal Karal, Tuba Yılmaz, MSc. Feriha Başoğlu ve ayrıca birlikte çalıştığım tüm arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Yardım ve desteklerini gördüğüm Fatma Tecer ve Viroloji ve Temel İmmünoloji Bilim Dalı' nın tüm çalışanlarına sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yetişmemde büyük özveri gösteren, sevgi ve desteklerini her zaman hissettiğim sevgili annem, babam ve ağabeylerime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 1725

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ.....	Xİ
ÖZET	Xİİ
ABSTRACT.....	Xİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe	3
2.2. Sınıflandırma.....	5
2.3. Virion Morfolojisi ve Yapısı	7
2.3.1. Yapısal Proteinler	9
2.3.1.1. Spike Glikoproteini (S)	9
2.3.1.2. Hemagglütinin-Esteraz Glikoproteini (HE).....	11
2.3.1.3. Membran Glikoproteini (M)	12
2.3.1.4. Zarf Glikoproteini (E)	13
2.3.1.5. Nukleokapsit Fosfoproteini (N)	13
2.3.2. Viral Genom ve Yapısal Olmayan Proteinler.....	14
2.4. Coronavirus Replikasyonu	16
2.5. Virus İnfeksiyonunun Konak Hücrelere Etkileri	20
2.6. Virus Mutantları	21
2.7. RNA Rekombinasyonu.....	21
2.8. Coronavirus İnfeksiyonlarında Patogenez	22
2.9. İnsan ve Hayvan Coronavirusları Arasındaki İlişki	24
2.10. İnsan Coronavirus İnfeksiyonları.....	28
2.10.1. HCoV-229E İnfeksiyonları.....	28

2.10.2. HCoV-OC43 İnfeksiyonları.....	29
2.10.3. HCoV-NL63 İnfeksiyonları.....	30
2.10.4. HCoV-HKU1 İnfeksiyonları.....	31
2.10.5. SARS-CoV İnfeksiyonları.....	32
2.11. İnsan Coronaviruslarının Epidemiyolojisi.....	33
2.11.1. HCoV-229E Epidemiyolojisi.....	34
2.11.2. HCoV-OC43 Epidemiyolojisi.....	35
2.11.3. HCoV-NL63 Epidemiyolojisi.....	36
2.11.4. HCoV-HKU1 Epidemiyolojisi.....	37
2.11.5. SARS-CoV Epidemiyolojisi.....	37
2.12. Tanı.....	38
2.12.1. İzolasyon ve Elektron Mikroskopu Çalışmaları.....	38
2.12.2. Serolojik ve Moleküler Yöntemler.....	39
2.13. Tedavi.....	40
2.14. Önlem.....	41
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	43
3.1. Gereçler.....	43
3.1.1. Pozitif Kontroller.....	43
3.1.2. Örnekler.....	43
3.1.3. Viral RNA İzolasyon Kiti.....	44
3.1.4. Primer Listesi.....	44
3.1.5. Amplifikasyon.....	45
3.1.6. Elektroforez.....	45
3.1.7. Görüntüleme.....	46
3.2. Yöntem.....	46
3.2.1. Deneysel Çalışma.....	46
3.2.2. Örneklerden Viral RNA' nın İzolasyonu.....	46
3.2.3. Amplifikasyon.....	47
3.2.4. Elektroforez.....	50
3.2.4.1. Agaroza Jelin Hazırlanması.....	50
3.2.4.2. Elektroforez İşlemi.....	50
3.2.5. Sonuçların Değerlendirilmesi.....	50

3.2.6. İstatistiksel Analiz	50
4. BULGULAR.....	51
İstatistiksel Analiz	52
5. TARTIŞMA	57
KAYNAKLAR	63
ETİK KURUL KARARI.....	75
ÖZGEÇMİŞ	76

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: CoV serotipleri, doğal konakları ve meydana getirdikleri hastalıklar	Hata!
Yer işareti tanımlanmamış.	
Tablo 2-2: Coronavirus' lar, infekte ettiği konaklar ve bilinen hücre reseptörleri	17
Tablo 3-1: Çalışmada kullanılan örneklerin çeşitleri, sayıları ve hasta yaş grupları	43
Tablo 3-2: Primer listesi	44
Tablo 3-3: Pancorona primerleri ile örneklerin HCoV açısından taranması için kullanılan PCR master miksi	47
Tablo 3-4: Pozitif örneğin grubunu belirlemede kullanılan PCR master miksi	49
Tablo 4-1: İncelenen örneklere göre pozitiflik oranı	51

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Negatif boyanmış HCoV-NL63' ün elektron mikroskobu görüntüsü.....	8
Şekil 2-2: Coronavirus' ların şematik görünümü.....	9
Şekil 2-3: Coronavirus' ların genomik yapısı.....	15
Şekil 2-4: Coronavirus replikasyon döngüsü.....	16
Şekil 4-1: RT-PCR' da kullanılan pozitif kontrolün (BCoV-430) dilüsyonlarının, Pancorona primerleri ile yapılan RT-PCR sonucu.....	53
Şekil 4-2: RT-PCR ile pozitif bulunan 374 numaralı örnek.....	54
Şekil 4-3: Pozitif bulunmuş örneğin, Grup 1 spesifik primerleri ile yapılan RT-PCR sonucu.....	55
Şekil 4-4: RT-PCR' da kullanılan pozitif kontrolün (BCoV 430), Grup 2 primerleri ile yapılan RT-PCR sonucu.....	56

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ACE: angiotensin-converting enzyme

APN: aminopeptidaz N

CoV: Coronavirus

DEPC: Diethylpyrocarbonate

DMSO: Dimethyl sulfoxide

dNTP: Deoxyribonucleotide triphosphate

E: Zarf glikoproteini

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

HCoV: Human Coronavirus (insan Coronavirusu)

HE: Hemagglütinin-Esteraz glikoproteini

IFA: Immunofloresan assay

IS: Intergenic sequence

M: Membran glikoproteini

N: Nukleokapsit fosfoproteini

ORF: open reading frame

PCR: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz zincir reaksiyonu)

RT-PCR: Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction

S: Spike glikoproteini

SARS: Severe Acute Respiratory Syndrome (Ağır Akut Solunum Yetmezliği Sendromu)

SARS-CoV: Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus

TBE: Tris-borate-EDTA

UTR: untranslated region

ÖZET

Gül F. Akut Solunum Yolu İnfeksiyonlarında Human Coronavirus İnsidansı. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2009.

Çalışmamızda, akut solunum yolu enfeksiyonlu hastalarda, Human Coronavirus' ların (HCoV) insidansı araştırılmıştır. HCoV' ların solunum yolu enfeksiyonuna yol açtığı ve dünyanın değişik ülkelerinde yaygın olduğu bilinmekle birlikte, ülkemizdeki görülme sıklığı konusunda herhangi bir araştırma yapılmamıştır. Bu amaçla 1 Kasım 2007- 11 Mayıs 2008 tarihleri arasında Türkiye' nin 11 ilinden İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Viroloji Laboratuvarı' na gelen, tüm yaş gruplarındaki akut solunum yolu enfeksiyonlu hastalardan alınmış toplam 400 adet nazal sürüntü, farinks sürüntüsü, nazofaringeal sürüntü ve nazofaringeal aspirat örneği, HCoV açısından RT-PCR yöntemi ile incelenmiştir. 1 örnek (% 0,25), HCoV pozitif olarak bulunmuştur. HCoV' ların düşük insidansının; araştırmanın virusun epidemi yaptığı döneme rastlamamış olabileceğinden, hastalardan alınan örneğin virus saçılımı bittikten sonra alınmış olma ihtimalinden veya asemptomatik bireyleri içerebilecek bir kontrol grubunun çalışmaya dahil edilmemiş olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Bununla beraber, altta yatan hastalığı olan ya da immun sistemi baskılanmış durumdaki hastalarda, Human Coronavirus' un daha virulan olduğunu vurgulayan çalışmalarla uyumlu olarak, çalışmamızda pozitif bulunan hastanın da immun sistemi baskılanmış durumda idi. Çalışma sonucunda Human Coronavirus' ların immun sistemi baskılanmış hastalarda meydana gelen akut solunum yolu enfeksiyonlarında, solunum patojenlerinden biri olarak göz önüne alınması gerektiği düşünülmüştür. Ayrıca bu virusların Türkiye' de de yaygın olup olmadığını anlayabilmek için, epidemiyolojik çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler : İnsan Coronavirusu, HCoV, İnsidans, Akut Solunum Yolu İnfeksiyonu, RT-PCR

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 1725

ABSTRACT

Gul F. The Incidence of Human Coronaviruses in Acute Respiratory Tract Infections. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Microbiology and Clinical Microbiology. Master Degree Thesis. Istanbul. 2009.

In our study, the incidence of Human Coronaviruses (HCoV) in patients with acute respiratory tract infections was investigated. It is well known that HCoVs cause respiratory tract infections and are common in different countries around the world, but in our country there is no research available about their incidence. For this purpose, between 1 November 2007- 11 May 2008, total of 400 nasal swab, pharynx swab, nasopharyngeal swab and nasopharyngeal aspirate, taken from all age group patients with acute respiratory tract infections from 11 provinces of Turkey, sent to Istanbul Faculty of Medicine, Department of Microbiology and Clinical Microbiology, Virology Laboratory were investigated for HCoV by use of RT-PCR method. 1 sample (0.25 %) was positive for HCoV. The low incidence of HCoV may be due to the study period when HCoVs were not circulating, the collection time of respiratory specimens from patients or control group who would have been asymptomatic was not included in the study. However, consistent with the studies that are underscoring the virulence of HCoVs in immuncompromised patients or patients with underlying diseases, the HCoV positive patient of our study was immuncompromised, too. As a result of the study, HCoVs have to be considered as one of the possible respiratory pathogens in immuncompromised patients with acute respiratory tract infection. Furthermore, epidemiologic studies need to be performed to understand whether HCoVs are common in Turkey.

Key Words : Human Coronavirus, HCoV, Incidence, Acute Respiratory Tract Infection, RT- PCR

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 1725

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Coronavirus' lar (CoV) memeli, kanatlı hayvanlar ve insanlarda enfeksiyona neden olan geniş bir virus ailesidir. 2002' de meydana gelen ölümcül SARS (Ağır Akut Solunum Yetmezliği Sendromu) salgınından sonra bu virus ailesi dikkat çekmiş, bu konuda yapılan araştırmalarla bu aileden yeni viruslar keşfedilmiş ve son araştırmalara göre sayılarının 24 memeli, 10 kanatlı ve 5 insan virusuna ulaştığı belirlenmiştir. Bu sayının, araştırmalar arttıkça daha da artacağı tahmin edilmektedir (57, 110).

Human Coronavirus' lar (HCoV), insanlarda genellikle solunum yolu enfeksiyonlarına sebep olurlar. Bugüne kadar keşfedilen HCoV serotipleri HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63, HCoV-HKU1 ve SARS-CoV olarak adlandırılmıştır. HCoV, soğuk algınlığı enfeksiyonunun en sık karşılaşılan ikinci önemli viral etkenidir. Yapılan araştırmalara göre HCoV soğuk algınlığı enfeksiyonundan başka farenjit, larenjit, konjunktivit, otit, bronşit, bronşiolit, pnömoni, astım, astım bronşiolit, krup, astım ya da KOAH gibi kronik solunum hastalıklarının alevlenmesi, bazen de gastroenterit ya da Kawasaki hastalığının etkeni olarak bulunmuştur (5, 7, 51, 76, 80, 93, 98, 99). Sporadik ya da kış - ilkbahar aylarında epidemik şeklinde görülen HCoV enfeksiyonunda en sık görülen semptomlar burun akıntısı, ateş, öksürük ve kırgınlıktır (6, 9, 23).

Tüm yaş gruplarında da görülebilen HCoV enfeksiyonu, en çok çocuk ve infantlarda görülür. Bunun yanında yaşlılarda ve altta yatan hastalığı olan ya da immun sistemi baskılanmış durumda olan çocuk ve yetişkinlerde, virusun ölümlere de sebep olduğu daha şiddetli enfeksiyonlar da meydana gelmektedir (29-31).

Solunum sekresyonlarının inhalasyonu veya mekanik yolla bulaşan ve böyle önemli enfeksiyonlara sebep olabilen bu virusla ilgili olarak, ülkemizde henüz akut solunum yolu enfeksiyonlarındaki insidansı konusunda yapılmış herhangi bir çalışma bulunmamaktadır (57).

Bu çalışma, ülkemizdeki akut solunum yolu enfeksiyonlarında HCoV insidansını saptamak amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla 1 Kasım 2007- 11 Mayıs 2008 tarihleri arasında Türkiye' nin 11 ilinden İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Viroloji Laboratuvarı' na gelen, tüm yaş gruplarındaki

akut solunum yolu infeksiyonlu hastalardan alınmış toplam 400 adet nazal sürüntü, farinks sürüntüsü, nazofaringeal sürüntü ya da nazofaringeal aspirat örneği, HCoV varlığı açısından RT-PCR yöntemi ile incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Coronavirus' lar (CoV), doğada hayvanlar ve insanlar arasında yaygın olarak bulunur. İnsan ve evcil hayvanlarda sıklıkla görülen solunum ve enterik hastalıklara sebep olurlar (43, 44). Yapılan çalışmalara göre, insandaki soğuk algınlığı enfeksiyonunun en sık etkeni olan Rhinovirus' dan sonra, CoV ikinci sırada yer almaktadır. CoV ile ilgili ilk bilgiler 1937' de Beaudette ve Hudson tarafından tavuklardan İnfeksiyöz Bronşit Virusu' n (IBV); 1940' larda Fare Hepatit Virusu' n (MHV) ve domuzlardan Transmissible Gastroenteritis Virus' un (TGEV) izolasyonuna dayanmaktadır (8, 12, 20).

Basit soğuk algınlığının major etiyolojik etkeni olan Rhinovirus' ların keşfinden sonra uzun bir süre, soğuk algınlığının % 50' sinden fazlasının etiyolojik etkeni tespit edilememiştir. Tyrell ve Bynoe 1965 yılında, soğuk algınlığına tutulmuş kişilerden alınan nazofaringeal yıkantı sıvılarını, insan embriyonu trakeal organ kültürlerine inoküle ederek IBV' na benzeyen yeni bir tip virus üretmiş ve virusu "B814" olarak adlandırmışlardır (2). Böylece, ilk kez bir insan Coronavirusu (HCoV), in vitro üretilmiştir (62). Virusun doku kültüründe pasajı yapılamamış, ancak enfeksiyöz olduğu, organ kültürü üst sıvısının, inoküle edildiği gönüllülerin önemli bir kısmında soğuk algınlığı oluşturmasıyla gösterilmiştir (96). 1966 yılında ABD' de Hamre ve Procknow, soğuk algınlığına yakalanmış tıp öğrencilerinin solunum örneklerinden, "HCoV-229E" olarak adlandırdıkları yeni bir virusu doku kültüründe üretebilmişlerdir (36). Daha sonra McIntosh ve ark. (71), Tyrell ve Bynoe' ye benzer bir teknik kullanarak, insan solunum yolundan bu viruslara benzer virüsler elde ederek bu virüsleri, organ kültüründen izole edildiklerine işaret eden "OC" ismiyle adlandırmışlardır. Elektron mikroskobu çalışmalarıyla, saptanan bu virüslerin identik elektron mikroskobu görüntüsüne sahip oldukları ve henüz sınıflandırılmaları yapılmamış olan IBV, MHV ve TGEV ile de benzer oldukları belirlenmiştir (70). Bu incelemelerde en göze çarpan özellik, virusun "taç" a benzeyen görüntüsü olup, bu yüzden bu virus grubuna, Latince' de taç anlamına gelen "Coronavirus" ismi verilmiştir. Daha sonra bu virüslerin benzer genom organizasyonu ve replikasyon stratejilerine sahip oldukları gösterilmiştir (57).

Daha sonra çok sayıda yeni CoV keşfedilmiş ve pek çok hayvan türünde, çok çeşitli hastalıklara sebep oldukları gösterilmiştir. Bu virusların büyükbaş hayvanlar, kümes hayvanları ve domuzlarda önemli hastalıklara neden olup ekonomik kayba yol açtıkları ve kediler, kemiriciler, köpek ve tavşanlarda da ciddi hastalıklar meydana getirdikleri bildirilmektedir (57). Örneğin tavuklarda infeksiyöz bronşit ve nefrite; domuz yavrularında gastroenterit ve ensefalite; hindi, köpek ve buzağılarda enterite; farelerde hepatit ve ensefalite; sıçanlarda pnömoni ve sialodakriyoadenite; kedilerde infeksiyöz peritonite sebep olmaktadır. İnfekte olan hayvan türlerinin çeşitliliği ve sebep olduğu hastalıkların şiddeti, CoV' ları en önemli veteriner patojenlerden biri haline getirmiştir (69, 70). 1970' ler ve 1980 yılının başları, CoV' ların virion proteinleri ve RNA' sının tanımlandığı, biyosentezinin örneklerle ve deneylerle açıklandığı yıllar olmuştur. İlk kez 1983' te, dört CoV cinsi klonlanmıştır. Bu on senelik çalışma süreci CoV RNA' sının replikasyonu, transkripsiyonu, konak hücredeki reseptörlerinin tanımlanması ve polimeraz geninin işleyişinin açıklanabilmesi için, çok büyük bir adım olmuştur. 2002 yılının Kasım ayında ölümcül ve çok hızlı yayılan bir pnömoni tipi olan "SARS" ın (Severe Acute Respiratory Syndrome; Ağır Akut Solunum Yetmezliği Sendromu) ani ortaya çıkışı ve etkenin bir CoV oluşu, CoV' ları yeniden ilgi odağı haline getirmiştir (21, 53, 54, 78). Bu salgında bir hayvan CoV' nun delesyon ve mutasyon yoluyla adaptasyon süreci geçirip tür bariyerini geçerek, insan popülasyonuna yayıldığı görülmüştür; ortaya çıkan hastalığın klinik spektrumu kendine hastır. Hayvan CoV' ları hakkında geçmişte yapılmış pek çok çalışma sonucunda elde edilen genomik sekans verileri ve bu virusun doku kültüründe kolayca üremesi sonucunda, genomu hızla sekanslanarak SARS etiyolojisi kısa zamanda tanımlanmış; etiyolojik etken hızla identifiye ve klasifiye edilmiş, sonuçta epidemiyi önlemede rehberlik edebilecek etkeni saptama metodları geliştirilmiştir (47, 69). Salgından sonra dikkatler Coronavirus' lara, sebep oldukları infeksiyonlara, tedavilerine ve alınabilecek önlemlere çevrilmiştir. Yapılan araştırmalar sonucu, SARS salgınından sonra insan, yarasa ve diğer bazı yabani hayvanlardan yeni Coronavirus' lar da identifiye edilmiştir (27, 38, 59, 64, 81, 101).

Bu salgından sonra, iki yeni HCoV daha identifiye edilmiştir: 2004 yılında Hollanda' dan van der Hoek ve ark. (101) 7 aylık bir bebekten, HCoV-NL63' ü izole etmişlerdir. Daha sonra yapılan çalışmalarla, bu virusun tüm dünyada yaygın olduğu gösterilmiştir (5, 6, 22, 31, 37, 48, 56, 72, 75, 98, 102, 111, 115). Woo ve ark. (108)

2005 yılında Hong Kong’ da, 71 yaşındaki ateş ve prodüktif öksürüklü bir hastadan, HCoV-HKU1’ i identifiye etmişlerdir. Yapılan çalışmalarla bu virusun da bazı ülkelerde bulunduğu bildirilmiştir (23, 30, 55, 97, 110). Araştırmalarda elde edilen verilere göre bu iki virus, alt ve üst solunum yolu hastalıklarıyla ilişkilidir ve insanlarda yaygın olarak bulunmaktadır. CoV’ ların mutasyon sıklığı ve buna bağlı olarak türler arasında infeksiyon yapabilme yeteneği sebebiyle, bu virus üzerine bugün de hala araştırmalar devam etmektedir (47).

2.2. Sınıflandırma

Günümüzde Coronavirus cinsindeki viruslar, insan ve hayvanlarda enterik hastalığa sebep olan Torovirus cinsi ile beraber, *Coronaviridae* ailesini oluşturmaktadır (43, 57). Bu iki cinsin elektron mikroskobu görüntüleri ve replikasyon stratejileri benzer; RNA genomu, yapısal proteinlerin boyutları ve nukleokapsitlerinin morfolojisi farklıdır (70). *Coronaviridae* ailesi de, sadece hayvanları infekte eden *Arteriviridae* ailesi ile birlikte, Nidovirales (Latince Nidus = yuva, küme) takımı içinde bulunmaktadır (26). *Coronaviridae* ailesindeki CoV’ ların, insan ve hayvanlarda infeksiyona neden olan bazı türleri, Tablo 2-1’ de gösterilmiştir (57, 83).

Serolojik ilişki ve doğal konak bilgilerine göre üç antijenik gruba ayrılarak incelenen CoV’ lar, daha sonra edinilen nukleotid sekansı bilgilerine göre “a” ve “b” olarak alt gruplara ayrılmıştır (44, 59, 81). Serogrup 1 ve 2 içine memelilerden izole edilen CoV’ lar, serogrup 3 içine de kanatlılardan izole edilen CoV’ lar yerleştirilmiştir. Grup 1 içinde insan suşu HCoV-229E, bir diğer insan suşu olan HCoV-NL63 ve hayvan Coronavirus’ ları yer almaktadır. Grup 2 içinde 2a ve 2b olarak iki antijenik alt grup bildirilmektedir. SARS-CoV 2b içerisinde, diğer insan ve hayvan CoV’ ları ise 2a içinde bulunmaktadır.

Tablo 2-1: CoV serotipleri, doğal konakları ve meydana getirdikleri hastalıklar (57, 83)

Antijenik Grup	Virus	Konak	Solumun inf.	Enterik inf.	Hepatit	Nörolojik inf.	Diğer
1a	HCoV-229E: Human Coronavirus-229E	İnsan	X			?	
1a	TGEV: Transmissible Gastroenteritis Virus	Domuz	X	X			x ^a
1a	PRCoV: Porcine Respiratory Coronavirus	Domuz	X	X			
1a	CCoV: Canine Coronavirus	Köpek		X			
1a	FECoV: Feline Enteric Coronavirus	Kedi		X			
1a	FIPV: Feline Infectious Peritonitis Virus	Kedi	X	X	X	X	
1b	HCoV-NL63: Human Coronavirus-NL63	İnsan	X				
1b	BatCoV: Bat Coronavirus	Yarasa					x ^b
2a	HCoV-OC43: Human Coronavirus-OC43	İnsan	X	?		?	
2a	HCoV-HKU1: Human Coronavirus-HKU1	İnsan	X				
2a	MHV: Murine Hepatitis Virus	Fare	X	X	X	X	x ^c , x ^d
2a	SDAV: Sialodacryoadenitis Virus	Sıçan	X			X	
2a	HEV: Hemagglutinating Encephalomyelitis Virus	Domuz	X	X			
2a	BCoV: Bovine Coronavirus	Siğir	X	X			
2a	GiCoV: Giraffe Coronavirus	Zürafa		X			
2b	SARS-CoV: Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus	İnsan	X	X			x ^a , x ^e ?
3	IBV: Avian Infectious Bronchitis Virus	Tavuk	X	X	X		x ^e , x ^f
3	TCoV: Turkey Enteric Coronavirus	Hindi	X	X			

x^a : Viremi, x^b : hastalık yapmadığı tam olarak bilinmemektedir, x^c : göz, x^d : tükürük bezleri, x^e : böbrek, x^f : ovidukt

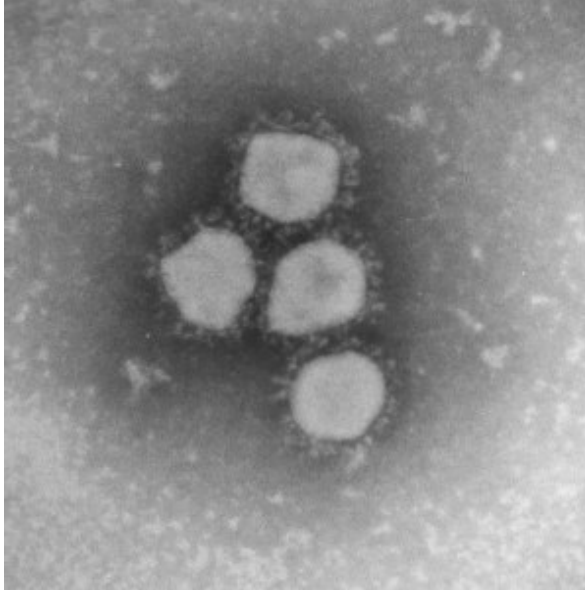
Önceleri SARS-CoV, sekanslanmış diğer tüm Coronavirus' lardan farklı ve dördüncü grup olarak bildirilmesine karşın, daha sonra yapılan çalışmalarla elde edilen bulgulara göre, 2. grubun içerisinde bir alt grup olarak kabul edilmektedir (Tablo 2-1). Çoğu Coronavirus doğal olarak sadece bir hayvan türünü ya da sınırlı sayıda yakın ilişkili hayvan türlerini infekte etmektedir. SARS-CoV, bu durum için bir istisnadır; çünkü insanlar, insan dışı primatlar, Himalayalı palmiye misk kedileri (civet cat), rakunlar, kediler, köpekler ve kemiricilerin de dahil olduğu geniş bir memeli grubunu infekte ettiği gösterilmiştir. Ayrıca yarasadan da, SARS-CoV' una çok benzer CoV' lar (BatCoV) izole edilmiştir (59, 81).

2.3. Virion Morfolojisi ve Yapısı

Coronavirus virionları pleomorfik olmakla birlikte genelde yuvarlak bir yapıya sahip, yaklaşık 80-160 nm çapında, zarflı partiküllerdir. Virion içinde tek zincirli, 27-32 kb büyüklüğünde, sarmal, segmentsiz, pozitif polariteli genomik RNA bulunur. Tüm Coronavirus' lar büyük bir RNA genomuna sahiptir ve tüm RNA virusları içinde en büyük genoma sahip virus cinsidir (57). Genomunda, türlere göre değişmek üzere yaklaşık 27.000-31.500 nukleotid vardır (86). Moleküler ağırlığı 6×10^6 dalton ve sedimentasyon katsayısı 70S' tir (2). RNA genomu nukleokapsit fosfoproteiniyle (N) bağlantılıdır; birlikte uzun, esnek, sarmal nukleokapsiti meydana getirirler. Nukleokapsit virus partikülünden ayrıldığında, 14-16 nm çapında uzun tübüler zincir olarak görülür. En az iki Coronavirus' un (TGEV ve MHV) sarmal nukleokapsiti 65 nm çapında, sferik ya da ikosahedral olabilen internal kor yapısı ile çevrelenmiştir (57). Bu yapı membran glikoproteini (M) tarafından oluşturulmaktadır (43).

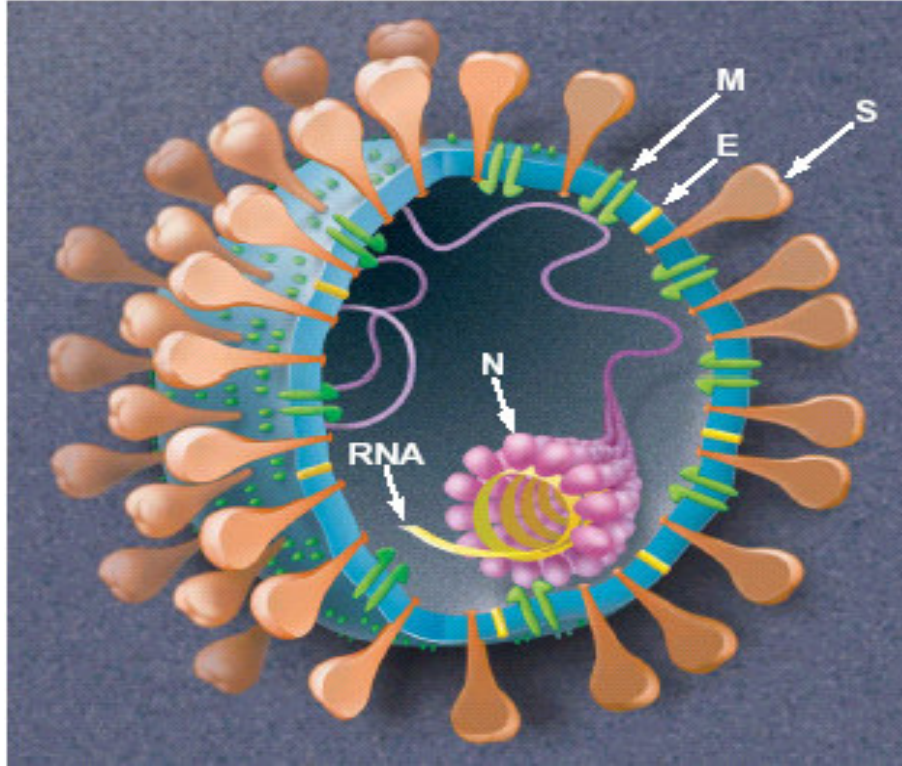
Kor dışındaki lipoprotein yapıdaki zarfın, virusun hücre içi membranlardan tomurcuklanması esnasında oluştuğu bilinmektedir (57). Lipit yapıda olduğundan eter gibi lipit çözücüler, iyonik olmayan deterjanlar, formaldehit, oksitleyici çözücüler, asit, ısı ve UV-radyasyonuna duyarlıdır (86). HCoV-229E suşlarıyla infekte WI-38 hücrelerinin ince kesit preparatlarının elektron mikroskobu incelemesinde; virionların 7-8 nm kalınlığında bir zarf, orta kısmında 4-8 nm kalınlığında elektron-şeffaf bir tabaka, 9-17 nm kalınlığında elektron-yoğun bir kabuğa sahip iç nukleokapsit ve değişik yoğunlukta amorf materyal bulunan bir merkezi zona sahip olduğu görülmüştür (2).

Şekil 2-1' de, negatif boyanmış HCoV-NL63' ün elektron mikroskobu görüntüsü görülmektedir (100).



Şekil 2-1: Negatif boyanmış HCoV-NL63' ün elektron mikroskobu görüntüsü (100).

CoV zarfının yüzeyinde, bu virusa özgü uzun ve topuz (spike, petal) şekilli, glikoprotein yapıda peplomerler vardır ve bunlar iki tiptir: Spike glikoproteininden (S) oluşan uzun çıkıntılarının boyu 20 nm, uç kısmının genişliği yaklaşık 10 nm' dir ve tüm CoV' larda mevcuttur (2, 57). Bu glikoprotein, uzunluğundan dolayı virionun en dıştaki parçasıdır. Hemagglütinin-esteraz glikoproteininden (HE) oluşan kısa çıkıntılar ise, sadece bazı CoV' larda (HCoV-OC43, BCoV) bulunmaktadır. CoV zarfında bunlardan başka yapısal proteinler de bulunmaktadır. Şekil 2-2' de, CoV' ların şematik şekli görülmektedir (73).



S: Spike Glikoproteini E: Zarf Glikoproteini M: Membran Glikoproteini N: Nukleokapsit Fosfoproteini

Şekil 2-2: Coronavirus' ların şematik görünümü (73).

2.3.1. Yapısal Proteinler

2.3.1.1. Spike Glikoproteini (S)

Önceleri "E2" olarak adlandırılan spike glikoproteini (S), virion yüzeyindeki büyük, petal-şekilli çıkıntıları (spike) oluşturur. Bu çok glikozile protein, yaklaşık 150-180 kDa ağırlığındadır ve zarfta bol miktarda bulunmaktadır. Glikozilasyonun, virus nötralizasyonunda önemli bir unsur olduğu sanılmaktadır (86). S proteini, zarf dışındaki N-terminal ucundan, zarf içindeki C-terminal ucuna doğru, üç yapısal bölgeye ayrılabilir: Bunlar sırasıyla, S1 ve S2 olarak iki alt bölgeye ayrılabilen bir büyük dış bölge, bir transmembran bölgesi ve kısa bir karboksiterminal sitoplazmik bölgeden oluşur. S1 alt bölgesi molekülün N-terminal kısmını içerir ve spikelerin küresel kısmını oluşturur. Uygun hücrelerin yüzeyindeki spesifik reseptörlere bağlanmadan sorumludur (57). Farklı CoV' larda, hatta bir CoV'un farklı suşlarında bulunan S1 glikoproteininin, uzunluk ve nukleotid sekanslarında önemli farklılıklar vardır. S1' deki bu farklılığın muhtemelen mutasyon, CoV' lar arasındaki rekombinasyon ve in vivo kuvvetli pozitif

seleksiyondan kaynaklandığı düşünülmektedir (44). S1 sekansları üzerindeki mutasyonların reseptöre bağlanma, doku tropizmi ve füzyon mekanizmasında etkili olduğu bildirilmektedir. SARS epidemisinde daha az şiddetli infeksiyonlara neden olan SARS-CoV ile, misk kedilerinden izole edilen SARS-CoV' un S proteini üzerine yapılan incelemelerde, daha az şiddetli infeksiyon yapan virusların, misk kedilerindeki ACE2 (angiotensin-converting enzim) reseptörüne, insan ACE2 reseptörüne göre daha etkili bağlandığı; oysa epideminin şiddetli dönemindeki insan SARS-CoV' larının, her iki reseptöre de aynı şekilde bağlandığı saptanmıştır. Bu bilgi, S' nin reseptöre bağlanma bölgesindeki aminoasit mutasyonlarının ne kadar etkili olduğunun, en önemli göstergelerinden biridir (11). Aynı şekilde Zürafa Coronavirusu' nun (GiCoV), Sığır Coronavirusu' na (BCoV) göre S proteininde 5 aminoasitin eksik olduğu, bu virusların germ-free buzağılara inoküle edildiğinde, BCoV' undan daha şiddetli infeksiyon oluşturdıkları ve hücre kültüründe infektivite titrelerinin çok yüksek olduğu rapor edilmiştir (38). Bir başka bulgu da, sığırların enterik CoV' larının S proteinindeki aminoasit değişiklikleri sonucu, solunum sisteminde infeksiyon oluşturmalarıdır (40). S1 sekansındaki büyük delesyon ve insersiyonların sıklıkla meydana geldiği birkaç çok değişken bölgenin, spikelerin yapısı için elzem olmayan bölgeler olabileceği; buna karşılık S2 sekanslarının daha korunmuş olup spikelerin sap kısmını oluşturduğu bildirilmektedir (44, 57).

Çoğu MHV suşu ve BCoV' lardaki S proteini, olgunlaşma sırasında ya da sonrasında hücrel bir proteaz tarafından, S1 ve S2' ye bölünmekte; SARS-CoV' da ise bölünme, hücreye giriş esnasında olmaktadır. S' nin bölünmesi, değişik Coronavirus' larda farklı olup konak hücre tipine de bağlıdır. Grup 1 Coronavirus' ların S proteini bölünmemesine rağmen, bazıları (FIPV) hücre-hücre füzyonunu indükleyebilir (57). Grup 2 CoV' ların S proteini, S1 ve S2 arasında bir bölünme bölgesi içerir ve S' nin bölünmesi, reseptöre bağlanmada aktif forma ulaşmak için çok önemlidir (82). MHV' un S proteininin bölünmesinin, onun hücre-hücre füzyon aktivitesini artırdığı düşünülmekle beraber, bu bölünme virusun infektivitesi için elzem değildir (18).

S glikoproteininin çeşitli önemli biyolojik fonksiyonları vardır. S' nin monoklonal antikoları, virus infektivitesini nötralize edebilir. Bu durum, S proteininin hücrel reseptörlere bağlandığı görüşünü desteklemektedir. S1 bölgesinin aminoasit dizilimi, hayvanlardaki Coronavirus' ların hedef hücre özgüllüğü için kritiktir. Bu

durum, özellikle SARS-CoV’ da iyi gösterilmiştir: Virus yarasadan palmiye misk kedisi ve insanlara geçerken, S glikoproteini, konak hücre reseptöründeki (ACE2) tür-spesifik farklılıklara adapte olmuştur (57).

S proteini konak hücredeki spesifik reseptöre bağlanarak, viral zarf ile konak hücre membranının füzyonunu; ayrıca hücre-hücre füzyonunu da indüklemektedir. Sadece S proteininin ekspresyonu, reseptör taşıyan hücrelerin füzyonunu indükleyebilir. Membran füzyon aktivitesinden, muhtemelen S2 içindeki internal hidrofobik sekanslar sorumludur. S proteininin dikkat çeken bir diğer özelliği de, spesifik reseptör yokluğunda da, hücre-hücre füzyonunu indükleyebilmesidir; bu yetenek, hayvanlardaki artan virulansı açıklamaktadır (57).

S glikoproteini, infekte konağın immun sisteminin virusu tanımasında birincil unsurdur. Enfeksiyon esnasında meydana gelen nötralizan antikorların baş indükleyicisidir (90). MHV ile infekte hücrenin membranındaki S proteininin varlığı, hücreyi B hücre bağlantılı sitotoksisteye duyarlı kılmaktadır. Bazı Coronavirus’ ların (MHV, TGEV) S glikoproteini, IgG’ nin Fc fragmentine bağlanabilme yeteneğindedir. Bu moleküler mimikrinin, S proteinini antiviral antikorlarına karşı koruyarak, viral patogeneze rol oynadığı düşünülmektedir. BCoV ve HCoV-OC43’ ün S proteinleri ayrıca glikan ihtiva eden 9-O-asetil nöraminik (sialik) aside bağlanabilmektedir. Bu bağlanmanın, duyarlı hücrelerde enfeksiyonun başlamasını kolaylaştırdığı düşünülmektedir. S proteini, hemagglütinasyon aktivitesine de sahiptir. (57). IBV ve MHV’ un spikesız virionları, infeksiyöz değildir (90). Sonuç olarak S proteini hücre tropizmi, konak seçimi, nötralizan antikor oluşumu ve CoV enfeksiyonlarının patogeneze ve biyolojisinde önemli rol oynayan çok fonksiyonlu bir protein olarak değerlendirilmektedir (19, 57).

2.3.1.2. Hemagglütinin-Esteraz Glikoproteini (HE)

Önceleri “gp65 glikopeptit” ya da “E3” olarak adlandırılan Hemagglütinin-Esteraz Glikoproteini (HE), bazı Grup 2 CoV’lar (HEV, BCoV, MHV, HCoV-OC43) ile Grup 3 Hindi Coronavirusu’ nda (TCoV) bol miktarda bulunmaktadır ve 65-70 kDa ağırlığındadır (57, 90). Bu glikozile protein, virion üzerinde kısa uzantılar olarak görülmektedir. Viral replikasyon için elzem olmadığı düşünülmektedir; çünkü bulunduğu CoV’ lar arasında bile varlığı ya da yokluğu çok değişkendir ve devamlı hücre kültürü pasajlarında, yapısı sıklıkla mutasyona ya da tamamen delesyona

uğramaktadır (57, 86). Yüksek hemagglütinasyon özelliği ve virus partiküllerinin hücreden salınmasında rol oynayan esterase aktivitesi vardır; hemadsorbsiyona sebep olabilir (57, 79, 95). Bu özellikler, virusun titresini ölçmede ya da infekte organ kültürü hücrelerini saptamada kullanılabilir (44). Ayrıca suşlar arasındaki biyolojik özelliklerin ortaya konulmasında hemagglütinasyon, hemagglütinasyon inhibisyon ve reseptörü inhibe eden enzim aktivitelerinin (receptor-destroying enzyme activity) titrelerinin hesaplanmasında kullanılabilir (39).

CoV' un HE proteininin, İnfluenza C virusun HE proteini ile yaklaşık % 30 aminoasit sekans benzerliği vardır; bu proteinin, geçmişe ait bir CoV'un genomik RNA' sı ile İnfluenza C virusun HE geninin mRNA' sının rekombinasyonundan türemiş olabileceği düşünülmektedir (10). BCoV ve HCoV-OC43' ün S proteinleri gibi, çeşitli CoV' ların HE proteini, 9-O-asetil nöraminik aside bağlanabilir ve bu gruptan asetil gruplarını ayıran asetilesteraz aktivitesi, hücre yüzeyine yapışan virionların ayrılmasını sağlamaktadır (44). HE' nin 9-O-asetil nöraminik aside bağlanmasının, konak hücre membranında virusun yoğunlaşmasını sağlayarak, bu yolla S' nin spesifik reseptörüne bağlanmasını kolaylaştırdığı düşünülmektedir (86). Bu özelliklerinden dolayı, hedef hücreye virusun bağlanmasından ya da infekte hücreden virus salınımından sorumlu olduğu düşünülmektedir (57).

HE, virusun konak hücre membranlarına ilk adsorbsiyonuna aracı olabilmekte; fakat sonradan diğer CoV' larda görülene benzer bir mekanizmayla, adsorbsiyon muhtemelen S proteininin spesifik bir reseptörle etkileşimini gerektirmektedir. Bu sonuç, şu bulgularla desteklenmiştir: Virion yüzeyinde S proteininin yokluğunda HE' nin varlığı, doku kültürü hücrelerinin viral infeksiyonuna aracılık etmede yetersiz kalmaktadır. Ayrıca kemirici hücrelerinin MHV' un HE içeren bir suşuyla infeksiyonu, virionda HE proteini olmasına rağmen, hücresel reseptör ya da viral S proteinine karşı oluşan monoklonal antikorlarla inhibe olmuştur (57).

2.3.1.3. Membran Glikoproteini (M)

Önceleri "E1" olarak isimlendirilen bu glikozile protein, 25-35 kDa ağırlığındadır ve virusun zarfında bol miktarda bulunmaktadır (57, 86). Diğer CoV glikoproteinlerinden farklı olarak, membran glikoproteininin (M) sadece kısa bir aminoterminal bölgesi viral zarf dışında açıkta kalmaktadır. Bu bölgeyi takiben zarfı üç

kere geçen bir α -heliks bölgesi ve viral zarfın içinde büyük bir karboksiterminal bölge bulunmaktadır. TGEV gibi bazı CoV' larda M' nin karboksiterminal kısmı, virion yüzeyinde açıkta kalmaktadır (57). Yüksek derecede hidrofobiktir (44). M' nin dış bölgesine karşı oluşmuş bazı monoklonal antikorlar, virus infektivitesini nötralize etmektedir. M proteini plazma membranına taşınıp orada görülmez; hedefi golgi aygıtının başlangıç bölgesidir. M proteini, virus partiküllerinin birleştirilmesi ve olgunlaşmasında anahtar bir role sahiptir (57). RNA' ya afinitesi olduğu gösterilmiştir (92). Viral RNA paketleme sinyaliyle etkileşerek, nukleokapsitlerde virus RNA' sının paketlenmesinde de kritik role sahip olduğu düşünülmektedir. N ve S proteinlerinin ikisiyle birden etkileşimdedir. N ile etkileşimde olması, nukleokapsitle ilişkili olduğunu düşündürmektedir (57). Bu durum in vitro koşullarda MHV' un M glikoproteininin, izole edilmiş nukleokapsite bağlandığının gösterilmesiyle de kanıtlanmıştır (44). TGEV ve MHV' da, nukleokapsit dışındaki kabuğu oluşturur. Bazı CoV' ların M proteini, interferon-alfa oluşmasını indüklemektedir (57).

2.3.1.4. Zarf Glikoproteini (E)

Önceleri “sM (small membran)” olarak adlandırılan bu protein, 9-12 kDa ağırlığında, küçük ve viral zarfta az miktarda bulunan, glikozile olmayan bir proteindir (57, 86). E proteini lipit membranı iki kere geçer; proteinin iki ucu da virus lümenindedir. Virion partiküllerinin birleştirilmesini tetiklediği düşünülmese rağmen, elzem değildir. Çünkü E ekspresyonu yetersiz olan virusla infekte hücrelerden, anormal şekilli olmakla birlikte, yine de virionlar salınmaktadır. İnfekte hücre içinde tomurcuklanma için, M ve E glikoproteinlerinin ikisi de gereklidir. Kıvrılarak lipit tabakayı bozması, virus tomurcuklanmasındaki rolünü açıklar. Sadece E' nin ekspresyonu, hücreden vesikül salınımı için yeterlidir (57). Ayrıca E proteini çok iyi anlaşılammışsa da SARS-CoV, HCoV-229E, MHV ve IBV' da, soyunma ve olgun virionların salınımında görevli bir iyon kanalı gibi fonksiyon gördüğü gösterilmiştir (63). MHV ve SARS-CoV' da apoptozu indüklediği gösterilmiştir (3, 112).

2.3.1.5. Nukleokapsit Fosfoproteini (N)

50-60 kDa ağırlığındadır. Viral sarmal nukleokapsiti oluşturmak için, genomik RNA' ya bağlanır ve RNA zincirinin dayanıklılığını sağlar (57, 95). N' nin üç yapısal bölgesi vardır ve RNA, orta bölgeye bağlıdır (44). N proteini, M ile direk etkileşimdedir

(106). Muhtemelen virusun tomurcuklanması esnasında, M' nin sitoplazmik bölgesine bağlanır (44). Bu etkileşim, virus partiküllerinde nukleokapsidin kaynaşmasını sağlar. N' ne karşı oluşan antikorun, in vitro CoV RNA polimeraz reaksiyonunu inhibe ettiğini gösteren bir çalışmaya göre, N ayrıca replikasyonda da rol oynamaktadır. Buna uyumlu olarak N proteini, viral RNA' nın üretildiği ve toplandığı bölgelerde lokalize olur. Bu özellikle muhtemelen, RNA replikasyon komplekslerinin oluşumunu ve virus partiküllerinin birleştirilmesini kolaylaştırmaktadır. Ayrıca hücresel bağışıklığa sebep olur (57).

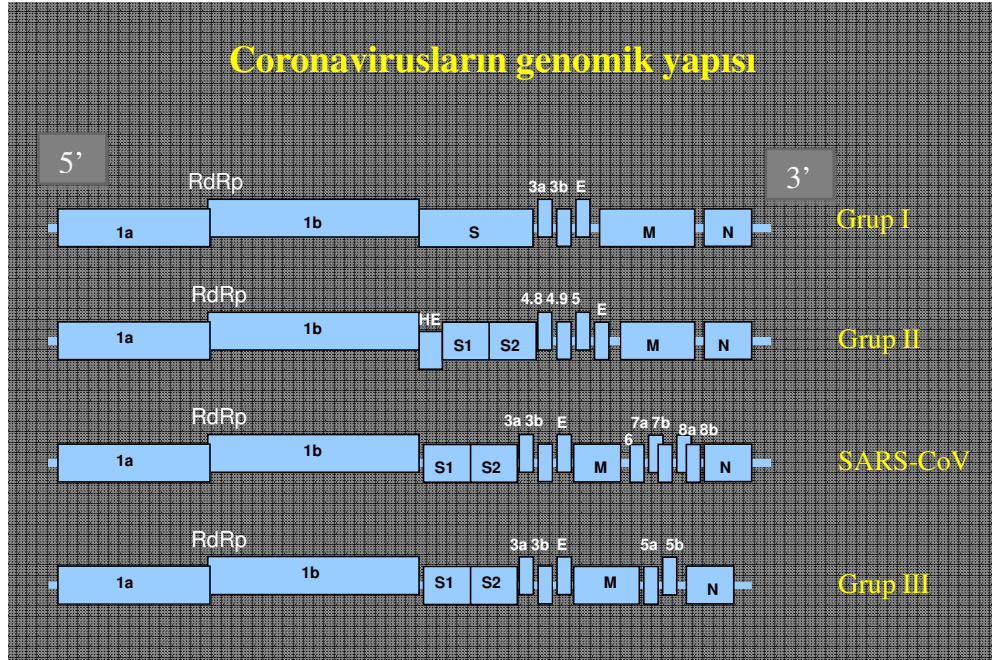
2.3.2. Viral Genom ve Yapısal Olmayan Proteinler

CoV genomik RNA' ları "cap"li, poliadenillenmiş ve mRNA gibi fonksiyon görebilen, pozitif polariteli RNA' lardır yani virion içinde RNA-bağımlı RNA polimeraz enzimi (RdRp) yoktur ve purifiye genomik RNA infeksiyözdür (44, 57). Genomun 5' ucundaki 65-98 nukleotidlik sekans, "lider RNA" olarak adlandırılır ve aynı zamanda tüm subgenomik mRNA' ların 5' ucunda da bulunur. Bu lider sekansı, 200-400 nukleotidlik bir UTR (untranslated region) takip eder. Genomun 3' ucunda, 200-500 nukleotidlik diğer UTR vardır ve bunu da değişik uzunluklardaki poly (A) takip eder. 3' ve 5' uçtaki UTR sekanslarının ikisi de, RNA replikasyonu ve transkripsiyonunda önemlidir (57). Genomun kalan kısmında 7-14 ORF (open reading frame) bulunur ve bunlar yapısal proteinleri kodlar (86). 5' uçtaki Gen 1, genomun üçte ikisini kapsar; yaklaşık 20-22 kb uzunluğundadır ve iki ORF' den (1a ve 1b) oluşur. Bu ORF' ler ribozomal çerçeve kayma mekanizmasıyla, RNA-bağımlı RNA polimeraz ve proteazların prekürsörü olan bir poliproteine dönüşür (57).

IBV ve SARS-CoV dışındaki çoğu CoV, ORF 1a' da iki papain-benzeri proteaz kodlar. Tüm CoV' lar ayrıca M^{pro} ya da 3CL^{pro} olarak adlandırılan kemotripsin-benzeri bir proteaz kodlar. Genom ayrıca polimeraz ve çok fonksiyonlu bir helikaz proteini ve hemagglütinin-esteraz kodlar. Bu proteinin helikaz aktivitesinin yanında NTPaz, dNTPaz ve 5'-trifosfataz aktivitesi vardır. CoV' ların muhtemel bir 3'-5'-ekzonukleaz (ExoN), uridilate-spesifik bir endoribonukleaz (NendoU) ve S-adenozilmetionin-bağımlı bir 2'-O-riboz metiltransferaz (2'-O-MT) kodladığı tahmin edilmektedir. Bunlardan birkaçının aktiviteleri, son zamanlarda doğrulanmıştır (57, 66). ORF 1a ve

1b arasında, ribozomal çerçeve kayma mekanizması için elzem olan 7 nukleotidlik bir sekans vardır (44).

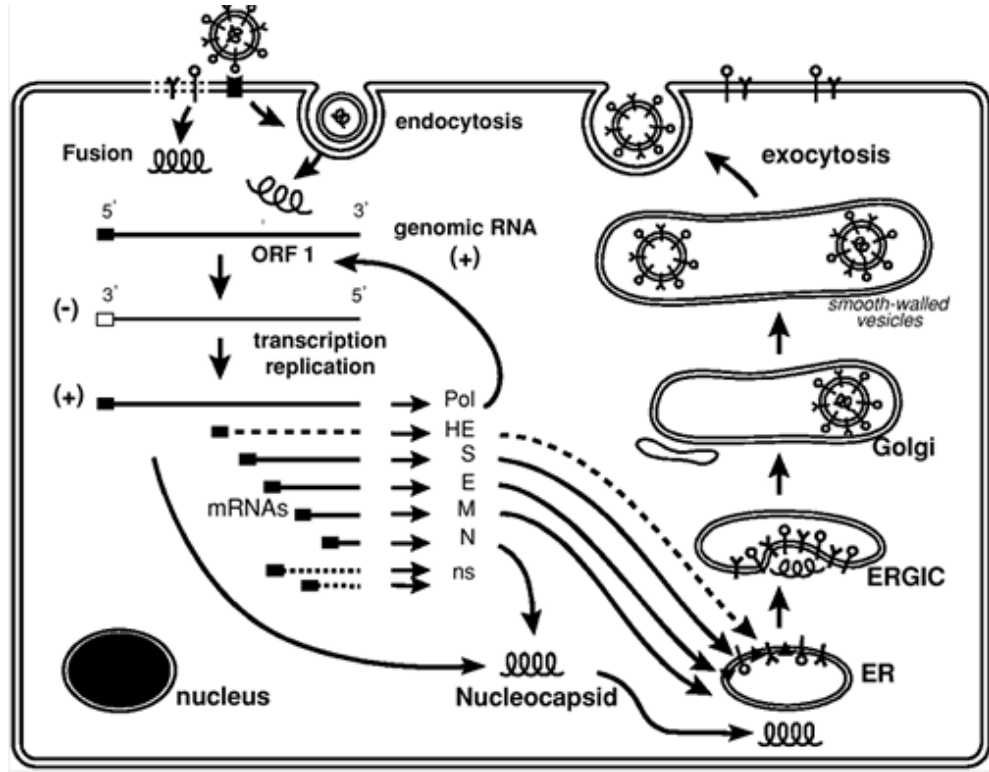
Tüm CoV' lar da bulunan dört yapısal proteini ve polimerazı (*Pol*) kodlayan genlerin düzeni, 5'-*Pol*-S-E-M-N-3' şeklindedir (Şekil 2-3). Bu sıra, tüm CoV genomlarında korunmuştur (45, 86). Genomun en korunmuş bölgesi, polimeraz genidir ve Pancorona primerleri bu bölgeden seçilerek reverse transcription -Polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile genel CoV taraması yapılır (41, 62). Bu genlerin aralarına, yapısal olmayan proteinleri ve HE glikoproteinini kodlayan birkaç ORF yerleşmiştir. Yapısal olmayan proteinler ve HE' nin bulunduğu CoV' lar arasında sayı, nukleotid sekansı, gen düzeni ve ekspresyon metodu bakımından belirgin farklılıklar vardır; fakat aynı grup içinde korunmuşlardır; bu yüzden bunlara “grup-spesifik proteinler” denir. Yapısal olmayan proteinler virus replikasyonunda elzem değildir, fakat delesyonları çoğunlukla viral atenüasyona sebep olur (57). İn vivo virus patogeneğinde rol oynayıp oynamadıkları kesin değildir. CoV genomunun değişik bölgelerine bu genler muhtemelen, RNA rekombinasyonu aracılığıyla yerleşmiştir (44). Bu yapısal olmayan proteinlerin sayıca en fazlasına SARS-CoV sahiptir (57). Bazı CoV' ların genomik yapıları, Şekil 2-3' te gösterilmiştir (45).



Şekil 2-3: Coronavirus' ların genomik yapısı (45).

2.4. Coronavirus Replikasyonu

CoV replikasyon şeması Şekil 2-4' te görülmektedir (57). Bu virusun replikasyonu, infekte hücrenin sadece sitoplazmasında meydana gelir (44). Diğer zarflı viruslarla karşılaştırıldığında, replikasyon yavaştır: Örneğin İnfluenza virusunda replikasyon süresi 6-8 saatken, CoV' da 24 saattir (62). Replikasyon döngüsünün ilk basamağı, virionların hedef hücrelerin plazma membranına bağlanmasıdır. Viral tropizmin ana belirteci olarak S proteinini, hücre yüzeyindeki bir spesifik reseptör glikoproteine bağlanır. Bazı CoV' lar için tanımlanmış reseptörler Tablo 2-2' de görülmektedir (57, 83).



Şekil 2-4: Coronavirus replikasyon döngüsü (57).

Çoğu CoV kesin tür spesifitesi göstermesine rağmen, bu viruslar da diğer RNA virusları gibi in vitro ya da in vivo pasajlar sırasında mutasyona uğrarlar. Bu durum in vitro gösterilmiştir: Seçici baskılanma altında, S proteinini mutasyonlu olan MHV varyantları, insan karsinoembriyonik antijen (CEA) reseptörlerini kullanabilmiştir. Bu

tür bariyerini geçme yeteneği, SARS epidemisinin sebebini açıklamaktadır. Kedi APN' si (aminopeptidaz N), Kedi Coronavirus' larına (FECoV, FIPV) reseptör olmasının yanında HCoV-229E, TGEV ve CCoV için de reseptördür (57).

HCoV-OC43 ve BCoV, hedef hücrelerin yüzeyindeki 9-O-asetil sialik asiti tanıyabilen HE ya da S glikoproteini ile hedef hücreye bağlanır. Reseptör olarak sialik asiti kullandıklarından, in vitro çok sayıda türün hücrelerini infekte edebilmekte ve in vivo fare infekte etmek için tür bariyerini geçebilmektedir. Virionların sialiklenmiş kısımlara bağlanması, muhtemelen viral dayanıklılığı artırıp, gastroenterik kanalda virus infeksiyonunu kolaylaştırmaktadır (57).

Tablo 2-1: Coronavirus' lar, infekte ettiği konaklar ve bilinen hücre reseptörleri (57, 83)

Antijenik Grup	Virus	Konak	Reseptör
1a	HCoV-229E: Human Coronavirus-229E	İnsan	APN
1a	TGEV: Transmissible Gastroenteritis Virus	Domuz	APN
1a	PRCoV: Porcine Respiratory Coronavirus	Domuz	APN?
1a	CCoV: Canine Coronavirus	Köpek	APN
1a	FECoV: Feline Enteric Coronavirus	Kedi	APN
1a	FIPV: Feline Infectious Peritonitis Virus	Kedi	APN
1b	HCoV-NL63: Human Coronavirus-NL63	İnsan	ACE2
1b	BatCoV: Bat Coronavirus	Yarasa	?
2a	HCoV-OC43: Human Coronavirus-OC43	İnsan	9-O-ASAC
2a	HCoV-HKU1: Human Coronavirus-HKU1	İnsan	?
2a	MHV: Murine Hepatitis Virus	Fare	CEACAM1
2a	SDAV: Sialodacryoadenitis Virus	Sıçan	?
2a	HEV: Hemagglutinating Encephalomyelitis Virus	Domuz	9-O-ASAC
2a	BCoV: Bovine Coronavirus	Sığır	9-O-ASAC
2a	GiCoV: Giraffe Coronavirus	Zürafa	?
2b	SARS-CoV: Severe Acute Respiratory Syndrome-CoV	İnsan	ACE2
3	IBV: Avian Infectious Bronchitis Virus	Tavuk	?
3	TCoV: Turkey Enteric Coronavirus	Hindi	?

APN: Aminopeptidaz N, ACE2: angiotensin-converting enzyme 2, 9-O-ASAC: 9-O-acetylated sialic acids (neuraminic acid), CEACAM1: human carcino-embryonic antigen cell adhesion molecule 1.

SARS-CoV izole edildikten kısa bir süre sonra konak hücre reseptörü ACE2 olarak tanımlanmıştır. ACE2 diğer dokular yanında akciğer, kalp, böbrek ve ince bağırsakta da görülür. SARS-CoV da esas olarak akciğer ve ince bağırsağı infekte eder; bunun yanında viral nükleik asit diğer organlarda da saptanır. Palmiye misk kedileri ve insanlardan izole edilen SARS-CoV' lar genomik olarak birbirlerine yakın olmalarına karşın, insan ACE2 reseptörüne bağlanma yetenekleri farklıdır (57).

Virusun spesifik reseptöre bağlanması sonucu S proteini, viral zarfla konak hücre membranının füzyonunu indükleyen konformasyonel bir değişiklik geçirir ve virus bu yolla hücrenin içine girer. Deneysel tecrübeler, farklı CoV' ların hücrelere farklı mekanizmalarla girdiğini göstermektedir: Asidik pH' ya bağlı endositozla ya da pH' dan bağımsız plazma membranına füzyon yoluyla konak hücreye giren virus soyunur (57).

Viral RNA sitoplazmaya salındığında, büyük bir poliproteini oluşturmak için ribozomlara bağlanır ve ribozomal çerçeve kayma mekanizması (Ribozomlar, mRNA' daki sinyallere karşılık olarak, farklı bir okuma penceresine hareket eder ve translasyona bu yeni pencerede devam eder) ile translasyona uğrar (26, 44, 57). Bu büyük poliprotein, translasyon esnasında ya da sonrasında, virusun kendi proteazlarıyla (papain-benzeri proteaz PL^{pro}, kemotripsin-benzeri proteaz M^{pro}) kesilerek, farklı proteinlere dönüşmek üzere işlenir: Yapısal olmayan polimeraz ve ATPaz helikazı; yapısal proteinler olan HE, S, M, N' ni oluşturur (57, 70).

RNA-bağımlı RNA polimeraz, (+) genomik RNA'yı, (-) template RNA sentezlemek için template olarak kullanır. Sonra polimeraz bu (-) template RNA' yı, yeni genomik (+) RNA ve subgenomik (+) mRNA' ları sentezlemek için kullanacaktır. Subgenomik mRNA' ların sentezi için öne sürülen kesintili transkripsiyon modeline göre; genomik (+) RNA, (-) RNA sentezinde template olarak görev yapar. Fakat (+) genomik RNA'nın 3' ucundan başlayan transkripsiyon, bir IS' da (intergenik sekans) durur ve sonra henüz açıklanamayan bir mekanizmayla 5' uçtaki lider sekansa sıçrar. Transkripsiyonun sonlanması muhtemelen, lider RNA ile IS elementleri arasındaki etkileşim sonucu meydana gelir. Bu şekilde, subgenomik (-) mRNA' lar sentezlenmiş olur. Sonra her subgenomik (-) mRNA, subgenomik (+) mRNA' ların doğru ve kesintisiz bir transkripsiyonu için template olarak görev yapar (44). Kesintili transkripsiyonla oluşan altı nested mRNA' nın her biri, bir yapısal protein kodlar (26).

Negatif zincirli RNA infeksiyon başlangıcında sentezlenir, fakat ilerleyen evrelerde azalır. Buna karşılık pozitif zincirli RNA türleri infeksiyon boyunca, son evrelere kadar sentezlenir (57). İnfekte hücrelerde (+) viral RNA, (-) viral RNA' dan 10 ila 100 kat arasında fazladır (44).

ORF 1a ve 1b proteinleri, viral RNA replikasyonu olan bölgeye taşınır. Bu proteinler, yeni sentezlenmiş viral RNA ve N proteiniyle, nukleokapsiti oluşturmak için, perinukleer alan yakınındaki “rough endoplazmik retikulumun” lümenine tomurcuklanırlar (44, 57).

S proteini translasyon sırasında rough endoplazmik retikuluma girer ve glikozile olur. Trimer haline geldikten sonra dışarı çıkar; M ve E proteinleriyle etkileşime girerek, virion partiküllerinin birleştirilme bölgesine göç eder. Golgi aygıtına transportu sırasında yüksek-mannozlu glikanları düzenlenir ve olgun hale gelmiş olur. S proteininin bir kısmı plazma membranına taşınır ve bu bölgede hücre füzyonuna sebep olur. Son olarak bazı CoV' ların (özellikle Grup 2 ve Grup 3 CoV' ları) S proteini, S1 ve S2 alt ünitelerine bölünür (57).

M proteini rough endoplazmik retikulum üzerinde sentezlenip endoplazmik retikulum membranına girer ve glikozile edilir. M proteini çoğunlukla virusun tomurcuklanma bölgesinde; az bir kısmı da golgi aygıtında lokalize olur (57). Plazma membranına taşınmaz (44). Buna karşılık E proteini, endoplazmik retikulum ve golgi aygıtı arasındaki ERGIC' de (endoplasmic reticulum-golgi intermediate compartment) lokalize olur (57).

Bazı CoV' larda bulunan HE proteini, translasyon esnasında rough endoplazmik retikulumda glikozile olur ve dimerler meydana getirir. Golgi aygıtına taşınıp burada olgunlaşır ve tomurcuklanan virus partiküllerinin zarfına dahil olur. Bir kısım HE proteini de plazma membranına taşınıp hücre yüzeyine yerleşir ve burada hemadsorbsiyona sebep olabilir (57).

Elektron mikroskobu incelemelerine göre virus tomurcuklanmasının meydana geldiği yer, ERGIC denen endoplazmik retikulum ve golgi aygıtı arasındaki düz duvarlı vesiküllerdir. Fakat infeksiyon ilerlerken rough endoplazmik retikulum da virus olgunlaşma yeri olmaktadır. Her zaman, M ve E proteinleri arasındaki etkileşim, normal virus tomurcuklanma sürecini tetiklemektedir. E proteini virionda çok küçük miktarlarda bulunur; bir E proteinine karşılık 100 M proteini olabilir. Buna göre E

proteini belki de virion oluşumunda yapısal bir role sahip değilse de, virion morfogenezinde gereken membran değişimini başlatıcı olarak görev yapmaktadır (44).

Tam bir virus partikülü, N proteini ile viral RNA' nın etkileşimi ile şekillenen sarmal bir nukleokapsit içerir. Sonra nukleokapsit endoplazmik retikulumda M proteini ile etkileşime girer ve böylece virus partikülünde paketlenir. Şaşırtıcı olarak M, N olmasa bile viral RNA ile direk etkileşime girebilir. S yokluğunda spikesız virus partiküllerinin oluşabilmesi, S' nin virus partiküllerinin birleştirilmesi için elzem olmadığını fakat infeksiyöz virus partiküllerinin oluşumu için gerekli olduğunu göstermektedir (57).

Tomurcuklanmadan sonra virus partikülleri golgi aygıtına giderler, daha ileri morfolojik değişimler geçirerek olgunlaşırlar ve salgısal vesiküllere ulaştıklarında, sıkı ve elektron-yoğun kor kısımlarıyla olgun bir virus partikülü görünümü almış olurlar. Virionlar büyük, düz duvarlı vesiküllerde birikir. Bu vesiküller plazma membranına ekzositozla yapışır ve ekstraselüler alana virusları salar (57). Ya da apoptozla hücreden salınırlar (82). Yani virionlar plazma membranından tomurcuklanmazlar. Çok sayıda virion, infekte hücrenin plazma membranına yapışmış halde kalır (44).

Virus salınımı, virusa ve konak hücre tipine bağlı olarak, apikal ya da bazolateral membranlardan, ya da her ikisinden olabilir. CoV' la infekte olmuş epitel hücreleri, birkaç gün sonra ölür ve epitelden dökülür. Apikal salınım, solunum ya da enterik kanal hücrelerine virusun yayılımında etkiliyken; bazolateral salınımın, virusun sistemik yayılımını kolaylaştırdığı düşünülmektedir. İn vitro koşullarda HCoV-229E' nin, hAPN (insan aminopeptidaz N) sergileyen epitel hücrelerinin hem apikal hem bazolateral yüzeylerinden salınabildiği gösterilmiştir (43).

2.5. Virus İnfeksiyonunun Konak Hücrelere Etkileri

Virus tipi ve konak hücre tipine bağlı olarak CoV infeksiyonu, değişik sitopatik etkileri indükler. Örneğin MHV, BCoV, IBV ya da SARS-CoV hücre füzyonuna sebep olur (57). Füzyon, S glikoproteini tarafından meydana getirilir ve pH 6,5'in altında gerçekleşmez (44). MHV, E proteini vasıtasıyla apoptozu da indükler. Ayrıca bazı SARS-CoV proteinleri, hücre sinyal yol izlerini etkileyip hücresel fonksiyonlarda bozukluğa ve artan sitokin ve kemokin ekspresyonuna neden olabilir (57).

Hücre ölümü ya da sitopatik etki olmaksızın haftalarca virus üretiminin olduğu persistan CoV enfeksiyonu, doku kültürü hücrelerinde kolayca meydana gelir. Genelde sitosidal enfeksiyondan sonra bir kısım hücreler enfeksiyöz virus üretir ve virus üretimi aylarca devam eder. HCoV-229E' nin, insan oligodendrosit ve glial hücre kültürlerinde persistan enfeksiyon yaptığı gösterilmiştir. Persistan enfekte kültürdeki hücreler, wild-tip virusla süperenfeksiyona dirençlidir ve çeşitli replikasyon-kusurlu mutantlar, sıklıkla bu kültürlerden izole edilir (57).

2.6. Virus Mutantları

Çoğu RNA virusu gibi CoV' lar da, RNA polimerazın yüksek hata frekansından dolayı yüksek sıklıkta mutasyon geçirirler (57). CoV' un genom uzunluğu ve diğer viruslardaki RNA polimerazın hesaplanmış hata sıklığı göz önüne alındığında, CoV genomik RNA' sı muhtemelen, her replikasyon döngüsü boyunca, birkaç nokta mutasyonu biriktirir (44). Yüksek mutasyon hızı virusun özelliklerinde, konaklarında ve hastalık şekillerinde değişimler olmasına yol açar (66).

Çeşitli tipte mutantlar izole edilmiştir. Isıya duyarlı (temperature-sensitive=ts) olan MHV mutantları en az yedi gruba ayrılmıştır ve bunlardan beşi, uygun olmayan ısı koşullarında RNA sentezleyemez. Delesyon mutantları da sık ortaya çıkar. Çoğu doğal MHV suşu, S proteininin çok değişken bir bölgesinde 200' e varan aminoasit delesyonuna sahiptir ve in vivo da değişmiş biyolojik özellikler gösterir. Delesyon mutasyonunun biyolojik önemini gösteren en ilginç örnek, TGEV' dan PRCoV' un ortaya çıkmasıdır. İki virusun nükleotid sekanslarının karşılaştırılması sonucu PRCoV' un, TGEV' un S proteininde büyük bir delesyona uğramış hali olduğu anlaşılmıştır (113).

2.7. RNA Rekombinasyonu

CoV genetiğinin kendine has bir özelliği, özellikle MHV' da olmak üzere, yüksek sıklıkta RNA rekombinasyonudur (57). Miks enfeksiyon sırasında, iki farklı CoV' un mRNA' larının lider sekansları takas olabilir (67). Yeni tiplerin ortaya çıkışı da muhtemelen, mutasyon ve rekombinasyon yoluyla meydana gelmektedir (106). Diğer viruslardaki segmentsiz RNA genomlarının çoğunda az ya da saptanamayacak sıklıkta rekombinasyon meydana gelirken, tüm CoV genomunun rekombinasyon sıklığı %25' e kadar hesaplanmıştır. Bu yüksek oran muhtemelen, CoV RNA sentezinin, kesintili transkripsiyon ve polimeraz sıçramasını içeren kendine has mekanizması

sebebiyledir. Bugüne kadar RNA rekombinasyonu MHV, TGEV ve IBV için hem doku kültürü hem de deneysel ve doğal hayvan infeksiyonlarında gösterilmiştir (44, 57).

CoV' ların doğal evriminde, RNA rekombinasyonu önemli bir mekanizmadır (57, 90). Örneğin kümes hayvanları topluluğu içindeki yeni IBV tipleri, farklı tarla ve aşı tipleri arasındaki doğal evrimin sonucudur (57). RNA rekombinasyonu, farklı CoV türlerinin evriminde de rol oynayabilir. Rekombinasyon, CoV' lardaki HE geninin İnfluenza C virusundan geldiği hipotezini açıklayabilir (10). Bazı FECoV biyotiplerinin, FECoV ile CCoV arasındaki rekombinasyondan meydana gelmiş olduğu düşünülmektedir (57). CoV' ların farklı antijenik gruptan olan virusla rekombinasyona uğramaması ve mRNA' larının ayrı ayrı bulunması, viral genomlar arasında muhtemelen rekombinasyonu teşvik eder ve genetik çeşitlilik artar (62, 73). Filogenetik incelemelerde de SARS-CoV' un, Grup 2 içindeki BCoV' a daha yakın olması bunu açıklayabilir (57).

2.8. Coronavirus İnfeksiyonlarında Patogenez

Çoğu CoV önce solunum ya da enterik kanalın epitel hücrelerinde replike olur (57). İnsan solunum CoV' ları nazofarinksin sillli epitel hücrelerinde replike olup; muhtemelen sillli hücrelerin dejenerasyonuna, kemokin ve interlökin üretimine sebep olarak soğuk algınlığı semptomlarının ortaya çıkmasına sebep olurlar (1). TGEV, BCoV, HEV, CCoV, FECoV ve MHV' u da kapsayan diğer CoV' lar, enterik kanalın epitel hücrelerini de infekte ederler. Bu viruslar genç hayvanlarda şiddetli ve bazen ölümcül olabilen diyareye sebep olurlar (105). Yetişkin hayvanlarda orta dereceli infeksiyon oluşturarak, popülasyonda virusun devamlılığını sağlarlar (17). İnsan embriyonu trake organ kültüründe üretilen HCoV-OC43 virusu, süt emen bebek farelere beyin içi veya periton içi yolla verildiğinde, bebek farelerde ensefalit sendromu oluşturur. Beyin içi yol daha etkilidir. Sütten kesilmiş fareye yapılan inokülasyonda, benzer belirtiler görülmez; asemptomatik infeksiyon oluşabilir (2).

CoV' lar zarflı olduğundan, doğada ve klinik örnekte, Rhinovirus gibi çoğu zarfsız virustan daha az dayanıklıdır (57). Virionların infektivitesi, pH 6' ya oldukça dayanıklıdır; fakat hafif alkali pH' da hızla inaktif olur (44). Bununla beraber SARS-CoV doğal yüzeylerde şaşırtıcı biçimde dayanıklıdır. Bu zarflı virusların, enterik kanaldaki safra ve proteolitik enzimlerin varlığına rağmen infektivitesini nasıl muhafaza

ettiği henüz açıklanamamıştır. CoV zarf glikoproteinleri çok glikozile olduğundan, virionların konak hücre proteazlarıyla bozulmaya dirençli olduğu düşünülmektedir (57).

İlk olarak 1960' larda üst solunum yolu enfeksiyonlu hastalardan izole edilen insan CoV'ları (HCoV-229E ve HCoV-OC43) ile son yıllardaki izolatlar karşılaştırıldığında, genetik çeşitlilik düzeylerinde önemli farklar olduğu görülmüştür. Farklı coğrafi bölgelerden izole edilen HCoV-229E' de bu çeşitliliğin az olmasına karşın, Amerika ve Fransa' dan izole edilen HCoV-OC43 sekansları daha farklıdır ve aynı coğrafi bölgeden farklı yıllarda izole edilmiş olanlarda da önemli sekans değişiklikleri bildirilmiştir. HCoV-OC43' ün fare hücrelerinde de üreme ve fare beyninde üremeye de kolayca adapte olma yeteneği, onun mutasyonları tolere etme yeteneğini göstermesine karşın, HCoV-229E fareleri infekte etmemektedir (57).

Orta dereceli solunum yolu hastalığı olan kişilerden izole edilen yeni CoV' lardan HCoV-NL63, antijenik Grup 1 üyesidir ve bu grubun diğer üyesi HCoV-229E ile homoloji gösterir. Fakat onun kullandığı hAPN reseptörünü kullanmaz; Grup 2 üyesi SARS-CoV' un reseptörü olan ACE2' yi kullanır. Ama SARS-CoV' dan farklı olarak ACE2 reseptörüne sahip hücreleri infekte etmek için katapsin L kullanmaz ya da endozomal asidifikasyona gereksinim duymaz; ayrıca onun gibi şiddetli solunum yolu hastalığına da sebep olmaz (57).

Bazı çalışmalarda, CoV-benzeri partiküller multipl sklerozlu hastaların merkezi sinir sisteminde tespit edilmiş ve ayrıca fare ya da kemirici hücre kültüründe pasajdan sonra, hastaların beyninden izole edilmiştir. Yapılan bir çalışmaya göre HCoV-229E RNA' sı, test edilen 90 insan beyninden 40' nda (yaklaşık %44) saptanmıştır; bu oran, multipl skleroz hastalarının beyinlerindeki orana ve diğer nörolojik hastalıklardan ölenlerin oranına ya da normal kontrol kişilerin beyinde saptanan orana aşağı yukarı eşittir. HCoV-OC43 sekansları da, test edilen 90 beyinden 21' inde (yaklaşık %23): multipl sklerozlu hastaların beyinde %36 insidansla ve kontrollerin %14' ünde saptanmıştır (4). RT-PCR çalışmaları, HCoV-229E ve HCoV-OC43' ün nukleokapsit genlerindeki sekansları, insan beyin dokusu ve beyin-omurilik sıvısında tanımlamıştır. Hem HCoV-229E hem de HCoV-OC43, in vitro insan fetal beyin hücresinin primer kültüründe persistan enfeksiyona sebep olabilir. Bu sonuçlar anlamlı olsa da, HCoV' ların solunum yolu harici hastalıklardaki (özellikle merkezi sinir sistemindeki

hastalıklar) rolünün daha iyi anlaşılması için, daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır (43).

2.9. İnsan ve Hayvan Coronavirusları Arasındaki İlişki

SARS' ın ani ortaya çıkışı, CoV' ların olası hayvan rezervuarından aniden ortaya çıkıp, insanlarda ölümcül hastalıklara sebep olabilme potansiyeline bir örnektir. SARS epidemisine kadar, CoV' ların insanlarda çoğunlukla orta dereceli infeksiyon meydana getirdiği düşünülmese de, veteriner Coronavirologlar bu virusların hayvanlarda ölümcül solunum ve enterik infeksiyon meydana getirme potansiyelini; ayrıca yeni CoV suşlarının bilinmeyen rezervuarlardan aniden ortaya çıkarak, genç hayvan popülasyonlarında ölümcül hastalıklara sebep olabileceğini bildirmişlerdir. Örneğin domuz epidemik diyare CoV (PEDV) domuzlarda endemik olmadan önce ilk olarak, 1970 ve 1980' lerde Avrupa ve Asya' da bilinmeyen bir kaynaktan meydana çıkıp, bebek domuzlarda şiddetli diyare ve yaygın ölümlere sebep olmuştur. PEDV Amerika' daki domuzlarda görülmemiştir. İlginç olarak PEDV genetik bakımdan, diğer Grup 1 hayvan CoV' larına değil; insan CoV olan HCoV-229E' ye daha yakındır. Ayrıca diğer Grup 1 CoV' lardan farklı ve SARS-CoV' a benzer olarak, Vero hücrelerinde ürer. Bunlar, bu virusun kökeni hakkında cevaplanmamış ve merak uyandıran sorulardır (83). SARS-CoV' un vahşi hayvanlardan insanlara geçişi, hayvan CoV' larının türler arası geçişi ve CoV' ların doğal yaşam rezervuarları konusunda yapılmış daha önceki çalışmalara göre, ilk değildir. PRCoV, TGEV, CCoV ve FECoV' lar domuz, köpek ve kedileri, tür engelini aşarak infekte edip çeşitli hastalıklara ve çarpraz-korumaya sebep olabilirler. Diğer bir örnek olan BCoV' ların da, memeli konakları infekte etmesinin yanında, birçok türü (örneğin bebek hindiler) deneysel olarak infekte edip hastalığa sebep olduğu gösterilmiştir. BCoV' un geniş konak spektrumunun sebebi bilinmemektedir. Deneysel çalışmalarda SARS-CoV makak ve gelincikleri infekte edip hastalık meydana getirmiş; kedileri de asemptomatik olarak infekte etmiştir (113).

Başka bir seçenek olarak, doku tropizmi ve virulansı farklı yeni CoV suşları, belki de var olan suşlardan ortaya çıkmaktadır. Örneğin daha az virulan PRCoV, yüksek virulanslı enterik CoV olan TGEV' un S genindeki delesyon mutasyonu ile ortaya çıkmıştır. Bu bölgedeki delesyon muhtemelen, enterik dokudan solunum dokusuna değişen tropizmin ve PRCoV suşlarının azalmış virulansının sebebinin göstergesidir (83).

Bunun dışında hayvan CoV' ları, rekombinasyon yoluyla yeni genler elde edebilirler. Buna örnek olarak CoV' larda, İnfluenza C-benzeri bir hemagglütininin kazanılması gösterilebilir (10). CoV' lar arasındaki rekombinasyon olayı sonucunda, değişmiş doku ya da konak tropizmlili yeni suşlar da meydana gelebilir. Örneğin kedi ve fare CoV' nun S proteini arasındaki hedeflenmiş rekombinasyon, kedi CoV' nun fareyi infekte etmesini kolaylaştırır (35). Son filogenetik analizlere göre SARS-CoV, memeli-benzeri ve kanatlı-benzeri ebeveyn suşların S geni arasındaki geniş bir rekombinasyon olayından türemiştir (91). Bu bilgilere göre SARS-CoV insanlarda bulunmaya devam ederse, mutasyon ve rekombinasyon yoluyla, yeni doku tropizmi ve virulans kazanmaya benzer olaylar, insan SARS-CoV' larında da meydana gelebilir (83).

SARS-benzeri CoV infeksiyonunun kanıtı için pek çok doğal hayvan test edilmesine rağmen, sadece bir yarasa türünde (Horseshoe bat; *R. sinicus*), SARS-CoV infeksiyonunun doğal rezervuarı olduğuna uyumlu bir infeksiyon modeli bulunmuştur. Ayrıca misk kedilerinin SARS-CoV' un doğal rezervuarı olduğunu düşündürecek izolasyonlar yapılmış olsa da, bunun yanlış olduğunu gösteren bazı kanıtlar vardır (57).

Çin' deki iki grubun yaptığı epidemiyolojik çalışmalara göre, Çin horseshoe yarasaları, SARS-CoV' un doğal rezervuarıdır. İnsan izolatlarında olmayıp, misk kedisi izolatlarında olan 29 nukleotidlik sekans, bu yarasalardan izole edilen virusta da bulunmaktadır. Muhtemelen infekte yarasalar infeksiyonu, doğal hayvan pazarında beraber bulunduğu hayvanlara (misk kedisi, rakun) bulaştırmış, sonra da virus insanlara bulaşmıştır. Başka bir seçenek de, virusun insana yarasadan direk bulaşmasıdır (59, 64). Güneydoğu Asya' nın bazı bölgelerinde yarasa eti lezzetli bulunmakta ve ayrıca bazı Çin geleneksel tıp uygulamalarında, yarasa dışkısı kullanılmaktadır. Yani yarasa ve insanlar arasındaki temas, SARS-benzeri CoV' ların bulaşı için muhtemel bir vasıta. Aynı zamanda yarasalar kuduz, Lyssavirus, Hendra ve Nipah Virusları gibi pek çok zoonotik etkenin önemli bir rezervuarı da olduğundan, insanların ya da başka hayvanların yarasayla teması, potansiyel bir tehliktir (46). Son bilgilere göre SARS-CoV muhtemelen yarasadan çıkarak, zoonotik bir yolla (Çin' de yiyecek olarak kullanılan misk kedisi) insanlara geçmiştir (59).

TGEV da SARS-CoV gibi enterik (viloz atrofi, malabsorbtif diyare, ölümcül gastroenterit) ve solunum infeksiyonlarına sebep olur. PRCoV da SARS-CoV gibi damlacık infeksiyonuyla yayılır ve akciğere belirgin tropizmi vardır. SARS-CoV gibi

akciğer epitel hücrelerinde replike olur ve subklinik infeksiyonlarda bile akciğer lezyonları meydana getirir. İnfeksiyonun klinik semptomları, SARS-CoV' a benzer olarak ateş, dispne, polipne, anoreksi ve letarjidir; enterik infeksiyon da görülebilir (84). SARS-CoV da belki BCoV gibi pnömoenteriktir. BCoV' un meydana getirdiği kış dizanterisinde, SARS' da olduğu gibi çocuklarda, yetişkinlere göre daha hafif hastalık görülmektedir. BCoV' larda da HCoV' da olduğu gibi, doğal infeksiyondan sonra üst solunum yolunda uzun süreli mukozal immunité sağlanamamaktadır. Sığırların uzak mesafelere nakli ve bu esnada farklı çiftliklerden olan hayvanlarla bir arada bulunmaları fiziksel stres meydana getirerek, hayvanların savunma mekanizmalarını zayıflatmakta ve bu esnada yakın temasla, daha önce maruz kalmadıkları yeni patojenler ya da suşlarla karşılaşmaktadırlar. Buna benzer durum, SARS epidemisi sırasında da yaşanmıştır: Uzun uçak yolculuklarının meydana getirdiği fiziksel stres ve bu esnada dünyanın değişik bölgelerinden bireylerle yakın temas, muhtemelen bireylerin SARS' a hassasiyetini arttırmıştır. PRCoV ya da SARS infeksiyonunda, bakteriyel lipopolisakkaritlerin yoğun salınımına sebep olacak antibiyotik tedavileri, proinflamatuvar sitokinleri yoğun olarak indüklemekte ve böylece akciğer hasarı artmaktadır. Bu yüzden SARS infeksiyonunda, hastalığın şiddetini belirleyen bu lipopolisakkarit ve akciğer sitokin seviyelerinin ölçümü yapılmalıdır (83). Bir domuzun önce Domuz İnfluenza A virusuyla infekte edilip, sonradan PRCoV ile infekte edildiği deneysel bir çalışmada, domuzun akciğerinde azalmış virus titresi ve artmış akciğer lezyonları görülmüştür. Çalışmacılar bu durumu, PRCoV tarafından indüklenen yüksek interferon-alfanın, Domuz İnfluenza A virusu replikasyonunu engellediğini ve akciğer lezyonlarının artmasına da katkıda bulunduğunu düşünmüşlerdir (104). Bu durum SARS-CoV' un İnfluenza virusla koinfeksiyonu durumuna ve SARS' ın interferon-alfayla tedavisi konusuna ışık tutabilir. PRCoV ile yapılan çalışmalara göre yüksek doz ve aerosollerle infekte olma durumunda, oronasal ya da yakın temasla infeksiyona göre, daha fazla ve daha uzun süre CoV saçılımı olmaktadır (49). Bu durum SARS-CoV' a benzerlik gösterir: Hastane ortamında meydana gelen aerosol ya da başlangıçta yüksek dozlara maruz kalmak, SARS bulaşını arttırabilir ya da daha şiddetli solunum hastalığına sebep olabilir. SARS hastalarının kortikosteroidlerle tedavisi sonucunda immun sistemin geçici olarak baskılanması, daha şiddetli solunum hastalığına ya da daha uzun süreli ve artmış CoV saçılımına sebep olabilir. Güncel bilgilere göre kedilerde akut enterik infeksiyona sebep olan FECoV, kedilerin %5-10 kadarında

sistemik virulan FIPV' a evrimleşerek, bazı kedilerde persistan infeksiyon meydana getirmektedir (42). Bu modele göre, SARS-CoV' un virulansı artmış makrofaj-tropik mutantları ortaya çıkarak, bazı hastalarda sistemik ya da immun sistem odaklı persistan infeksiyona sebep olabilir. IBV da SARS-CoV gibi aerosol ya da fekal-oral bulaşla yayılır ve dünyanın her yerinde mevcuttur; SARS-CoV gibi böbreği infekte eder (83).

SARS-CoV, tüm CoV' lar arasında en şiddetli hastalığa sebep olandır (105). Hayvan CoV' larının meydana getirdiği enterik ya da solunum infeksiyonu modeli, SARS hastalarının klinik özelliklerine benzerlik gösterir: Çoğunda solunum infeksiyonu görülmesine rağmen, bazı vakalarda enterik komplikasyonlar da görülür. SARS infeksiyonuna benzer olarak, yetişkin hayvanlarda BCoV, TGEV ve PRCov' un meydana getirdiği infeksiyonlarda, çeşitli faktörler (altta yatan hastalık, yüksek doza maruz kalma, bulaş yolu, solunum yolu koinfeksiyonları, nakil ve farklı çiftlik hayvanlarıyla beraber kalmaya bağlı stres, kortikosteroidlerle tedaviye bağlı immun sistemin baskılanması) varlığında daha şiddetli hastalık görülür (52). SARS-CoV üst solunum yolu ve alveolar epitel hücrelerini beraber infekte ederek, akciğer hasarına sebep olur. Hastalık sürecinde odak noktası akciğer olmasına rağmen, virus ya da viral ürünler böbrek, karaciğer ve ince bağırsak gibi diğer organlarda da saptanır. Buna uygun olarak virus dışkıda da saptanır. İmmunopatolojik mekanizmayla uyumlu olarak, infeksiyöz virus miktarı azalırken, hastalığın kliniği kötüleşir (70, 77). MHV ve FIPV gibi SARS-CoV da, makrofaj ve dendritik hücreleri infekte eder; ama bu iki hayvan virusundan farklı olarak, SARS-CoV bu hücrelerde abortif bir infeksiyona sebep olur. İnfekte hastalarda lenfopeni ve nötrofili saptanır. SARS-CoV, otopside dalak ve lenfoid dokuda saptanır ve bir çalışmada virusun direk lenfositleri yıkmasıyla uyumlu olarak, T ve B hücrelerinde virus saptanmıştır (57). PCR çalışmalarına göre, hastalığın ikinci haftasında virus titresi en yüksek seviyededir (77). Ayrıca virus en uzun dışkı materyalinde kalmaktadır (70).

SARS-CoV' un göze çarpan bir özelliği de, diğer HCoV' lara göre, genomun 3' ucundaki yapısal genler arasındaki, yapısal olmayan proteinleri kodlayan çok sayıda gene sahip olmasıdır. Bu proteinlerin görevi bilinmemektedir, fakat muhtemelen infekte bireydeki şiddetli hastalığa katkıda bulunmaktadır. Bu genlerin yapısının bozulmasının, doku kültürü hücrelerinde virusun üreme yeteneğini etkilememesi, bunların viral replikasyon için elzem olmadığını göstermektedir (57).

Çözülmemiş önemli bir sorun, SARS-CoV' un insanlarda böyle şiddetli bir hastalığa nasıl sebep olduğudur. SARS-CoV fare, gelincik, hamster, kedi ve maymunu da içeren çeşitli hayvan türlerini infekte eder. Koch' un prensiplerini gerçekleyen ilk çalışmalarda, sinomolgus makaklarına virus inoküle edildikten sonra, insanda görülene benzer akciğer hastalığı meydana geldiği görülmüştür. Bir çalışmada, SARS-CoV' la infekte edilen genç farede asemptomatik infeksiyon meydana gelirken, daha yaşlı farede semptomatik infeksiyon meydana gelmiştir. 2003 SARS epidemisinde de, 60 yaşından büyüklerde hastalık daha şiddetli görülmüştür (26, 47, 57, 70).

2.10. İnsan Coronavirus İnfeksiyonları

HCoV' un etken olduğu soğuk algınlığının en tipik belirtisi, burun akıntısı ve kırınglıktır (106). Yapılan çalışmalara göre HCoV' lar erişkinlerde soğuk algınlığı ve farenjit gibi üst solunum yolu infeksiyonu etkeni; bazen de küçük çocuklar, yaşlılar ve immun sistemi baskılanmış bireylerde bronşit, bronşiolit, pnömoni ve astım alevlenmesi gibi alt solunum yolu infeksiyonu etkeni olarak bildirilmektedirler (29, 94). Solunum yolu infeksiyonu dışı hastalıklardaki rolü, henüz iyi anlaşılamamıştır. HCoV' un bazen özellikle yenidoğanlarda enterik hastalıklara sebep olduğu düşünülmektedir (32).

Doğal infeksiyon ve gönüllü çalışmaları, HCoV' larda reinfeksiyonun yaygın olduğunu işaret etmektedir. HCoV-229E ile yapılan bir gönüllü çalışmasında, kişiler inokülasyondan önce serolojik yöntemle incelenmiş ve %80' den fazlasında HCoV-229E' ye karşı eski infeksiyonlardan kaynaklanan nötralizan antikorlar saptanmıştır. Seropozitif gönüllüler, bir yıl içinde HCoV-229E' nin aynı tipiyle semptomatik olarak reinfekte olabilmektedir. Bu veriler, infeksiyonun yüksek düzeyde koruyucu bağışıklığı indüklediğini; diğer viral üst solunum yolu hastalıklarında olduğu gibi, ancak kısmi bir bağışıklığın oluştuğunu göstermektedir. İnfeksiyondan yaklaşık bir hafta sonra serumdaki antikor miktarı artar; ikinci haftada pik yapar ve yaklaşık 12-18 ay sonra, düşük miktarlara geriler (9). M ve N' ne karşı sentezlenmiş spesifik immunglobulinlere rağmen, serum antikor cevabı başlıca S proteinine karşı gelişmektedir (86).

2.10.1. HCoV-229E İnfeksiyonları

HCoV-229E' nin intranazal yoldan inoküle edildiği gönüllü bireylerde gelişen semptomlar ateş, baş ağrısı, kırınglık, üşüme, burun akıntısı (Rhinovirus' un sebep

olduğu soğuk algınlığındaki burun akıntısından, belirgin şekilde fazla), boğaz ağrısı ve ortalama 3,3 gün süren öksürüktür. Günlük sarf edilen kağıt mendil sayısı 8-105 olup, ortalama 23' tür. Gönüllülerin yaklaşık yarısında hastalık gelişmiş; yaklaşık %30' u, virus üst solunum yolunda saptanmasına rağmen, asemptomatik infeksiyon geçirmiştir. Ortalama 2 günlük inkübasyon süresinden sonra, infeksiyon semptomlarının görülmesi ve aynı anda meydana gelen virus saçılımı, 3 günden 18 güne kadar değişmekle birlikte, ortalama 7 gün sürmüştür. Virus inokülasyonundan sonra gönüllülerin %60' ında, virus-nötralizan antikor titrelerinde anlamlı artış (4 kat ya da daha fazla) görülmüştür. HCoV inokülasyonundan önce ve sonra, gönüllülerin interferon-alfa ile intranasal yoldan tedavisi soğuk algınlığı geçirme insidansını düşürmüş, semptomların şiddetini ve virus saçma miktarını azaltmıştır (9).

HCoV-229E' nin araştırıldığı daha güncel bir çalışmada ise, 2 aylık solunum yolu infeksiyonlu çocuklarda en fazla üst solunum yolu infeksiyonu ve akut otit olmakla birlikte akut bronşit, akut konjunktivit, akut larenjit ve pnömoniye sebep olduğu belirtilmiştir (74). Yine çocuklarda HCoV-229E' nin araştırıldığı bir yayında ateş, burun akıntısı, öksürük, hırıltı ve anormal göğüs filmi semptomları olan hastalarda akut bronşiolit, astım alevlenmesi ve altta yatan astımı olan hastalarda pnömoniye sebep olduğu belirtilmiştir (94). Simon ve ark. (88) ise, apne ataklarıyla acil servise başvuran 4 aylık kız çocukta, etkeni HCoV-229E olan ALTE (akut life threatening event) saptamışlardır. 15 yaş altı çocuklarda yapılan bir incelemede virusun soğuk algınlığı, farenjit, konjunktivit, akut otit, krup, hırıltı, pnömoni ve gastrointestinal hastalığa sebep olduğu bildirilmiştir (24). Bir pediatri ve yenidoğan yoğun bakım servisinde meydana gelen solunum salgınlarındaki incelemede, özellikle premature bebeklerde HCoV-229E' nin şiddetli solunum yolu infeksiyonuna sebep olduğu anlaşılmıştır (29).

2.10.2. HCoV-OC43 İnfeksiyonları

HCoV-OC43' ün 2 aylık çocuklarda araştırıldığı bir çalışmada, virusun en sık üst solunum yolu infeksiyonu ve akut otit olmakla birlikte akut bronşit, akut larenjit ve akut tonsilite sebep olduğu gösterilmiştir (74). Tüm yaş gruplarında HCoV-OC43' ün araştırıldığı bir çalışmada çoğunda ateş, gastrointestinal bozukluk, rinit, baş ağrısı, anoreksi, miyalji, farenjit; az miktarda da otit ve larenjit semptomları bulunan hastalarda, virusun üst solunum yolu infeksiyonu ve bronşit, bronşiolit, altta yatan hastalığı olanlarda pnömoni gibi alt solunum yolu infeksiyonlarına sebep olduğu

belirtilmiştir (99). Collins ve ark. (16) 15 yaşındaki erkek çocukta, HCoV-OC43' ün etken olduğu bir akut dissemine ensefalomiyelit (ADEM) infeksiyonu tanımlamışlardır. Yaşlı hastalar arasında meydana gelen bir solunum salgınında yapılan incelemede, etkenin HCoV-OC43 olduğu bulunmuş; hastaların çoğunda hafif infeksiyona sebep olmakla birlikte, az bir kısmında pnömoniye de sebep olduğu belirtilmiştir. Bu hastalarda en sık görülen semptomlar öksürük, rinit ve ateş olmuştur (76). Çocuklarda HCoV-OC43' ün araştırıldığı bir çalışmada ateş, öksürük, solunum güçlüğü ve anormal göğüs filmi olan hastalarda etkenin HCoV-OC43 olduğu saptanmış, astım alevlenmesi ve altta yatan astım problemi olan hastalarda pnömoniye sebep olduğu belirtilmiştir (94). Simon ve ark. (87), 5 yaşındaki Down sendromlu ve akut lenfoblastik lösemili erkek çocukta öksürük, 39,8°C ateş ve nötropeni semptomları ile görülen toplumdan kazanılmış pnömoni infeksiyonunda, yaptıkları inceleme sonucunda etkenin HCoV-OC43 olduğunu saptamışlardır. Hastanede yatan solunum yolu infeksiyonlu çocuklarda yapılan bir HCoV-OC43 incelemesinde ise virusun hastalarda larenjit, konjunktivit, otit; gastroenterit; alt solunum yolu infeksiyonlarından bronşiolit, pnömoni ve astım alevlenmesine sebep olduğu belirtilmiştir (98).

2.10.3. HCoV-NL63 İnfeksiyonları

Hollanda' da rinit, konjunktivit ve ateş şikayetiyle hastaneye gelip bronşiolit tanısı konulan 7 aylık bir çocuktan alınan örnekte, ilk kez HCoV-NL63 tanımlanmıştır (101). 3 yaş altı çocuklarda aynı etken incelendiğinde etkenin krup, bronşit, bronşiolit ve pnömoni gibi alt solunum yolu infeksiyonlarına sebep olduğu ve krup ile güçlü ilişkisi olduğu sonucuna varılmıştır (102). Bastien ve ark.' nın (7) 17 yaş altı çocuklarda HCoV-NL63 sıklığını incelediği bir çalışmada, pozitif kişilerin genel semptomları öksürük, rinit ve ateş olarak saptanmıştır. Hastaların çoğunda üst solunum yolu infeksiyonu görülmekle birlikte bronşiolit, pnömoni, otit ve krup da meydana gelmiştir. Pozitiflerin yarısından fazlasında, altta yatan tıbbi problem varlığı bildirilmiştir. Bastien ve ark.' nın (6) tüm yaş gruplarında yaptıkları diğer bir çalışmada etkenin üst solunum yolu infeksiyonları, lenfadenit, rinit ve bronşiolite sebep olduğu; en sık görülen semptomlarınsa ateş, boğaz ağrısı ve öksürük olduğu ifade edilmiştir. Arden ve ark.' nın (5) çoğu çocuk olan tüm yaş grubu hastaları içeren bir çalışmasında, HCoV-NL63' ün sebep olduğu infeksiyonlarda en sık görülen belirtilerin öksürük, ateş, dispne ve rinit/kusma/hırıltı olduğu belirtilmiş; çoğuna astım, özellikle bronşiolit, pnömoni ya da

krup gibi alt solunum yolu infeksiyonu tanıları konduğu belirtilmiştir. Pozitif hastaların %25' inde altta yatan bir hastalık varlığı bildirilmiştir. 2 yaş altı çocuklar arasında yapılan bir çalışmada, HCoV-NL63' ün bronşiolit ve krupa sebep olduğu ve gözlemlenen semptomların hırıltı, ortalama 39,6°C ateş, öksürük ve burun akıntısı olduğu belirtilmiştir (22). Yine solunum yolu infeksiyonlu çocuklarda yapılan bir araştırmada, HCoV-NL63 pozitif hastaların %80' ine üst solunum yolu infeksiyonu ve %20' sine astım bronşiolit tanısı konmuştur. Pozitiflerin %40' ında predispozan faktör varlığı ve gözlenen semptomların 38,5°C' den fazla ateş, burun akıntısı, öksürük ve hırıltı olduğu bildirilmiştir (93). 16 yaş altı çocuklarda yapılan başka bir çalışmada semptomları öksürük, ateş, balgam ve dispne olan HCoV-NL63 ile infekte hastaların en çoğuna krup olmak üzere bronşiolit, astım bronşiolit ve pnömoni tanısı konulduğu ifade edilmiştir (37). Okul öncesi çocuklarda yapılan bir çalışmada ise, HCoV-NL63' ün etken olduğu solunum yolu infeksiyonlarında en sık görülen semptomun ateş olduğu belirtilmiştir (58). Wu ve ark.' nın (111) 15 yaş altı çocuklarda yaptığı bir çalışmada ise semptomları çoğunlukla öksürük, anormal göğüs filmi, ateş; daha az oranda rinit, dispne, hırıltı ve diyare olan hastalarda en sık görülen infeksiyonun krup olduğu, bunun yanında az oranda pnömoni, tonsilit, bronşiolit ve akut gastroenterit infeksiyonlarının da görüldüğü belirtilmiştir. Kistler ve ark.' nın (51) yaptığı bir çalışmada HCoV-NL63, astım alevlenmesi olmuş 3 yetişkinde saptanmıştır. Vabret ve ark.' nın (98) hastanede yatan solunum yolu infeksiyonlu çocuklardaki HCoV-NL63 incelemesinde, virusun hastalarda larenjit, konjunktivit ve otit; gastroenterit; alt solunum yolu infeksiyonlarından bronşiolit, pnömoni ve astım alevlenmesine sebep olduğu belirtilmiştir. Solunum yolu infeksiyonlu çocuklar arasında yapılan bir çalışmada, HCoV-NL63 ile infekte bir çocuğun semptomlarının, Kawasaki hastalığını düşündürdüğü belirtilmiştir (80).

2.10.4. HCoV-HKU1 İnfeksiyonları

Woo ve ark. (108) 2005 yılında Hong Kong' da, 71 yaşındaki ateş ve prodüktif öksürüğü olan bir hastadan, HCoV-HKU1' i tanımlayıp, pnömoni etkeni olduğunu ifade etmişlerdir. Aynı grubun, tüm yaş gruplarını içeren ardışık çalışmasında, HCoV-HKU1 pozitiflerin azında üst solunum yolu infeksiyonu; çoğundaysa alt solunum yolu infeksiyonu tespit edilmiştir. %80' inin altta yatan hastalığı olan pozitif hastalarda en sık görülen semptomlar ateş, prodüktif öksürük ve dispne; 1 kişide diyare olarak

bildirilmiştir (109). Esper ve ark.'nın (23) 5 yaş altı çocuklarda yaptığı bir incelemedeyse, infekte çocuklarda sıklıkla görülen semptomların burun akıntısı, öksürük, ateş ve oskultasyonda anormal nefes sesleri olduğu belirtilmiştir. Pozitif hastaların çoğunda üst solunum yolu infeksiyonu görülmesine rağmen, altta yatan hastalığı olanlarda pnömoni ve bronşiolit görüldüğü belirtilmiştir. Kistler ve ark.'nın (51) yaptığı bir çalışmada HCoV-HKU1, astım alevlenmesi olmuş bir yetişkinde saptanmıştır. Hastanede yatan solunum yolu infeksiyonlu çocuklarda yapılan bir HCoV-NL63 taramasında virusun konjunktivit, pnömoni, astım alevlenmesi ve gastroenterite sebep olduğu belirtilmiştir (98).

2.10.5. SARS-CoV İnfeksiyonları

HCoV infeksiyonunun çoğunlukla hafif hastalık meydana getirdiği düşüncesine karşılık, insanlarda SARS-CoV infeksiyonlarının neredeyse tamamı hastaneye yatmayı gerektiren (infeksiyonların yaklaşık %20'si; çoğunlukla yoğun bakım ünitesine) ciddi bir alt solunum yolu hastalığı ile sonuçlanmıştır. Salgında mortalite yaklaşık %10 idi; fakat altta yatan hastalığı olanlar ve yaşlılarda bu oran %50'ye ulaşmıştır. SARS'ın kliniği, diğer viral solunum yolu infeksiyonlarında görülenlerden farklı olmuştur: 4-6 gün, bazen 2 gün gibi kısa bir süre veya nadiren 10 günden fazla süren inkübasyon periyodundan sonra, semptomlar görülmeye başlamıştır. İlk belirtiler ateş ile birlikte baş ağrısı, kırgınlık ve kas ağrısı gibi sistemik semptomlardır. Burun akıntısı, boğaz ağrısı ve burun tıkanıklığı gibi üst solunum yolu semptomları çoğunlukla görülmemiş; ancak hastaların az bir grubunda görülmüştür. Sistemik semptomların başlamasından birkaç gün sonra, ilk solunum yolu semptomları (genelde kuru öksürük ve nefes darlığı) başlar. Hastaların azında başlangıçta; %70 kadarında da hastalık esnasında diyare gelişmiştir. Çoğu hastada anormal karaciğer fonksiyon testi (%70-90) ve hem CD4 hem de CD8 T hücrelerinde önemli bir azalmayla (%70-95) lenfopeni görülmüştür. Klinik seyri iyiye gitmeyen hastalarda çoğunlukla alveolar hasara bağlı olarak, giderek artan solunum bozukluğu (acute respiratory distress syndrome, ARDS) gelişmiş ve birkaç haftada ya da bazen birkaç ayda ölüm görülmüştür (57, 62, 86). Hastalığın şiddetli olması ilerleyen yaş, altta yatan kronik hastalıklar ve bazı laboratuvar test sonuçlarına (karaciğer enzimlerinin yükselmesi, lenfosit ve platelet miktarının azalması, klinik örnekte yüksek miktarda virus ya da viral RNA bulunması) bağlanmıştır. Çocuklar, yetişkinlere göre daha az şiddetli hastalık geçirmişlerdir. Asemptomatik ya da hafif hastalık nadirdir (57).

Asemptomatik vakaların, temas ettikleri kişilere virüsü bulaştırmadıklarına inanılmaktadır (61). Hamilelik sırasındaki infeksiyon, hem anne hem de bebeği öldürecek kadar şiddetli olabilmektedir (107). Diğer infeksiyonlarda olduğu gibi, yaşlı ya da altta yatan kronik hastalığı olanlarda beklenen şiddetli hastalık, bazı kişilerde çok hafif geçmiş ya da hiç görülmemiştir (57).

Pulmoner fonksiyon anomalilerinin hafiflemesi aylar alsa da, SARS-CoV infeksiyonundan hayatta kalanların çoğu, tamamen iyileşmiştir. Bununla beraber bazılarının pulmoner fonksiyonlarında, persistan azalma olmuştur (57).

2.11. İnsan Coronaviruslarının Epidemiyolojisi

Erken yaşlarda HCoV infeksiyonunun yüksek oranı ve salgınlar esnasındaki infeksiyon modeli, HCoV' ların insan popülasyonunda iyi yayıldığını göstermektedir: Çocukların çoğu okul yaşına varmadan önce infekte olmakta ve kış infeksiyonlarına defalarca yakalanmaktadır. Böylece aile içi yayılma da kolaylıkla meydana gelmektedir (57). Serolojik çalışmalar da HCoV-229E ve HCoV-OC43 antikorlarının, çoğunlukla erken çocuklukta meydana gelip hayat boyunca tekrar ederek, yaşla doğru orantılı olarak arttığını göstermektedir (85).

Doğal infeksiyon muhtemelen diğer solunum viruslarına benzer şekilde, yani infekte kişinin infeksiyöz sekresyonlarının inokülasyonu ya da infeksiyöz damlacıkların inhalasyonu yoluyla edinilmektedir (57).

Değişik popülasyonlarda solunum yolu hastalıkları konusunda yapılan çalışmalar, CoV' ların infeksiyona sebep olma oranının %5-30 arasında değiştiğini göstermektedir. Bu çalışmalarda pozitiflik oranı kişilerin yaşı, mevsim ve kullanılan metoda göre çeşitlilik göstermiştir. Ayrıca infeksiyon sıklığında, yıldan yıla değişiklikler de saptanmıştır. Ilıman iklimlerde HCoV-OC43 ve HCoV-229E en çok Aralık ve Mayıs ayları arasında saptanmaktadır; görülme sıklıkları yıldan yıla değişiklik göstermekte ve aktiviteleri 2-4 yılda bir pik yapmaktadır (57). Etkeni belirlenemeyen solunum yolu infeksiyonlarında, araştırılmadığından dolayı saptanamayan HCoV' un önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir (72). Ayrıca CoV-benzeri partiküllere gastrointestinal hastalığı olan yenidoğan, infant ve AIDS' li bireylerin dışkılarında sık rastlanılmakla beraber, rolü henüz iyi anlaşılamamıştır (32, 50).

2.11.1. HCoV-229E Epidemiyolojisi

İlk tanımlanan HCoV olan HCoV-229E' nin Amerika' daki seroepidemiolojisini inceleyen bir araştırmada çocuk ve genç yetişkinlerden alınan 243 serum örneği ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) ile incelenmiş ve 2 ay altı bebeklerde %57,1; yaşamın ilk 2.-3. ayında %38,9; 4.-5. ayında %4,7; 6.-12. ayında %42,9-50; 1-20 yaş arasında %34,8-62,5 oranlarında görüldüğü hesaplanmıştır (85). Chung ve ark. (13) Kore' de, akut hırıltı şikayetli 231 çocuktan alınan solunum örneklerini RT-PCR ile incelediklerinde, 2 (%0,9) pozitiflik bulmuşlardır. Lau ve ark.' nın (60) Hong Kong' da solunum yolu enfeksiyonlu 4181 çocuk ve yetişkinden aldıkları nazofaringeal aspirat örneğini RT-PCR ile inceledikleri çalışmada, 4 (%0,1) pozitif sonuç bulunmuştur. Tayland' da alt solunum yolu enfeksiyonlu 226 çocuktan alınmış nazofaringeal aspiratların RT-PCR ile incelendiği bir çalışmada, 8 (%3,5) pozitiflik bulunmuştur (94). Finlandiya' da 2 aylık çocuklardan alınmış 1866 nazofaringeal aspirat ve orta kulak sıvısı örneği RT-PCR ile incelendiğinde, Ağustos-Mart ayları arasında alınmış örneklerde 22 (%1,2) pozitiflik bulunmuştur (74). İngiltere' de 37 genç yetişkinden 5 yıl boyunca ardışık olarak alınan toplam 298 serumda ELISA ile yapılan incelemede, 15 (%5) pozitiflik saptanmıştır. Virusun en sık görüldüğü periyodlar Haziran-Eylül ve Aralık-Şubat ayları olmuştur (65). Belçika' da şiddetli solunum yolu enfeksiyonlu çocuklardan alınmış 309 solunum örneği RT-PCR ile incelenmiş, Nisan ayında alınmış 1 (%0,3) pozitif örnek bulunmuştur (72). İsviçre' de solunum yolu enfeksiyonlu yetişkinlerden alınan 540 bronkoalveolar lavaj örneği RT-PCR ile incelenmiş, 7 kişi (%1,3) pozitif bulunmuştur. Altta yatan hastalığı olan 1 kişi ölmüştür (30). Fransa' da bir pediatri ve yenidoğan yoğun bakım servisinde Şubat, Ağustos ve Aralıkta 3 kez meydana gelen nozokomiyal viral solunum yolu hastalığı salgınlarında, RT-PCR ile yapılan incelemede 152 yenidoğanda 43 (%28,3), 92 çocukta 7 (%7,6) pozitiflik tespit edilmiş; 7 çocuk ölmüştür (29). İspanya' da solunum yolu enfeksiyonlu çocuk ve yetişkinlerden alınmış 201 solunum örneği multipleks RT- nested PCR ile incelendiğinde, 1 (%0,5) pozitiflik bulunmuştur (15). İtalya' da solunum yolu enfeksiyonlu çocuk ve yetişkinlerden kış-ilkbahar sezonunda alınmış 823 solunum yolu örneği RT-PCR ile incelendiğinde, 10 (%1,2) pozitif örnek bulunmuştur (31).

2.11.2. HCoV-OC43 Epidemiyolojisi

Amerika’ da solunum yolu enfeksiyonlu yetişkinlerden alınan 82 solunum yolu örneği Virochip testiyle incelendiğinde, sonbaharda alınmış 1 hasta (%1,2) örneğinde pozitiflik bulunmuştur (51). Kolombiya’ da 2003 yazında, ölümlerin de görüldüğü bir yaşlı bakımevinde meydana gelen solunum yolu enfeksiyonu salgınında solunum, dışkı ve otopsi materyallerinden RT-PCR ile yapılan incelemede, 142 hastadan 95’ i (%67) ve 160 personelden 53’ ünün (% 33) HCoV-OC43 ile enfekte olduğu bulunmuş; 8 hasta ölmüştür (76). Chung ve ark. (13) Kore’ de, akut hırıltı şikayetli 231 çocuktan alınan solunum örneklerini RT-PCR ile incelediklerinde 3 (%1,3) pozitif örnek bulmuşlardır. Lau ve ark.’ nın (60) Hong Kong’ da solunum yolu enfeksiyonlu 4181 çocuk ve yetişkinden aldıkları nazofaringeal aspirat örneğini RT-PCR ile inceledikleri çalışmadaysa, genelde sonbahar-kış aylarında alınmış 53 (%1,3) pozitif sonuç bulmuşlardır. Tayland’ da alt solunum yolu enfeksiyonlu 226 çocuktan alınmış nazofaringeal aspiratın RT-PCR ile incelendiği bir çalışmada, 2 (%0,9) pozitiflik bulunmuştur (94). Finlandiya’ da 2 aylık solunum yolu enfeksiyonu ya da otitli çocuklardan alınmış 1866 nazofaringeal aspirat ya da orta kulak sıvısının RT-PCR ile incelenmesinde, Ağustos-Mart ayları arasında alınmış toplam 24 materyalin (%1,3) pozitif olduğu saptanmıştır (74). İngiltere’ de HCoV-OC43’ ün seroepidemiolojisinin araştırıldığı bir çalışmada, 37 genç yetişkinden 5 yıl boyunca ardışık olarak alınan toplam 298 serumda ELISA ile yapılan incelemede, 15 (%5) pozitiflik saptanmıştır. En sık yükselme saptanan iki periyod Haziran-Eylül ve Aralık-Şubat olarak bildirilmiştir (65). Belçika’ da şiddetli solunum yolu enfeksiyonlu çocuklardan alınmış 309 solunum örneği RT-PCR ile incelenmiş ve Ocak, Şubat ve Nisan aylarında alınmış 7 örnek (%2,3) pozitif bulunmuştur (72). İsviçre’ de solunum yolu enfeksiyonlu yetişkinlerden alınan 540 bronkoalveolar lavaj örneği RT-PCR ile incelenmiş, 12 kişide (%2,2) pozitiflik saptanmış; altta yatan hastalığı olan 2 kişi ölmüştür (30). Fransa’ da solunum yolu enfeksiyonlu çocuk ve yetişkinlerden Şubat-Mart aylarında alınmış 501 solunum örneği RT-PCR ile incelenmiş ve 30 (%6) pozitiflik bulunmuştur. Sonuçlara göre, Fransa’ da bir HCoV-OC43 salgını meydana gelmiştir (99). İtalya’ da solunum yolu enfeksiyonlu çocuk ve yetişkinlerden kış-ilkbahar sezonunda alınmış 823 solunum örneği RT-PCR ile incelendiğinde, 25 (%3) pozitif örnek bulunmuş; koinfeksiyonu bulunan 2 genç hasta ölmüştür (31).

2.11.3. HCoV-NL63 Epidemiyolojisi

Hollanda’ da, HCoV-NL63 tanımlandıktan hemen sonra gerçekleştirilen çalışmada, tüm yaşlardaki hastalardan alınan 614 materyalin RT-PCR ile incelenmesi sonucu, 7 (%1,1) pozitiflik saptanmıştır (101). Kanada’ da kış aylarında solunum yolu enfeksiyonlu çeşitli hastalardan alınmış 525 solunum örneğinin RT-PCR ile yapılan incelemesinde, Ocak-Mart aylarında alınmış 19 örnekte (%3,6) pozitiflik saptanmıştır ve pik aktivitenin Mart ayında meydana geldiği bildirilmiştir. Altta yatan solunum hastalığı olan bir bebek ve bir yaşlı 2 kişi ölmüştür (6). Virusun Amerika’ daki seroepidemiyolojisini inceleyen bir araştırmada çocuk ve genç yetişkinlerden alınan 243 serum örneği ELISA ile incelenmiş ve 2 ay altı bebeklerde %45,2; yaşamın ilk 2.-3. ayında %11,1; 4.-5. ayında %4,7; 6.-12. ayında %28,6-40; 1-20 yaş arasında %25-70,3 oranlarında görüldüğü hesaplanmıştır (85). Japonya’ da 118 bronşiolitli çocuktan alınan nazofaringeal sürüntü örneği HCoV-NL63 açısından RT-PCR ile incelenmiş ve 3 (%2,5) pozitiflik bulunmuştur (22). Kore’ de solunum yolu enfeksiyonlu 827 çocuktan alınan nazofaringeal aspirat örneği nested-PCR ile incelenmiş ve 14 (%1,7) pozitiflik bulunmuştur; örneklerin en fazla saptandığı ay Kasımdır (37). Lau ve ark.’ nın (60) Hong Kong’ da solunum yolu enfeksiyonlu 4181 çocuk ve yetişkinden aldıkları nazofaringeal aspirat örneğini RT-PCR ile inceledikleri çalışmadaysa, genelde yaz-sonbahar mevsiminde alınmış 17 (%0,4) pozitif sonuç bulmuşlardır. Wu ve ark. (111) Tayvan’ da, solunum yolu enfeksiyonlu 539 çocuktan aldıkları nazofaringeal aspiratı kantitatif RT-PCR ile incelemişler ve genelde sonbaharda alınmış 7 (%1,3) pozitif örnek saptamışlardır. Arden ve ark. (5) Avustralya’ da, solunum yolu enfeksiyonlu çocuk ve yetişkinlerden aldıkları 840 nazofaringeal aspiratı nested-RT-PCR ile incelemişler ve 16 (%2) pozitif örnek bulmuş; virusun pik aktivitesinin Temmuz ayında olduğunu bildirmişlerdir. HCoV-NL63’ ün nozokomiyal bulaştığı 62 yaşındaki hasta ölmüştür. Almanya’ da alt solunum yolu enfeksiyonlu 949 çocuktan alınmış solunum örneğinde kantitatif real time PCR ile yapılan incelemede, 49 (%5,2) pozitiflik saptanmış ve enfeksiyonun en sık Kasım-Mart ayları arasında görüldüğü bildirilmiştir (102). Belçika’ da şiddetli solunum yolu enfeksiyonlu çocuklardan alınmış 309 solunum örneği RT-PCR ile incelenmiş ve Ocak, Şubat aylarında alınmış 7 örnek (%2,3) pozitif bulunmuştur (72). İsviçre’ de 82 alt solunum yolu enfeksiyonlu yenidoğanın solunum örneklerinde RT-PCR ile yapılan incelemede, 6 (%7,3) pozitiflik bulunmuştur (48). Vabret ve ark. (98), Fransa’ da kış-ilkbahar aylarında solunum yolu enfeksiyonlu

çocuklardan aldıkları 1002 solunum materyalini multipleks RT-PCR yöntemiyle incelediklerinde, 33 (%3,3) pozitiflik saptamışlardır. İtalya’ da solunum yolu enfeksiyonlu çocuk ve yetişkinlerden kış-ilkbahar sezonunda alınmış 823 solunum örneği RT-PCR ile incelendiğinde ise, 9 (%1,3) pozitif örnek bulunmuştur (31).

2.11.4. HCoV-HKU1 Epidemiyolojisi

Hong Kong’ da, HCoV-HKU1 tanımlandıktan sonra, toplumdan kazanılmış pnömoni olgularındaki sıklığını araştırmak üzere gerçekleştirilen çalışmada, genç ve yaşlı 418 pnömoni olgusunun nazofaringeal aspiratı RT-PCR ile incelenmiş, 10 (%2,4) pozitiflik saptanmıştır. Altta yatan hastalığı olan 66 ve 72 yaşlarındaki 2 hasta ölmüştür (108). Amerika’ da 851 solunum yolu enfeksiyonlu çocuktan alınan solunum örnekleri HCoV-HKU1 açısından RT-PCR yöntemi ile incelendiğinde, Aralık ve Şubat aylarında alınmış 9 adet (%1) pozitif örnek saptanmıştır (23). Yine Amerika’ da solunum yolu enfeksiyonlu yetişkinlerden alınan 82 solunum yolu örneği Virochip testiyle incelendiğinde, sonbahar ve kış mevsiminde alınmış 3 hasta (%3,6) örneğinde pozitiflik bulunmuştur (51). İsviçre’ de solunum yolu enfeksiyonlu yetişkinlerden alınan 540 bronkoalveolar lavaj örneği RT-PCR ile incelenmiş, 4 kişi (%0,7) pozitif bulunmuştur (30). Fransa’ da Şubat-Mart ayları arasında solunum yolu enfeksiyonlu çoğu çocuk olan 141 hastadan alınan solunum ve dışkı örneğinin RT-PCR ile incelenmesi sonucu, 12 (%8,5) pozitiflik bulunmuş ve virusun kış mevsiminde sirküle olduğu düşünülmüştür (97).

2.11.5. SARS-CoV Epidemiyolojisi

SARS enfeksiyonunun, ilk olarak Kasım 2002’ de Çin’ in Guangdong eyaletinde görüldüğü anlaşılmıştır (114). 2003 Şubat ayında Hong Kong’da “enfeksiyöz atipik pnömoni” olarak adlandırılmış, altı ay içinde Güneydoğu Asya, Avrupa ve Kuzey Amerika’ daki 30’ dan fazla ülkeye uçak yolculuklarıyla yayılmış; 8098 kişi virüsle enfekte olmuş ve 774 kişi ölmüştür (33, 66).

Haziran 2003’ te SARS salgını kontrol altına alındıktan sonra, sadece 17 SARS vakası doğrulanmış ve 2004 Haziran ayından beri de hiç olmamıştır. Bu 17 vakadan 13’ ü, laboratuvar maruziyeti sonucu meydana gelmiştir. 4 tanesi de Güney Çin’ de, muhtemelen doğal hayvan pazarlarındaki SARS-CoV ile enfekte hayvanlarla temas sonucu meydana gelmiştir (57).

SARS salgınının halk sağlığı ve dünya ekonomilerine çok ağır bir etkisi olmuş ve tüm dünyada tahminen 100 milyar Amerikan doları kayba yol açmıştır. AIDS' in 1980' lerde ortaya çıkışından bu yana SARS' ın, tıbbi virolojinin en önemli olayı olduğu söylenmektedir (66).

2.12. Tanı

Çoğu HCoV infeksiyonunun klinik tanısı konulamamaktadır; çünkü üst solunum yolu hastalığı nispeten orta dereceli ve kısıtlıdır, semptomatik rahatlama fazlasını sağlayacak ilaç da mevcut değildir. Diğer solunum viruslarının infeksiyonlarındaki gibi, bir CoV infeksiyonunun tanısı da klinik semptomlarla konulamamakta; laboratuvar temelli tanı gerektirmektedir. HCoV infeksiyonlarının tanısı, akut solunum yolu infeksiyonları konusunda yapılan klinik ya da epidemiyolojik çalışmalarda ve çoğunlukla araştırma laboratuvarlarında konulmaktadır. Hayvan ve insanlarda CoV infeksiyonlarının tespiti izolasyon, elektron mikroskobu, seroloji ve PCR temelli yöntemlerle yapılmaktadır (57).

Diğer solunum viruslarına benzer olarak insan solunum CoV' ları da, hastalığın başlangıcında solunum sekresyonlarında fazla miktarda bulunmakta; hastalığın başlangıcından birkaç gün sonra ise virus titresi azalmaya başlamaktadır (57).

2.12.1. İzolasyon ve Elektron Mikroskobu Çalışmaları

Kanatlı ve diğer pek çok hayvan türünün CoV' larının infekte dokudan kolayca izole edilebilmesine karşılık, infekte bireyden HCoV' un izolasyonu için yapılan ilk çalışmalar, çoğunlukla başarısız olmuştur. HCoV-229E ve diğer Grup 1 CoV' ları bazen insan diploid hücre kültürlerinde izole edilebilmiştir; fakat HCoV-OC43' ün de dahil olduğu diğer insan CoV' ları, izolasyon için hücre-organ kültür sistemine ihtiyaç duymaktadır. Daha sonra yapılan çalışmalarla insan Rabdomiyosarkom hücre dizisi (RD hücreleri), hücre kültürüne adapte edilmiş HCoV-229E ve HCoV-OC43' ün üremesini desteklemiştir. HCoV-229E ve HCoV-OC43' ün laboratuvar pasajları, çeşitli hücrelerde (insan rektal tümör hücrelerinin HRT-18 dizisi, insan rabdomiyosarkom hücreleri, insan makrofajları, primer insan fetal sinir hücreleri, insan tip 2 pnömositleri, insan sinir hücre dizileri) replike olabilmektedir (43). HCoV-NL63 üçüncül maymun

böbrek hücreleri, LLC-MK2 hücreleri ve Vero hücrelerinde izole edilmiştir. SARS-CoV da fetal maymun böbrek hücreleri ve Vero hücrelerinde izole edilmiştir (57).

HCoV' ların izolasyonunda materyal olarak genellikle burun ve farinks sürüntüsü ile burun yıkantı sıvısı kullanılmaktadır. Materyal, semptomların başlangıcından sonraki 3 gün içerisinde alınmalı ve alındıktan sonra 2-3 saat içerisinde hücre kültürüne inoküle edilmelidir. Materyal alındıktan sonra inoküle edinceye kadar geçen 2-3 saatlik sürede, +4°C' de muhafaza edilmelidir. Eğer hemen inoküle edilmeyecekse, -70°C' de tutulmalıdır (2).

İzole edilen materyalin elektron mikroskobu incelemeleri, ilk bulunan CoV ve SARS da dahil, sonradan keşfedilen pek çok CoV' un identifikasyon ve karakterizasyonuna katkıda bulunmuştur. Elektron mikroskobu bazen klinik materyalde CoV tespitinde de kullanılmıştır; fakat klinik materyaldeki CoV gibi görünebilen diğer partiküllerden dolayı, CoV-benzeri partiküllerin tespiti, enfeksiyonu doğrulamaz. Bu nedenle duyarlılığı artırmak için, immün-elektron mikroskopi yöntemi tercih edilmektedir (57).

2.12.2. Serolojik ve Moleküler Yöntemler

CoV enfeksiyonlarının tespitinde HE proteini olan CoV' lar için hemagglütinasyon inhibisyon, asetil esteraz testleri, hemadsorbsiyon; hemagglütinasyon, kompleman fiksasyonu, nötralizasyon, ELISA, immunofloresan testleri (IFA) ve western-blotting gibi çeşitli serolojik testler kullanılmıştır. Başlangıçta bu yöntemlerde antijen olarak virus lizatları ya da enfeksiyöz viruslar kullanılmıştır; son zamanlarda ise protein klonları, sentetik peptitler ve psödoviruslar kullanılmaktadır. Antikor testlerinin farklı çeşitleri, sonuçların yorumlanmasında farklı öneme sahiptir. Örneğin kompleman fiksasyon testi akut enfeksiyonun tespitinde iyi çalışır; fakat ilerleyen evrede duyarsız sonuçlar verebilmektedir. Nötralizasyon ve hemagglütinasyon inhibisyon testleri ise, IFA ve ELISA' dan daha duyarlıdır (57, 86).

Günümüzde RT-PCR testleri, insan ve hayvan CoV' ları da dahil olmak üzere pek çok viral enfeksiyonun tespitinde standart olmuştur. PCR primerleri, genel reaktif ya da tip spesifik olarak tasarlanabilir. Günümüzde, reaksiyon karışımında 5 kopyadan az RNA' yı saptayan PCR yöntemleri bile mevcuttur (57).

Serolojik yöntemler, HCoV infeksiyonunu tespit etmede bugüne kadar ki en duyarlı yöntem olmuştur. PCR yönteminin kullanımı serolojik yöntemlerle kıyaslandığında, yeni bir yöntemdir ve kısmen örneğin alınış zamanı ve kalitesine bağlıdır (57).

SARS' da hastalığın tespiti ve doğrulanması için, serolojik testler ve RT-PCR' in kombinasyonu kullanılmıştır. RT-PCR erken tanı için en iyi imkanı sağlarken, serolojik yöntemler de infeksiyonun varlığını doğrulama ya da inkar etmede en iyi imkanı sağlamıştır. Serum, hastalığın ilk haftasında viral RNA' nın tespiti için en iyi materyalken; hastalığın ikinci haftasında en iyi materyalin dışkı ve solunum örnekleri olduğunu gösteren çalışmalar yapılmıştır (57). SARS-CoV antikorları, diğer HCoV antikorları ile çok az çapraz reaksiyon gösterir. Viral RNA, PCR ile plazma ve idrarda da saptanabilir (86).

2.13. Tedavi

SARS harici HCoV' lar, SARS-CoV ile karşılaştırıldıklarında daha hafif solunum infeksiyonuna sebep olur; fakat küçük çocuklar ve immun sistemi baskılanmış yetişkinlerin %10-20 kadarının hastaneye yatmasını gerektirecek şiddette hastalığa sebep olduğundan, başarılı bir tedaviye ihtiyaç vardır (82). Şu anda, HCoV infeksiyonları için spesifik antiviral bir ilaç bulunmamaktadır. İnfeksiyona karşı semptomatik tedavi yapılmaktadır (57). Bununla beraber CoV infeksiyonunun moleküler biyolojisi, antiviral ilaçlara potansiyel hedefler sunmaktadır (86). Virusun hücreye bağlanmasını lektinler, monoklonal ve poliklonal antikorlar, küçük moleküler ağırlıklı inhibitörler ve hücre reseptör sayısının azaltılması inhibe eder. Virus-hücre füzyonunu, vakuolar asidifikasyonu engelleyen maddeler ve S2 alt ünitelerine bağlanarak inhibe eden sentetik peptidler geliştirilmiştir. Polimerazı inhibe eden nukleozid analoglarından, SARS-CoV ve HCoV-NL63 replikasyonunu in vitro inhibe ederek ümit veren ilaç adayları ise, β -D-N4-hidroksistidin ve 6-azuridindir. Adamantan türevli bananinler, SARS-CoV' un helikaz aktivitesi ve replikasyonunun güçlü inhibitörüdür. Small interfering RNA, intranazal inhalasyonla verildiği fare ve maymunda, sekans-spesifik mRNA' nın bozulması yoluyla diğer solunum virusları ve SARS-CoV' a karşı uygulaması kolay, hızlı ve etkili bir antiviral olarak bulunmuş,

fakat bugüne kadar insana uygulanmamıştır; benzer bir yaklaşımla fosforodiamidate morfolino oligomerler ise, tamamlayıcı sekanslara bağlanarak replikasyonu inhibe eder. 1a ve 1b poliproteinini translasyon sonrası işleyen proteazların inhibisyonu da, antiviral bir yöntemdir (82).

SARS salgını başında Ribavirin, yüksek doz steroidler ve çeşitli mekanik ventilasyon kürleri, hastaların tedavisi için standart olmuştur. Daha sonraları ise SARS-CoV replikasyonunu in vitro inhibe etme yeteneklerine dayanarak interferon alfa, SARS konvelasan-faz immunglobulini ve Lopinavir+Ritonavir kullanılmıştır. Salgından sonra çeşitli antiviral ilaçlar geliştirme ve virusun replikasyonunu in vitro inhibe etme yeteneklerini ölçme çalışmaları artmıştır (57).

Hücre kültürü ve hayvan modellerinde, SARS-CoV ve diğer HCoV' ların, Tip 1 interferon ile tedaviye duyarlı olduğu kanıtlanmıştır; bu yüzden Tip 1 interferon, SARS tedavisi için ümit verici bir ilaç durumundadır (14, 34). SARS salgınıyla tekrar karşılaşıldığında Tip 1 İnterferon, steroid ve Lopinavir/Ritonavir, klinik çalışmalardan elde edilen verilere dayanarak, tedavide önerilmektedir (95).

2.14. Önlem

HCoV enfeksiyonundan korunmak için mevcut bir aşı yoktur; fakat bazı hayvan CoV'ları için (IBV, BCoV, CCoV) aşılar, genç hayvanlarda ciddi hastalıkları önlemek için rutin olarak uygulanmaktadır (57). SARS konusunda, en hızlı ve muhtemelen en güvenli olarak geliştirilebilecek aşı, inaktive ya da subünit aşılardır. Bu aşılar SARS enfeksiyonuna karşı tamamen koruyucu olmasa bile, ölümcül SARS pnömonisine karşı biraz da olsa koruma sağlayacaktır (62). Bununla beraber inaktive tam virus, eksprese edilen proteinleri içeren aşılar ve canlı virusların vektör olduğu çeşitli SARS aşıları da geliştirilmiş ve nötralizan antikorları in vitro indükledikleri; hayvan modellerinde virus replikasyonunu ve inflamasyonu azalttıkları gösterilmiştir. Ayrıca yeni geliştirilen bir DNA aşısı ve bir inaktive edilmiş tam virus aşısı için, küçük çapta güvenlik ve etkinlik deneyleri başlamıştır. Bu aşılardan bazıları Kanada'da gönüllü insanlarda denenmiş ve kısmen başarılı sonuçlar alınmıştır (68).

CoV infeksiyonlarına karşı etkin aşı geliştirme fikrine karşılık, CoV' ların genetik, antijenik çeşitliliği ve rekombinasyon yeteneği, etkin aşıya karşı iki zorluk çıkarmaktadır: Birincisi, aşı tüm antijenik varyantlara karşı eşit koruma sağlayamayabilir. İkincisi, rekombinasyon aşının koruma sağlamayı hedeflediği virus tip sayısını artırabilir (52, 57).

Aşı ve antiviral ilaç eksikliğine rağmen CoV infeksiyonlarının önlenmesinde, infeksiyon kontrol uygulamalarının etkili olduğu görülmüştür. Bu durum, SARS-CoV salgını esnasında net bir biçimde gösterilmiştir: Başarılı hasta izolasyonu, infeksiyon kontrol uygulamaları, bulaşa maruz kalan insanların karantinası, ülkeler arası yayılımın önlenmesi için yolculuk uyarıları ve danışmanlığı ve ülkelere giriş çıkışları kontrol etme konusundaki aşırı özen, virusun insandan insana yayılımını, global yayılım başladıktan sonra 4 ay içinde durdurmuştur (57, 70).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Pozitif Kontroller

Hastalardan alınan klinik örnekleri HCoV açısından taramak için kullanılan RT-PCR testinde pozitif kontrol olarak, İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Mustafa Hasöksüz'den temin edilen Grup 2 BCoV-430 suşu kullanılmıştır.

3.1.2. Örnekler

1 Kasım 2007-11 Mayıs 2008 tarihleri arasında İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Viroloji Laboratuvarı' na Tekirdağ, Edirne, İstanbul, Bilecik, Bursa, İzmir, Antalya, Adana, Mersin, Antakya ve Erzurum illerindeki akut solunum yolu enfeksiyonlu çocuk ve yetişkin hastalardan toplam 400 adet; steril eküvyonla (Virocult, MW&E, 08D30, İngiltere) alınmış nazal sürüntü, farinks sürüntüsü ve nazofaringeal sürüntü ya da steril şartlarda alınmış nazofaringeal aspirat örneği, çalışmanın materyallerini oluşturmaktadır (Tablo 3-1). Virocult örnekleri oda ısısı mevcut koşullarda; nazofaringeal aspirat örnekleri ise soğuk zincir altında laboratuvara ulaşmıştır. Biyogüvenlik kabinindeki (Heraus Instruments, H59, Almanya) steril ortamda, gelen örnekler içerisine yaklaşık 2 ml viral besiyeri (MEM, Gibco Invitrogen, 31095, ABD) eklenip, 30 saniye kadar vorteksle karıştırıldıktan sonra, 2 ml' lik steril tüplere alınıp, Human Coronavirus açısından incelenmek üzere, testler yapılana kadar -80° C' de muhafaza edilmiştir.

Tablo 3-1: Çalışmada kullanılan örneklerin çeşitleri, sayıları ve hasta yaş grupları

Hastaların yaş grupları	Farinks sürüntüsü	Nazal sürüntü	Nazofaringeal sürüntü	Nazofaringeal aspirat	Toplam
0-5 yaş	31	29	46	36	142
6-15 yaş	24	30	85	36	175
16 ve üzeri yaş	1	54	23	5	83
Toplam	56	113	154	77	400

3.1.3. Viral RNA İzolasyon Kiti

Solunum yolu örneklerinden RNA izolasyonu amacıyla, High Pure Viral RNA Kiti (Roche, 11 858 882 001) kullanılmıştır.

Kit İçeriği

- 1- Binding Buffer (4,5 M guanidine-HCl, 50 mM Tris-HCl, %30 Triton® X-100)
- 2- Poly (A)
- 3a- Inhibitor Removal Buffer (5 M guanidine-HCl, 20 mM Tris-HCl)
- 3b- Wash Buffer (20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl)
- 4- Elution Buffer
- 5- High Pure Filter Tubes
- 6- Collection Tubes

3.1.4. Primer Listesi

RT-PCR’ da HCoV RNA’ sını saptamak ve pozitif çıkan örneklerin hangi gruba ait olduğunu bulmak için kullanılan primerler, Tablo 3-2’ de gösterilmiştir (41).

Tablo 3-2: Primer listesi (41)

Primer ismi	Primer dizilimi	Ürün uzunluğu
Pancorona		
IN2 (F)	5’- GGG DTG GGA YTA YCC HAA RTG YGA- 3’	452 bp
IN4 (R)	5’- TAR CAV ACA ACI SYR TCR TCA- 3’	
Grup I		
F	5’- GAD GGW GTY KTC TGG GTT GC- 3’	420 bp
R1	5’- GTT YTC TTC CAG GTG TGT TTG- 3’	
R2	5’- ATA GCC TGA CGC ATC AAC ACC- 3’	
Grup II		
F	5’- GAA GGC TCD GGA ARG TCT GC- 3’	304 bp
R	5’- CCT CTY TTH CCA AAA CAC TG- 3’	

3.1.5. Amplifikasyon

Kullanılan cihaz ve malzemeler :

- 1- Hasta materyalinden elde edilen RNA örneği
- 2- DMSO (Dimethyl sulfoxide) (Merck, 1.11609, Almanya)
- 3- dNTP (deoxy Nucleotide Triphosphates) 10 mMol (Metis, E121, Türkiye)
- 4- Pancorona Primerleri (IN-2, IN-4) 50 pmol (XXIDT, 21972606, ABD)
- 5- Grup 1 ve 2 Primerleri (Gr1F, Gr1R1, Gr1R2, Gr2F, Gr2R) 50 pmol (XXIDT, ABD)
- 6- AMV Reverse Transcriptase, 300 u (Promega, M5101, ABD)
200 mM potasyum fosfat, %0,2 Triton[®] X-100, 2 mM DTT, %50 gliserol
- 7- Recombinant RNasin[®] Ribonuclease Inhibitor, 2500 u (Promega, N2511, ABD)
20 mM HEPES-KOH, 50 mM KCl, 8 mM DTT, %50 (v/v) gliserol
- 8- GoTaq Flexi DNA Polymerase, 500 u (Promega, M8305, ABD)
- 9- 5X buffer flexi color (Promega, M891A, ABD)
- 10- MgCl₂ (Magnesium Chloride) 25 mM (Promega, A351B, ABD)
- 11- ddH₂O (Double Distilled H₂O; DEPC (Diethylpyrocarbonate) treated water),
DNase RNase free (Invitrogen, 750024, Fransa)
- 12- PCR cihazı (Sensoquest Labcycler, 1117230141, Almanya)
- 13- Mikrosantrifüj (Denville 260 D, CO260-18-230, ABD)
- 14- Vorteks (Biosan FVL-2400N, 560710026, Letonya)

3.1.6. Elektroforez

Kullanılan cihaz ve malzemeler:

- 1- Agarose Low EEO (Electroendosmosis) (Sigma, A5093, Almanya)
- 2- 10X TBE (Tris-borate-EDTA) Electrophoresis Buffer (Fermentas, 22734, Litvanya)
- 3- EtBr (Ethidium Bromide) 0,1 mg/μl (Sigma, E7637, ABD)
- 4- 100 bp DNA ladder (Biobasic, MSM34, Kanada)
- 5- Elektroforez tankı (Bio 101, 5060-201, ABD)
- 6- Güç Kaynağı (Labnet, ABD)

3.1.7. Görüntüleme

UV' li görüntüleme sistemi (Kodak Gel Logic 200, 5721, ABD) kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Deneysel Çalışma

RT-PCR testinde pozitif kontrol olarak kullanılan BCoV-430 suşunun, DEPC' lı saf su ile 10 katlı dilüsyonları (1:5, 1:10, 1:50, $1:10^{-2}$, $1:10^{-3}$, $1:10^{-4}$) hazırlanmıştır. Her dilüsyondan, aşağıda açıklandığı şekilde RNA izolasyonu ve Pancorona primerleri ile RT-PCR yapılmıştır.

3.2.2. Örneklerden Viral RNA' nın İzolasyonu

Solunum yolu örneklerinden viral RNA izolasyonu, Roche High Pure Viral RNA Kitinde belirtilen yöntemle gerçekleştirilmiştir:

- 1- -70°C ' de saklanan viral besiyeri (MEM) içerisindeki solunum yolu örnekleri, oda ısısına alınıp çözünmeleri sağlanmıştır.
- 2- 1,5 ml' lik steril ependorf tüplere her örnekten 200 μl konulmuş ve üzerine, her örnek için 4 μl Poly A + 400 μl Binding Buffer karışımı koyulup, 10 saniye kadar vorteksle karıştırılmıştır.
- 3- Ependorf tüp içindeki bu karışım, oda ısısında 10 dakika inkübe edilmiştir.
- 4- Her bir karışım, toplama tüpü içine yerleştirilmiş olan kolonlara aktarılmıştır.
- 5- 8000 g' de 15 saniye santrifüj edilmiştir.
- 6- Santrifüjden sonra her tüpün içine 500 μl Inhibitör Removal Buffer koyulmuştur.
- 7- 8000 g' de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- 8- Santrifüjden çıkan kolonlar, yeni toplama tüpleri içine yerleştirilip, her birine 450 μl Wash buffer koyulmuştur.
- 9- 8000 g' de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- 10- Santrifüjden çıkan kolonlar, yeni toplama tüpleri içine yerleştirilip, her birine 450 μl Wash buffer koyulmuştur.
- 11- 8000 g' de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- 12- Santrifüjden sonra, toplama tüpünün dibindeki sıvı boşaltılmış; kolon tekrar toplama tüpü içine yerleştirilmiştir.

- 13- 14000 rpm’ de 10 saniye santrij edilmiştir.
- 14- Santrifüjden çıkan kolonlar, yeni 1,5 ml’ lik steril ependorf tüplere konulmuştur.
- 15- Her kolona 50 µl Elution buffer koyulup, 8000 g’ de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- 16- Kolonlar çöpe atılıp, içerisinde RNA örneği bulunan 1,5 ml’ lik ependorf tüpler, kullanılıncaya kadar -20°C’ de saklanmıştır.

3.2.3. Amplifikasyon

- 1- Master miks ve RNA içeren karışımların hazırlanma aşamaları, biyogüvenlik kabini ortamında gerçekleştirilmiştir.
- 2- 0,2 ml’ lik PCR tüpünde, solunum yolu örneğinden izole edilmiş 5 µl RNA ve 1 µl DMSO karıştırılmış ve PCR cihazında 70°C’ de 10 dakika inkübe edilmiştir.
- 3- Bu esnada PCR master miksi, Tablo 3-3’ te verilen miktarlar doğrultusunda hazırlanmıştır.
- 4- Her PCR tüpüne, hazırlanan master miks karışımından 44 µl eklenmiştir.
- 5- PCR tüpleri, aşağıda belirtilen PCR programına ayarlanmış PCR cihazına yerleştirilmiş ve amplifikasyona bırakılmıştır (41).

Tablo 3-3: Pancorona primerleri ile örneklerin HCoV açısından taranması için kullanılan PCR master miksi: Tek bir örnek için hazırlanan master miks karışımının içeriği ve miktarları (41)

Reaktif	Miktar
5X buffer flexi color	5 µl
MgCl ₂ 25 mM	5 µl
dNTP	1 µl
Primer IN2 (F) 50 pmol	1 µl
Primer IN4 (R) 50 pmol	1 µl
AMV Reverse Transcriptase	0,5 µl
RNAsin Ribonuclease Inhibitor	0,5 µl
GoTaq DNA Polymerase	0,5 µl
DEPC H ₂ O	29,5 µl
Örnek + DMSO	6 µl
Toplam PCR Reaksiyon Hacmi	50 µl

42 °C' de 60 dakika
 94 °C' de 5 dakika
 94 °C' de 30 saniye
 50 °C' de 30 saniye
 72 °C' de 1 dakika
 72 °C' de 7 dakika

} 35 döngü

Pancorona primerleri ile yapılan RT-PCR testinde pozitif örnek saptandığında, bu örneğin hangi CoV grubuna ait olduğunu belirlemek için, Grup spesifik primerler kullanılarak uygulanan RT-PCR, aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir:

- 1- Master miks ve RNA içeren karışımın hazırlanma aşamaları, biyogüvenlik kabini ortamında gerçekleştirilmiştir.
- 2- 0,2 ml' lik PCR tüpüne, pozitif bulunmuş RNA' dan 5 µl ve 1 µl DMSO konulmuş ve PCR cihazında 70°C' de 10 dakika inkübe edilmiştir.
- 3- Bu esnada RT-PCR master miksi, Tablo 3-4' te verilen miktarlar doğrultusunda hazırlanmıştır.
- 4- PCR tüpüne, hazırlanan master miks karışımından 44 µl eklenmiştir.
- 5- PCR tüpü, aşağıda belirtilen RT-PCR programına ayarlanmış PCR cihazına yerleştirilmiş ve amplifikasyona bırakılmıştır (41).

Tablo 3-4: Pozitif örneğin grubunu belirlemede kullanılan PCR master miksi: Tek bir örnek için hazırlanan master miks karışımının içeriği ve miktarları (41)

Reaktif	Miktar
5X buffer flexi color	5 µl
MgCl ₂ 25 mM	5 µl
dNTP	1 µl
Primer Gr1F ya da Gr2F (F) 50 pmol	1 µl
Primer Gr1R1 ya da Gr1R1 ya da Gr2R (R) 50 pmol	1 µl
AMV Reverse Transcriptase	0,5 µl
RNAsin Ribonuclease Inhibitor	0,5 µl
GoTaq DNA Polymerase	0,3 µl
DEPC H ₂ O	29,7 µl
Örnek + DMSO	6 µl
Toplam PCR Reaksiyon Hacmi	50 µl

42 °C' de 60 dakika

94 °C' de 5 dakika

94 °C' de 30 saniye

56 °C' de 30 saniye

72 °C' de 1 dakika

} 35 döngü

72 °C' de 7 dakika

3.2.4. Elektroforez

3.2.4.1. Agaroz Jelin Hazırlanması

RT-PCR ürünlerinin görüntülenmesi için, %1,5' luk agaroz jel hazırlanmıştır. Buna göre 1,5 gr agaroz, 100 ml 1X TBE buffer ile karıştırılmış ve mikrodalga fırına konulmuş; zaman zaman çalkalanarak, agaroz tamamen eriyene kadar bekletilmiştir. Agaroz tamamen eriyince ısıtma işlemine son verilip, üzerine 8 µl etidyum bromid eklenerek, homojenize olması için iyice çalkalanmıştır. Oda ısısı mevcut koşullarda 40-45°C' ye soğuyana kadar bekletildikten sonra, içine tarak yerleştirilmiş jel kabına, baloncuk oluşmamasına dikkat edilerek dökülmüştür. Jel formunu alıncaya kadar oda ısısında bekletilmiş; sonra tarak dikkatlice çıkarılıp, örneklerin yüklenmesi için elektroforez tankına nakledilmiştir (41).

3.2.4.2. Elektroforez İşlemi

- 1- Elektrik akımı bağlanabilen tanka hazırlanan agaroz jel yerleştirilip, üzerine 1X TBE Buffer ilave edilmiştir.
- 2- Jeldeki kuyucuklara 100 bp' lik DNA ladder (Promega), pozitif kontrol, negatif kontrol ve örneklerin RT-PCR ürünleri konulmuştur.
- 3- Elektroforez işlemi 100 Volttan yaklaşık 30-40 dakika süreyle gerçekleştirilmiştir.
- 4- İşlem sonunda elektrik akımı kesilip, jel tanktan çıkarılmıştır.
- 5- Jeldeki DNA bantlarının varlığı, UV' li görüntüleme sisteminde gözlemlenip fotoğraflanmış; sonuçlar bilgisayara kayıt edilmiştir (41).

3.2.5. Sonuçların Değerlendirilmesi

Agaroz jel elektroforetik seperasyonun sonucunda; Pancorona primerleri ile 452 bp uzunluğunda bandın, Grup 1 primerleri ile 420 bp ve Grup 2 primerleri ile 304 bp uzunluğundaki bantların meydana gelmesi, pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir.

3.2.6. İstatistiksel Analiz

Araştırmada pozitiflik gözlenen sayı çok düşük olduğundan, istatistiksel analiz yapılamamıştır. Sonuçlar, tanımlayıcı istatistiklerle sunulmuştur.

4. BULGULAR

RT-PCR testinde kullanılan pozitif kontrol (BCoV-430) suşunun farklı dilüsyonlarına Pancorona primerleri ile RT-PCR uygulanması sonucunda, bu test ile 10^{-2} dilüsyona kadar CoV viral RNA' sının saptanabileceği görülmüştür (Şekil 4-1).

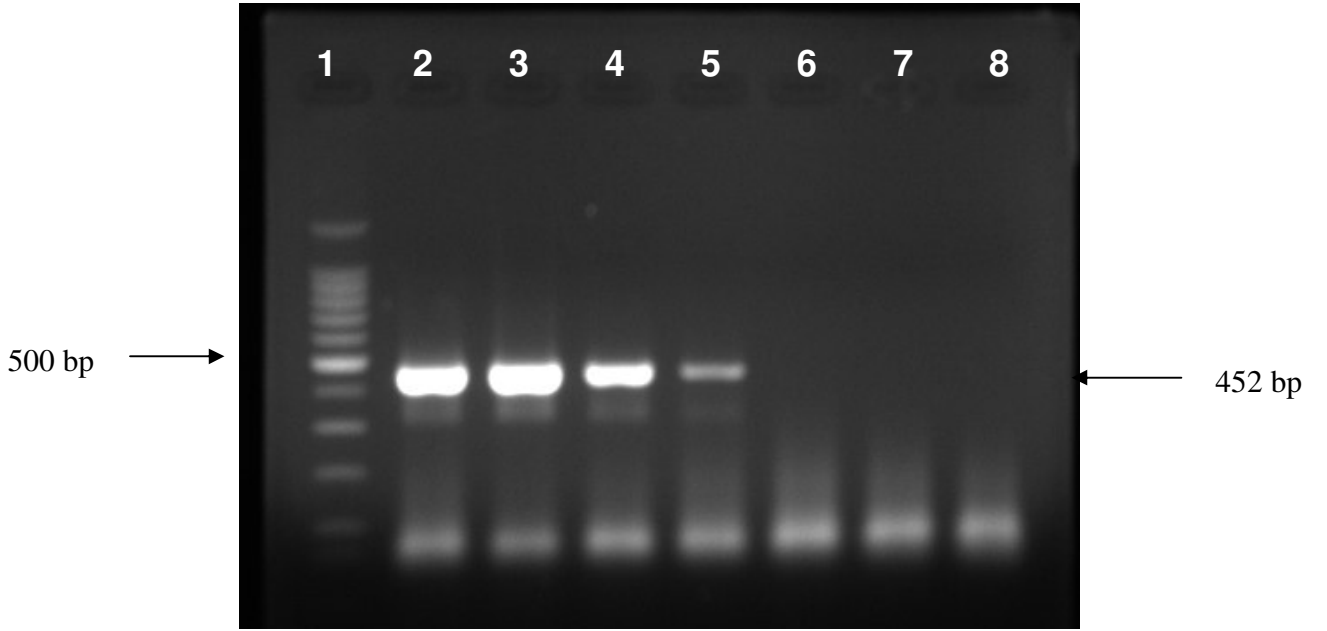
İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Viroloji Laboratuvarına 1 Kasım 2007-11 Mayıs 2008 tarihleri arasında Türkiye' nin 11 ilinden gönderilen 113 nazal sürüntü, 56 farinks sürüntüsü, 154 nazofaringeal sürüntü ve 77 nazofaringeal aspirat olmak üzere toplam 400 klinik örnek toplanmış ve HCoV varlığı yönünden incelenmiştir. İncelenen 400 klinik örneğin 1 tanesinde (%0,25) RT-PCR ile HCoV tespit edilmiştir (Tablo 4-1). Pozitif bulunan materyal, kemik iliği transplantasyonu sonrası akut solunum yolu enfeksiyonu gelişen 12 yaşındaki hastadan, 15 Aralık 2007 tarihinde alınmış bir nazofaringeal aspirat örneğidir (Şekil 4-2). Örneğin hangi HCoV Grubuna ait olduğunu öğrenmek amacıyla yapılan Grup spesifik RT-PCR' da, Grup 1 pozitif sonuç çıkmıştır (Şekil 4-3). RT-PCR' da kullanılan pozitif kontrolün (BCoV 430), Grup 2 primerleri ile yapılan RT-PCR sonucu da Şekil 4-4' te görülmektedir.

Tablo 4-1: İncelenen örneklerle göre pozitiflik oranı

Hastaların yaş grupları	Farinks sürüntüsü	Nazal sürüntü	Nazofaringeal sürüntü	Nazofaringeal aspirat	Toplam
0-5 yaş	0/31	0/29	0/46	0/36	0/142
6-15 yaş	0/24	0/30	0/85	1/36	1/175
16 ve üzeri yaş	0/1	0/54	0/23	0/5	0/83
Toplam	0/56	0/113	0/154	1/77	1/400

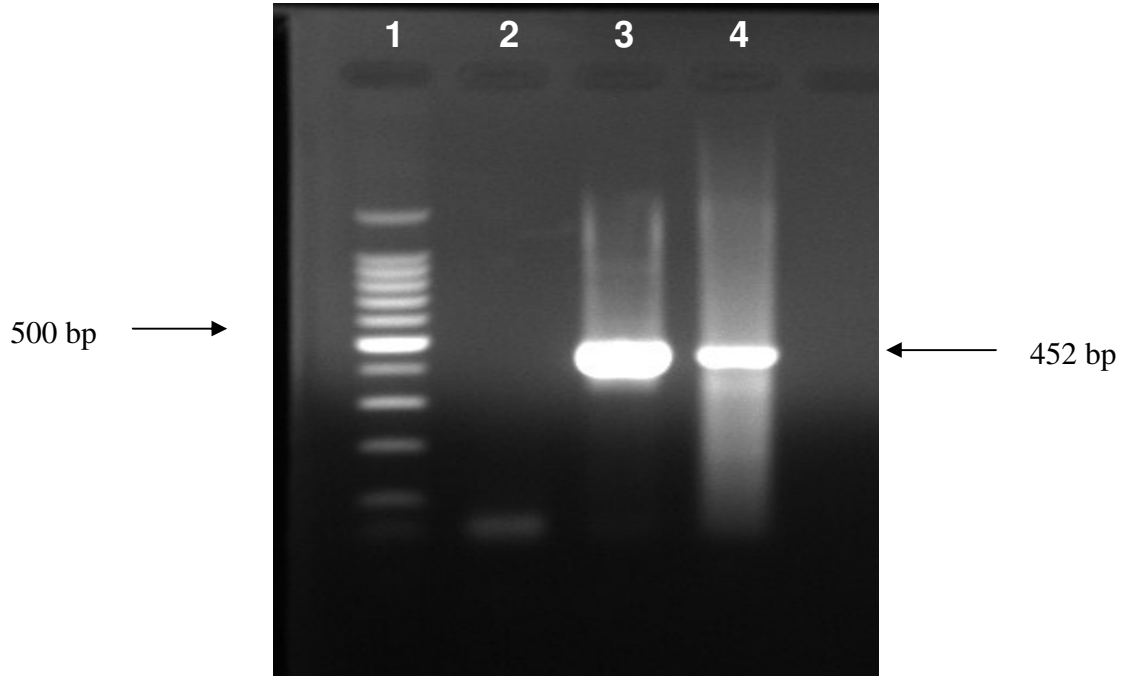
İstatistiksel Analiz

11 ilden gelen 400 örnekte, 1 pozitif sonuç bulunmuştur. Bulunan pozitiflik hızı, $1/400 = 0,0025$ yani 10.000 kişide 25 kişi olarak hesaplanmıştır. Bulunan hıza göre, ana yığındaki hastalık hızı tahmin edilmek istendiğinde, bu oranın 10.000 kişide 1-138 arasında, %95 Güven Aralığında olacağı tahmin edilmektedir.



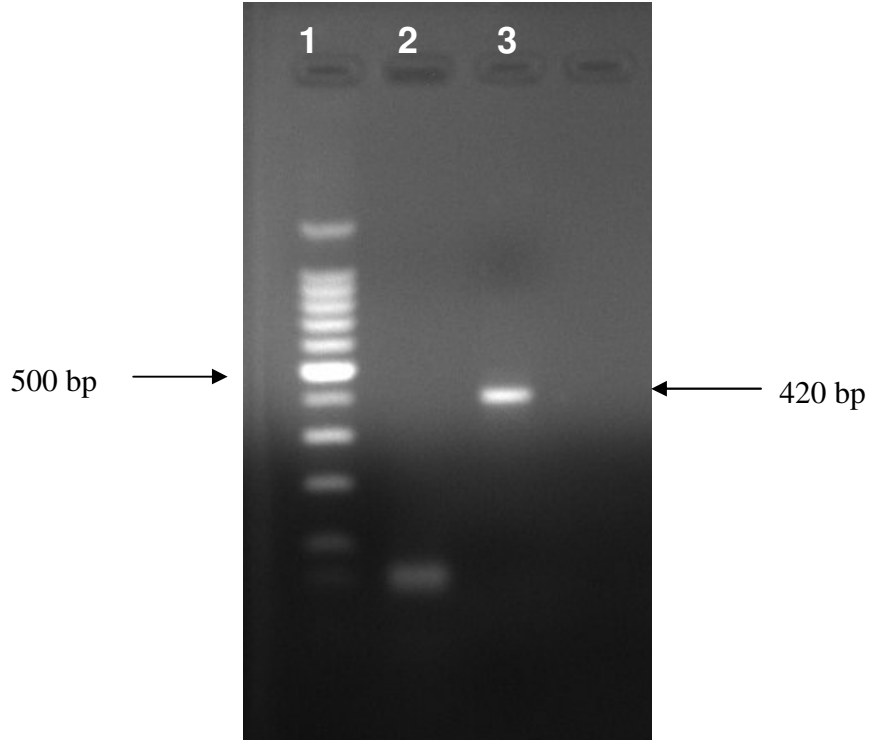
Şekil 4-1: RT-PCR’ da kullanılan pozitif kontrolün (BCoV-430) dilüsyonlarının, Pancorona primerleri ile yapılan RT-PCR sonucu.

1- 100 bp DNA ladder (Promega)	4 µl
2- BCoV-430 (1:5)	7 µl
3- BCoV-430 (1:10)	7 µl
4- BCoV-430 (1:50)	7 µl
5- BCoV-430 (1:10 ⁻²)	7 µl
6- BCoV-430 (1:10 ⁻³)	7 µl
7- BCoV-430 (1:10 ⁻⁴)	7 µl
8- Negatif Kontrol (DEPC H ₂ O)	7 µl



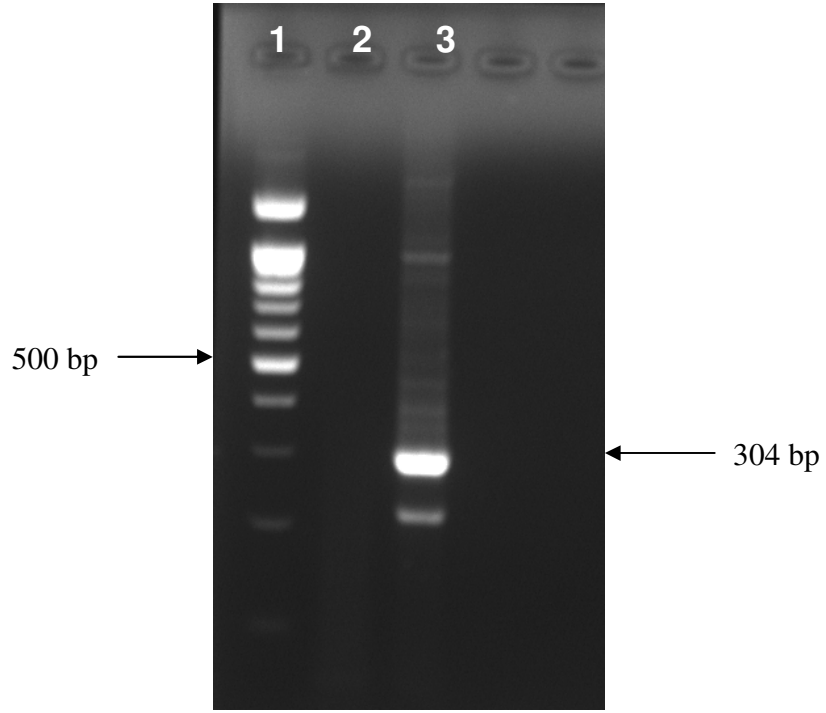
Şekil 4-2: RT-PCR ile pozitif bulunan 374 numaralı örnek.

1- 100 bp DNA ladder (Promega)	4 µl
2- Negatif Kontrol (DEPC H ₂ O)	5 µl
3- Pozitif Kontrol (BCoV-430)	5 µl
4- 374 numaralı hasta örneği	7 µl



Şekil 4-3: Pozitif bulunmuş örneğin, Grup 1 spesifik primerleri ile yapılan RT-PCR sonucu (HCoV Grup 1 pozitif kontrol virus elimizde olmadığından, çalışmada kullanılamamıştır).

1- 100 bp DNA ladder (Promega)	4 µl
2- Negatif Kontrol (DEPC H ₂ O)	5 µl
3- 374 nolu hasta örneği	10 µl



Şekil 4-4: RT-PCR’ da kullanılan pozitif kontrolün (BCoV 430), Grup 2 primerleri ile yapılan RT-PCR sonucu.

1- 100 bp DNA ladder (Promega)	4 µl
2- Negatif Kontrol (DEPC H ₂ O)	7 µl
3- Grup 2 Pozitif Kontrol (BCoV-430)	7 µl

5. TARTIŞMA

Çoğu tek zincirli RNA viruslarında olduğu gibi CoV' larda da, yüksek sıklıkta mutasyon görülmektedir (57). *Coronaviridae* ailesi içerisinde özellikle 2000' li yıllarda yeni keşfedilen CoV' lar, bu mutasyonlar sonucunda ortaya çıktığı kabul edilmektedir. İnsanlarda 2003' te SARS-CoV, 2004' te HCoV-NL63 ve 2005'te HCoV-HKU1 viruslarına bağlı infeksiyonlarda, keşfedilen virusun ya diğer insan Coronavirus' larının ya da hayvanlardaki Coronavirus' ların mutasyonu sonucunda insanlara adapte olmuş viruslar oldukları belirtilmektedir (59, 89, 101, 108, 114). CoV' lar, hayvanlar ve insanlar arasında yaygın olarak bulunmaktadır (44, 65). 1950-1960' lı yıllardan beri varlığı bilinen HCoV türleri de, insanlarda hafif üst solunum yolu infeksiyonlarının yanında; küçük çocuklar, immun sistemi baskılanmış yetişkinler ve yaşlılarda ciddi alt solunum yolu infeksiyonlarına da sebep olabilmektedir (29, 31, 94, 109).

HCoV infeksiyonlarında en sık görülen klinik bulgular burun akıntısı, ateş, öksürük ve kırgınlıktır (6, 9, 23, 58, 76, 93, 109). Çalışmamızda pozitif bulunan hastada gözlenen ateş, öksürük ve burun akıntısı semptomları, bu bilgilerle uyumludur.

SARS-CoV hariç diğer HCoV' ların hastanede yatan ya da yatmayan hastalarda sebep olduğu infeksiyonlar sıklıkla soğuk algınlığı, farenjit, larenjit, konjunktivit ve otit gibi üst solunum yolu infeksiyonları; bronşit, bronşiolit, pnömoni, astım, astım bronşiolit, krup ve kronik solunum hastalığı alevlenmesi gibi alt solunum yolu infeksiyonlarıdır (5-7, 23, 51, 74, 76, 93, 98, 99, 101, 102, 108, 111). HCoV' lar bazen de gastroenterit ya da Kawasaki hastalığının etkeni olarak bulunmuştur (98, 111). Hastanede yatan kişilerin immun sistemlerinin normalden güçsüz olmasının yanında, immun sistemi baskılayıcı tedavi alanlar da vardır. HCoV' un nozokomiyal bulaşı ya da immun sistemi baskılanmış durumdaki hastalarda meydana getirdiği infeksiyonlar, pek çok çalışmada gösterilmiştir (5, 23, 25, 30, 31, 56, 60, 87, 97, 99, 101, 103, 111). Özellikle van der Hoek ve ark. (101), Arden ve ark. (5), Kuypers ve ark. (56) ve Simon ve ark.' nın (87) çalışmalarıyla uyumlu olarak, çalışmamızda pozitif bulduğumuz olgunun da, kemik iliği transplantasyonu sonrasında, immun sistemi baskılayan tedavi gördüğü dönemde HCoV infeksiyonu geçirdiği saptanmıştır.

HCoV türleri arasında klinik yönden yapılan değerlendirmelerde, bazı araştırmacılar HCoV-229E' nin hafif infeksiyona sebep olduğunu düşünürken (9, 75),

bazıları şiddetli infeksiyona sebep olduğunu belirtmişlerdir (29). Aynı şekilde HCoV-OC43' ün şiddetli infeksiyona sebep olduğunu düşünen araştırmacılar yanında (75, 80), hafif infeksiyona sebep olduğunu düşünenler de vardır (74). HCoV-NL63' ün şiddetli infeksiyona sebep olduğunu belirten yayınların yanında (48, 102), HCoV-229E ve HCoV-OC43' ten daha yaygın ve daha virulan olduğunu düşünen araştırmacılar da vardır (5, 51, 56). HCoV-HKU1' in ise daha çok immun sistemi baskılanmış hastalarda ya da yaşlılarda üst solunum yolu infeksiyonuna sebep olduğunu belirten yayınlar bulunmaktadır (97, 109).

Ayrıca HCoV' un nozokomiyal infeksiyona sebep olduğunu gösteren çeşitli çalışmalarla uyumlu olarak, çalışmamızda saptadığımız pozitif olguya da, virusun nozokomiyal bulaştığı düşünülmektedir (5, 7, 29, 60, 87, 98). Çalışmamızda pozitif sonuç görüldükten sonra hastane kayıtlarına (İTF Çocuk Hematoloji/Onkoloji Birimi) bakılarak ve hastanın babası ile görüşülerek, hastanın geçmişi hakkında bilgi alınmıştır: 07.11.2007 tarihinde İTF Çocuk Hematoloji/Onkoloji Birimi' ne yatan hasta, 28.11.2007 tarihinde kemik iliği transplantasyonu geçirmiş, 28.12.2007 tarihinde de taburcu olmuştur. 15.12.2007 tarihinde semptomları görülmeye başlanan HCoV kaynaklı solunum yolu infeksiyonu, virusun nozokomiyal bulaştığını düşündürmüştür. İnfeksiyon sırasında (semptomların görülmesiyle, hastaya ampirik antibiyotik tedavisi başlanmış) hastadan alınan örneklerle yapılan dışkı, boğaz, burun sürüntüsü, idrar, kateter ucu kültürleri ve hemokültür sonucunda bakteriyel bir üreme saptanmamış; fakat hastada ateş, öksürük ve burun akıntısı semptomları devam etmiştir. Viroloji Laboratuvarı' nda İnfluenza virusu araştırma amacıyla yapılan hücre kültürü ve serolojik (ELISA) testlerde de negatif sonuç alınan örnek, çalışmamızda HCoV açısından pozitif olarak saptanmıştır.

Coronavirus antijenik Grup 1 içerisindeki HCoV-229E' nin araştırıldığı bazı çalışmalarda; Kore' de 231 çocuğun 2' sinde (%0,9), Hong Kong' da 4181 çocuk ve yetişkinin 4' ünde (%0,1), Tayland' da 226 çocuğun 8' inde (%3,5), Finlandiya' da 1866 çocuğun 22' sinde (%1,2), Belçika' da 309 çocuğun 1' inde (%0,3), İsviçre' de 540 yetişkinin 7' sinde (%1,3), Fransa' da 152 yenidoğanın 43' ünde (%28,3) ve 92 çocuğun 7' sinde (%7,6), İspanya' da 201 çocuk ve yetişkinin 1' inde (%0,5), İtalya' da 823 çocuk ve yetişkinin 10' unda (%1,2) pozitiflik saptanmıştır (13, 15, 29-31, 60, 72, 74, 94).

Antijenik Grup 1 HCoV' lara dahil olan HCoV-NL63' ün araştırıldığı bazı çalışmalarda; Hollanda' da her yaştan 614 kişinin 7' sinde (%1,1), Kanada' da her yaştan 525 kişinin 19' unda (%3,6), Japonya' da 118 çocuğun 3' ünde (%2,5), Kore' de 827 çocuğun 14' ünde (%1,7), Hong Kong' da 4181 çocuk ve yetişkinin 17' sinde (%0,4), Tayvan' da 539 çocuğun 7' sinde (%1,3), Avustralya' da 840 çocuk ve yetişkinin 16' sında (%2), Almanya' da 949 çocuğun 49' unda (%5,2), Belçika' da 309 çocuğun 7' sinde (%2,3), İsviçre' de 82 çocuğun 6' sında (%7,3), Fransa' da 1002 çocuğun 33' ünde (%3,3), İtalya' da 227 çocuğun 1' inde (%0,4) pozitiflik saptanmıştır (5, 6, 22, 37, 48, 60, 72, 80, 98, 101, 102, 111).

Çalışmamızda 400 klinik örnek arasından saptanan 1 pozitif örneğin, Grup spesifik primerler ile yapılan RT-PCR testi sonucunda antijenik Grup 1 HCoV' lara dahil olduğu bulunmuş; elde edilen %0,25 pozitiflik oranının Coiras ve ark. (15), Lau ve ark. (60), Moes ve ark. (72) ve Pierangeli ve ark.'nın (80) sonuçları ile uyumlu olduğu bulunmuştur. Araştırmacılar bu çalışmalarında, insanlardaki CoV enfeksiyonlarının sıklığının, yıllara göre değişkenlik gösterdiğini düşünmektedirler.

Coronavirus antijenik Grup 2 içerisindeki HCoV-OC43 üzerine yapılan çalışmalarda Amerika' da 82 yetişkinin 1' inde (%1,2), Kolombiya' da bir yaşlı bakımevinde meydana gelen solunum salgınında 142 yaşlının 95' inde (%67) ve 160 personelin 53' ünde (%33), Kore' de 231 çocuğun 3' ünde (%1,3), Hong Kong' da 4181 çocuk ve yetişkinin 53' ünde (%1,3), Tayland' da 226 çocuğun 2' sinde (%0,9), Finlandiya' da 1866 çocuğun 24' ünde (%1,3), Belçika' da 309 çocuğun 7' sinde (%2,3), İsviçre' de 540 yetişkinin 12' sinde (%2,2), Fransa' da 501 çocuk ve yetişkinin 30' unda (%6), İtalya' da 823 çocuk ve yetişkinin 25' inde (%3) pozitiflik saptanmıştır (13, 30, 31, 51, 60, 72, 74, 76, 94, 99).

Antijenik Grup 2 HCoV' lara dahil olan HCoV-HKU1 üzerine yapılan çalışmalarda Hong Kong' da 418 genç ve yaşlının 10' unda (%2,4), Amerika' da 851 çocuğun 9' unda (%1), İsviçre' de 540 yetişkinin 4' ünde (%0,7), Fransa' da çeşitli yaşlardan 141 kişinin 12' sinde (%8,5) pozitiflik saptanmıştır (23, 30, 97, 109).

Belirtilen çalışmalarda görüldüğü üzere, enfeksiyonlarda HCoV-229E ve HCoV-OC43 daha yaygın olarak görülmektedir. Genelde kış sezonunda epidemilerin görüldüğü çalışmalarla uyumlu olarak, çalışmamızda saptanan bir pozitif örnek de kış

sezonunda alınmıştır (31, 56, 97, 108). Çalışmamızda yapılan yaş gruplamasında pozitif örnek sayısının azlığından dolayı, yaşlara bağlı anlamlı sonuç bulunamamıştır.

HCoV ile infekte kişilerde gelişen dispne ve kalp yetmezliği sonucunda; koinfeksiyon nedeniyle gelişen şiddetli hastalıkla ya da altta yatan ağır kronik rahatsızlıklar sebebiyle, bazı vakalarda ölümler meydana gelmiştir (5, 6, 29-31, 76, 109). Bu çalışmada saptanan pozitif olguda da altta yatan kronik hastalık (lösemi) olmasıyla birlikte, infeksiyon ağır geçmemiştir.

HCoV' u saptamak için genelde serum, nazal sürüntü, nazofaringeal sürüntü, farinks sürütüsü ya da nazofaringeal aspirat materyalleri kullanılmakla birlikte, bazı çalışmalarda beyin-omurilik sıvısı, vajinal, gastrik, dışkı, akciğer doku biyopsisi, bronkoalveolar lavaj ve orta kulak sıvısı materyallerinde de HCoV pozitifliği saptanmıştır (6, 15, 16, 22, 24, 28-30, 48, 58, 65, 74, 75, 85, 88, 97, 101). Bu çalışmada pozitiflik saptanan bir materyal de, nazofaringeal aspirat olmuştur.

Türkiye' de HCoV' un ELISA yöntemi ile saptanmasına yönelik ticari kitler mevcuttur; fakat bu kitler HCoV-229E ve HCoV-OC43' e yönelik monoklonal antikorlarla hazırlanmış olduğundan, HCoV-NL63 ve HCoV-HKU1' in saptanması pek mümkün görülmemektedir ve bu iki yeni HCoV için henüz ticari bir kit bulunmamaktadır. Bununla beraber ülkemizde HCoV' un ELISA yöntemi ile araştırılması da pek yaygın değildir. Bu yüzden çalışmamızda, moleküler yöntemlerden RT-PCR testi tercih edilmiştir. Çoğu çalışmada uygulanılmış olan RT-PCR testinde HCoV' un en korunmuş bölgesi olan polimeraz genine uygun primerler kullanıldığından, bu çalışmada da o bölgeye uygun Pancorona primerleri kullanılmıştır (51, 60, 72). Bu primerlerin en az hangi orandaki pozitifliği saptadığını tespit etmek amacıyla yaptığımız deneysel çalışmada, pozitif kontrolün 1/100 dilüsyonuna kadar pozitiflik saptanabileceği tespit edilmiştir. Pozitif bulunan hasta materyalindeki HCoV' un hangi gruba ait olduğunu saptamak amacıyla yapılan RT-PCR çalışmasında da, diğer çalışmalarla uyumlu olarak, iyi sonuçlar veren virusun nukleokapsit (N) geninden uygun primerler kullanılmıştır (7, 24, 74).

SARS-CoV dışı HCoV infeksiyonlarından korunmak için mevcut bir aşı yoktur. SARS-CoV ise, kıtalar arası bulaşa sebep olacak kadar yüksek bulaşıcılık özelliğine sahip olduğundan, salgın esnasındaki karantina uygulamaları, infeksiyonun kontrolünde çok etkili olmuştur. Ölümcül SARS infeksiyonuna karşı aşı çalışmaları başlatılmıştır.

Bu aşılardan bazıları Kanada’ da gönüllü insanlarda denenmiş ve kısmen başarılı sonuçlar alınmıştır (68).

Çalışmamızda Kasım 2007- Mayıs 2008 tarihleri arasında İstanbul Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Viroloji Laboratuvarı’ na Türkiye’ nin 11 ilinden gelen toplam 400 solunum yolu örneği, HCoV araştırmak üzere RT-PCR tekniği ile incelenmiş ve sadece 1 örnekte (% 0,25) HCoV pozitifliği saptanmıştır. Bulduğumuz pozitiflik oranı düşük olmakla birlikte, dünyanın değişik yerlerinde yapılan bazı çalışmalarla uyumludur (15, 60, 72, 80). Düşük pozitiflik saptamamızın nedenini, araştırma yaptığımız dönemin HCoV’ un epidemi yaptığı döneme rastlamamış olabileceği şeklinde yorumladık. Çünkü bazı çalışmalarda, HCoV enfeksiyonunun 2-4 yılda bir pik aktivite gösterdiği saptanmıştır (37, 51, 72, 85, 93, 102). Ayrıca bazı araştırmacılar, örneklerin sadece kış mevsiminde toplanmasının, pozitiflik oranını arttırabileceğini bildirmektedirler (31, 56, 97, 108). Coronavirus’ ların diğer enfeksiyon etkenleri ile birlikte bulunma sıklığı düşünüldüğünde, duyarlı bir test olan RT-PCR testi ile her yaş grubunda yapılan tarama, sadece çocuk grubunda ya da immun sistemi baskılanmış hastalarda yapılmış olsaydı, daha yüksek pozitiflik oranının saptanabileceği rapor edilmektedir (7, 30, 31, 56, 58, 85, 87, 97, 99, 101, 103). Ayrıca Han ve ark. (37) tarafından da vurgulandığı gibi, hastalarda semptomlar başladıktan uzun süre sonra örneğin alımı, virus saçılımının bittiği döneme denk gelip, virusun saptanamama ihtimali de bulunmaktadır. Ayrıca Nokso-Koivisto ve ark.’ nın (74) bildirdiği gibi, çalışmamızda semptomları bulunmayan kontrol grubunun bulunmamasından dolayı, asemptomatik bireylerdeki pozitifliğin kaçırılmış olması da muhtemeldir.

HCoV’ ların izolasyon süreci güç ve zahmetli olduğundan, rutin tanısı serolojik yöntemler ve moleküler yöntemlerle yapılmaktadır. Ülkemizde ticari ELISA kitleri olmasına karşın rutin virus tanısı için yaygın uygulama henüz yeterli değildir. Ayrıca son yıllarda solunum yolu viruslarını kapsayan, hibridizasyon yöntemine dayalı hazır moleküler tanı kitleri de kullanılmaya başlanmıştır. HCoV’ lar çoğunlukla da soğuk algınlığı ile ilgili olarak düşünüldüğünden, tanıya gerek duyulmamakta ve dolayısıyla insidansı düşük bulunmaktadır. Fakat bazı ülkelerde yapılan çalışmalarda saptanmış yüksek pozitiflik oranı, bu virusların da sıklıkla solunum yolu enfeksiyonu etkeni olabileceğini göstermektedir (103). Solunum viruslarının surveyansına dair Türkiye

genelinde yapılan çalışmalara HCoV' ların da katılması, ülkemizde bu virusun görülme sıklığını, farklı yıllarda epidemi yapıp yapmadığını ve hangi popülasyonda, hangi infeksiyonlara sebep olduğunu anlayabilmek açısından önemlidir. Bu durumda, ülkemizdeki etkeni belirlenemeyen solunum yolu infeksiyonlarının bir kısmının daha etkenleri tanımlanmış olacaktır.

Özellikle immun sistemi baskılanmış çocuklarda meydana gelen solunum yolu infeksiyonlarında etken olarak HCoV' ların da araştırılması, hem gereksiz antibiyotik kullanımını önleyecek hem de hastaların diğer kişilerle temasında gerekli önlemlerin alınmasında yararlı olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Afzelius BA. Ultrastructure of human nasal epithelium during an episode of Coronavirus infection. *Virchows Arch* 1994; **424**: 295-300.
2. Akan E. *Genel ve Özel Viroloji*. İzmir: Saray Medikal Yayıncılık; 1994.
3. An S, Chen CJ, Yu X, Leibowitz JL, Makino S. Induction of apoptosis in murine Coronavirus-infected cultured cells and demonstration of E protein as an apoptosis inducer. *J Virol* 1999; **73**: 7853-7859.
4. Arbour N, Day R, Newcombe J, Talbot PJ. Neuroinvasion by human respiratory Coronaviruses. *J Virol* 2000; **74**: 8913-8921.
5. Arden KE, Nissen MD, Sloots TP, Mackay IM. New human Coronavirus, HCoV-NL63, associated with severe lower respiratory tract disease in Australia. *J Med Virol* 2005; **75**: 455-462.
6. Bastien N, Anderson K, Hart L, Caesele PV, Brandt K, Milley D, Hatchette T, Weiss EC, Li Y. Human Coronavirus NL63 infection in Canada. *J Infect Dis* 2005; **191**: 503-506.
7. Bastien N, Robinson JL, Tse A, Lee BE, Hart L, Li Y. Human Coronavirus NL-63 infections in children: a 1-year study. *J Clin Microbiol* 2005; **43** (9): 4567-4573.
8. Beaudette FR, Hudson CB. Cultivation of the virus of infectious bronchitis. *J Am Vet Med Assoc* 1937; **90**: 51-60.
9. Bradburne AF, Bynoe ML, Tyrrell DAJ. Effects of a " new " human respiratory virus in volunteers. *Brit Med J* 1967; **3**: 767-769.
10. Brian DA, Hogue BG, Kienzle TE. The Coronavirus Hemagglutinin Esterase Glycoprotein. In Siddell SG, editor. *The Coronaviridae*. New York: Plenum Press; 1995. pp. 165-179.
11. Broer R, Boson B, Spaan W, Cosset FL, Corver J. Important role for the transmembrane domain of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus spike protein during entry. *J Virol* 2006; **80**: 1302-1310.
12. Cheever FS, Daniels JB, Pappenheimer AM, Bailey OT. A murine virus (JHM) causing disseminated encephalomyelitis with extensive destruction of myelin. *J Exp Med* 1949; **90**: 181-194.

13. Chung J-Y, Han TH, Kim SW, Kim CK, Hwang E-S. Detection of viruses identified recently in children with acute wheezing. *J Med Virol* 2007; **79**: 1238–1243.
14. Cinatl J, Morgenstern B, Bauer G, Chandra P, Rabenau H, Doerr H. Treatment of SARS with human interferons. *Lancet* 2003; **362**: 293-294.
15. Coiras MT, Aguilar JC, Garcia ML, Casas I, Perez-Brena P. Simultaneous detection of fourteen respiratory viruses in clinical specimens by two multiplex reverse transcription nested-PCR assays. *J Med Virol* 2004; **72**: 484–495.
16. Collins AR, Yeh EA, Faden HS. Detection of Coronavirus in the cerebrospinal fluid of a child with acute disseminated encephalomyelitis. *Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother* 2003; **43**: 14-17.
17. Compton SR, Barthold SW, Smith AL. The cellular and molecular pathogenesis of Coronaviruses. *Lab Anim Sci* 1993; **43**: 15-28.
18. de Haan CA, Stadler K, Godeke GJ, Bosch BJ, Rottier PJ. Cleavage inhibition of the murine Coronavirus spike protein by a furin-like enzyme affects cell-cell but not virus-cell fusion. *J Virol* 2004; **78**: 6048-6054.
19. Denison MR. Coronavirus Research: Keys to Diagnosis, Treatment and Prevention of SARS. In Knobler S, Mahmoud A, Lemon S, Mack A, Slutsky L, Oberholtzer K, editors. *Learning from SARS: Preparing for the Next Disease Outbreak*. Washington D.C.: National Academies Press; 2004. pp. 149-157.
20. Doyle LP, Hutchings LM. A transmissible gastroenteritis in pigs. *J Am Vet Med Assoc* 1946; **108**: 257-259.
21. Drosten C, Günther S, Preiser W, van der Werf S, Brodt HR, Becker S, Rabenau H, Panning M, Kolesnikova L, Fouchier RA, Berger A, Burguière AM, Cinatl J, Eickmann M, Escriou N, Grywna K, Kramme S, Manuguerra JC, Müller S, Rickerts V, Stürmer M, Vieth S, Klenk HD, Osterhaus AD, Schmitz H, Doerr HW. Identification of a novel Coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *New Engl J Med* 2003; **348** (20): 1967-1976.
22. Ebihara T, Endo R, Ma X, Ishiguro N, Kikuta H. Detection of Human Coronavirus NL63 in young children with bronchiolitis. *J Med Virol* 2005; **75**: 463–465.
23. Esper F, Weibel C, Ferguson D, Landry ML, Kahn JS. Coronavirus HKU1 infection in the United States. *Emerg Infect Dis* 2006; **12** (5): 775-779.

24. Esposito S, Bosis S, Niesters HGM, Tremolati E, Begliatti E, Rognoni A, Tagliabue C, Principi N, Osterhaus AD. Impact of human Coronavirus infections in otherwise healthy children who attended an emergency department. *J Med Virol* 2006; **78**: 1609–1615.
25. Falsey AR, Walsh EE, Hayden FG. Rhinovirus and Coronavirus infection-associated hospitalizations among older adults. *J Infect Dis* 2002; **185**: 1338–1341.
26. Flint SJ, Enquist LW, Racaniello VR, Skalka AM. *Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis and Control of Animal Viruses*. 2nd ed. Washington D.C.: ASM Press; 2004.
27. Fouchier RA, Hartwig NG, Bestebroer TM, Niemeyer B, de Jong JC, Simon JH, Osterhaus AD. A previously undescribed Coronavirus associated with respiratory disease in humans. *P Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 6212-6216.
28. Gagneur A, Dirson E, Audebert S, Vallet S, Legrand-Quillien MC, Laurent Y, Collet M, Sizun J, Oger E, Payan C. Materno-fetal transmission of human Coronaviruses: a prospective pilot study. *Eur J Clin Microbiol* 2008; **27** (9): 863-866.
29. Gagneur A, Vallet S, Talbot PJ, Legrand-Quillien MC, Picard B, Payan C, Sizun J. Outbreaks of human Coronavirus in a paediatric and neonatal intensive care unit. *Eur J Pediatr* 2008; **167** (12): 1427-1434.
30. Garbino J, Crespo S, Aubert J-D, Rochat T, Ninet B, Deffernez C; Wunderli W, Pache J-C, Soccia PM, Kaiser L. A prospective hospital-based study of the clinical impact of non-Severe Acute Respiratory Syndrome (non-SARS)-related human Coronavirus infection. *Clin Infect Dis* 2006; **43**: 1009–1015.
31. Gerna G, Campanini G, Rovida F, Percivalle E, Sarasini A, Marchi A, Baldanti F. Genetic variability of Human Coronavirus OC43-, 229E-, and NL63-like strains and their association with lower respiratory tract infections of hospitalized infants and immunocompromised patients. *J Med Virol* 2006; **78**: 938-949.
32. Gerna G, Passarani N, Battaglia M, Rondanelli EG. Human enteric Coronaviruses: antigenic relatedness to Human Coronavirus OC43 and possible etiologic role in viral gastroenteritis. *J Infect Dis* 1985; **151**: 796-803.
33. Guan Y, Zheng BJ, He YQ, Liu XL, Zhuang ZX, Cheung CL, Luo SW, Li PH, Zhang LJ, Guan YJ, Butt KM, Wong KL, Chan KW, Lim W, Shortridge KF, Yuen KY,

- Peiris JSM, Poon LLM. Isolation and characterization of viruses related to the SARS Coronavirus from animals in southern China. *Science* 2003; **302** (5643): 276-278.
34. Haagmans BL, Kuiken T, Martina BE, Fouchier RA, Rimmelzwaan GF, van Amerongen G, van Riel D, de Jong T, Itamura S, Chan KH, Tashiro M, Osterhaus AD. Pegylated interferon-alpha protects type 1 pneumocytes against SARS Coronavirus infection in macaques. *Nat Med* 2004; **10**: 290-293.
35. Haijema BJ, Volders H, Rottier PJM. Switching species tropism: an effective way to manipulate the feline Coronavirus genome. *J Virol* 2003; **77** (8): 4528-4538.
36. Hamre D, Procknow JJ. A new virus isolated from the human respiratory tract. *P Soc Exp Biol Med* 1966; **121**: 190-193.
37. Han TH, Chung J-Y, Kim SW, Hwang E-S. Human Coronavirus-NL63 infections in Korean children, 2004–2006. *J Clin Virol* 2007; **38**: 27–31.
38. Hasöksüz M, Alekseev K, Vlasova A, Zhang X, Spiro D, Halpin R, Wang S, Ghedin E, Saif LJ. Biologic, antigenic, and full-length genomic characterization of a bovine-like Coronavirus isolated from a giraffe. *J Virol* 2007; **81** (10): 4981-4990.
39. Hasöksüz M, Lathrop S, Al-dubaib MA, Lewis P, Saif LJ. Antigenic variation among Bovine Enteric Coronaviruses (BECV) and Bovine Respiratory Coronaviruses (BRCV) detected using monoclonal antibodies. *Arch Virol* 1999; **144** (12): 2441-2447.
40. Hasöksüz M, Sreevatsan S, Cho KO, Hoet AE, Saif LJ. Molecular analysis of the S1 subunit of the spike glycoprotein of respiratory and enteric bovine Coronavirus isolates. *Virus Res* 2002; **84**: 101-109.
41. Hasöksüz M, Vlasova A, Saif LJ. Detection of Group 2a Coronaviruses with Emphasis on Bovine and Wild Ruminant Strains. In Cavanagh D, editor. *SARS- and Other Coronaviruses*. New York: Humana Press; 2008. pp. 43-59.
42. Herrewegh AA, Mahler M, Hedrich HJ, Haagmans BL, Egberink HF, Horzinek MC, Rottier PJ, de Groot RJ. Persistence and evolution of feline Coronavirus in a closed cat-breeding colony. *Virology* 1997; **234** (2): 349-363.
43. Holmes KV. Coronaviruses. In Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. pp. 1187-1204.

44. Holmes KV, Lai MMC. Coronaviridae: The Viruses and Their Replication. In Fields BN, Knipe DM, Howley PM, et al, editors. *Fundamental Virology*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1996. pp. 541-559.
45. Jackwood MW. The relationship of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus with avian and other Coronaviruses. *Avian Dis* 2006; **50** (3): 315-320.
46. Kahn JS. The widening scope of Coronaviruses. *Curr Opin Pediatr* 2006; **18**: 42–47.
47. Kahn JS, McIntosh K. History and recent advances in Coronavirus discovery. *Pediatr Infect Dis J* 2005; **24** (11): 223–227.
48. Kaiser L, Regamey N, Roiha H, Deffernez C, Frey U. Human Coronavirus NL63 associated with lower respiratory tract symptoms in early life. *Pediatr Infect Dis J* 2005; **24** (11): 1015-1017.
49. Kamps BS, Hoffmann C. Transmission. In Kamps BS, Hoffmann C, editors. *SARS Reference-10/2003*. Flying Publisher; 2003. pp. 49-60.
50. Kern P, Müller G, Schmitz H, Racz P, Meigel W, Riethmüller G, Dietrich M. Detection of Coronavirus-like particles in homosexual men with acquired immunodeficiency and related lymphadenopathy syndrome. *Klin Wochenschr* 1985; **63**: 68-72.
51. Kistler A, Avila PC, Rouskin S, Wang D, Ward T, Yagi S, Schnurr D, Ganem D, DeRisi JL, Boushey HA. Pan-viral screening of respiratory tract infections in adults with and without asthma reveals unexpected human Coronavirus and human Rhinovirus diversity. *J Infect Dis* 2007; **196** (6): 810-811.
52. Knobler S, Mahmoud A, Lemon S, Mack A, Slutsky L, Oberholtzer K, editors. *Learning from SARS: Preparing for the Next Disease Outbreak*. Washington D.C.: National Academies Press; 2004.
53. Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, Zaki SR, Peret T, Emery S, Tong S, Urbani C, Comer JA, Lim W, Rollin PE, Dowell SF, Ling A, Humphrey CD, Shieh W, Guarner J, Paddock CD, Rota P, Fields B, DeRisi J, Yang J, Cox N, Hughes JM, LeDuc JW, Bellini WJ, Anderson LJ. A novel Coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *New Engl J Med* 2003; **348** (20): 1953-1966.

54. Kuiken T, Fouchier RA, Schutten M, Rimmelzwaan GF, van Amerongen G, van Riel D, Laman JD, de Jong T, van Doornum G, Lim W, Ling AE, Chan PK, Tam JS, Zambon MC, Gopal R, Drosten C, van der Werf S, Escriou N, Manuguerra JC, Stöhr K, Peiris JS, Osterhaus AD. Newly discovered Coronavirus as the primary cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet* 2003; **362**: 263-270.
55. Kupfer B, Simon A, Jonassen CM, Viazov S, Ditt V, Tillmann RL, Müller A, Matz B, Schildgen O. Two cases of severe obstructive pneumonia associated with an HKU1-like Coronavirus. *Eur J Med Res* 2007; **12** (3): 134-138.
56. Kuypers J, Martin ET, Heugel J, Wright N, Morrow R, Englund JA. Clinical disease in children associated with newly described Coronavirus subtypes. *Pediatrics* 2007; **119** (1): 70-76.
57. Lai MMC, Perlman S, Anderson LJ. Coronaviridae. In Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. pp. 1305-1335.
58. Lambert SB, Allen KM, Druce JD, Birch CJ, Mackay IM, Carlin JB, Carapetis JR, Sloots TP, Nissen MD, Nolan TM. Community epidemiology of human Metapneumovirus, Human Coronavirus NL63, and other respiratory viruses in healthy preschool-aged children using parent-collected specimens. *Pediatrics* 2007; **120** (4): 929-937.
59. Lau SKP, Woo PC, Li KS, Huang Y, Tsoi HW, Wong BH, Wong SS, Leung SY, Chan KH, Yuen KY. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. *P Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 14040-14045.
60. Lau SKP, Woo PCY, Yip CCY, Tse H, Tsoi H-W, Cheng VCC, Lee P, Tang BSF, Cheung CHY, Lee RA, So L-Y, Lau Y-L, Chan KH, Yuen KY. Coronavirus HKU1 and other Coronavirus infections in Hong Kong. *J Clin Microbiol* 2006; **44** (6): 2063–2071.
61. Lee HK, Tso EY, Chau TN, Tsang OT, Choi KW, Lai TS. Asymptomatic Severe Acute Respiratory Syndrome-associated Coronavirus infection. *Emerg Infect Dis* 2003; **9**: 1491-1492.
62. Liecester University Department of Microbiology and Immunology. *Coronaviruses*. Erişim: 06.01.2009, <http://www.microbiologybytes.com/virology/Coronaviruses.html>
63. Liu DX, Yuan Q, Liao Y. Coronavirus envelope protein: a small membrane protein with multiple functions. *Cell Mol Life Sci* 2007; **64** (16): 2043-2048.

64. Li W, Shi Z, Yu M, Ren W, Smith C, Epstein JH, Wang H, Crameri G, Hu Z, Zhang H, Zhang J, McEachern J, Field H, Daszak P, Eaton BT, Zhang S, Wang LF. Bats are natural reservoirs of SARS-like Coronaviruses. *Science* 2005; **310**: 676-679.
65. Macnaughton MR. Occurrence and frequency of Coronavirus infections in humans as determined by enzyme-linked immunosorbent assay. *Infect Immun* 1982; **38** (2): 419-423.
66. Mahony JB. Coronaviruses. In Murray PR, Baron EJ, Jorgensen J, Pfaller M, Landry ML, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 9th ed. Washington D.C.: ASM Press; 2007. pp. 1414-1423.
67. Makino S, Stohlman SA, Lai MMC. Leader sequences of murine Coronavirus mRNAs can be freely reassorted: evidence for the role of free leader RNA in transcription. *P Natl Acad Sci USA* 1986; **83**: 4204-4208.
68. Martin JE, Louder MK, Holman LA, Gordon IJ, Enama ME, Larkin BD, Andrews CA, Vogel L, Koup RA, Roederer M, Bailer RT, Gomez PL, Nason M, Mascola JR, Nabel GJ, Graham BS. A SARS DNA vaccine induces neutralizing antibody and cellular immune responses in healthy adults in a Phase I clinical trial. *Vaccine* 2008; **26** (50): 6338-6343.
69. McIntosh K. Coronaviruses in the limelight. *J Infect Dis* 2005; **191** (4): 489-491.
70. McIntosh K, Anderson LJ. Coronaviruses, Including Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS)–associated Coronavirus. In Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2005. pp. 1990-2003.
71. McIntosh K, Dees JH, Becker WB, Kapikian AZ, Chanock RM. Recovery in tracheal organ cultures of novel viruses from patients with respiratory disease. *P Natl Acad Sci USA* 1967; **57**: 933-940.
72. Moes E, Vijgen L, Keyaerts E, Zlateva K, Li S, Maes P, Pyrc K, Berkhout B, van der Hoek L, Ranst MV. A novel Pancoronavirus RT-PCR assay: frequent detection of Human Coronavirus NL63 in children hospitalized with respiratory tract infections in Belgium. *BMC Infect Dis* 2005; **5** (1): 6.
73. Murray PR, Pfaller MA, Rosenthal KS, editors. *Medical Microbiology*. 5th ed. Pennsylvania: Elsevier Mosby Press; 2005.

74. Nokso-Koivisto J, Pitkaranta A, Blomqvist S, Kilpi T, Hovi T. Respiratory Coronavirus infections in children younger than two years of age. *Pediatr Infect Dis J* 2000; **19** (2): 164-166.
75. Papa A, Papadimitriou E, Luna LK, Al Masri M, Souliou E, Eboriadou M, Antoniadis A, Drosten C. Coronaviruses in children, Greece. *Emerg Infect Dis* 2007; **13** (6): 947-949.
76. Patrick DM, Petric M, Skowronski DM, Guasparini R, Booth TF, Krajden M, McGeer P, Bastien N, Gustafson L, Dubord J, Macdonald D, David ST, Srouf LF, Parker R, Andonov A, Isaac-Renton J, Loewen N, McNabb G, McNabb A, Goh SH, Henwick S, Astell C, Guo JP, Drebot M, Tellier R, Plummer F, Brunham RC. An outbreak of Human Coronavirus OC43 infection and serological cross-reactivity with SARS Coronavirus. *Can J Microbiol* 2006; **17** (6): 330-336.
77. Peiris JS, Chu CM, Cheng VC, Chan KS, Hung IF, Poon LL, Law KI, Tang BS, Hon TY, Chan CS, Chan KH, Ng JS, Zheng BJ, Ng WL, Lai RW, Guan Y, Yuen KY. Clinical progression and viral load in a community outbreak of Coronavirus-associated SARS pneumonia: a prospective study. *Lancet* 2003; **361**: 1767-1772.
78. Peiris JS, Lai ST, Poon LL, Guan Y, Yam LY, Lim W, Nicholls J, Yee WK, Yan WW, Cheung MT, Cheng VC, Chan KH, Tsang DN, Yung RW, Ng TK, Yuen KY. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet* 2003; **361** (9366): 1319-1325.
79. Pfleiderer M, Routledge E, Herrler G, Siddell SG. High level transient expression of the murine Coronavirus haemagglutinin-esterase. *J Gen Virol* 1991; **72**: 1309-1315.
80. Pierangeli A, Gentile M, Di Marco P, Pagnotti P, Scagnolari C, Trombetti S, Lo Russo L, Tromba V, Moretti C, Midulla F, Antonelli G. Detection and typing by molecular techniques of respiratory viruses in children hospitalized for acute respiratory infection in Rome, Italy. *J Med Virol* 2007; **79**: 463-468.
81. Poon LL, Chu DK, Chan KH, Wong OK, Ellis TM, Leung YH, Lau SK, Woo PC, Suen KY, Yuen KY, Guan Y, Peiris JS. Identification of a novel Coronavirus in bats. *J Virol* 2005; **79** (4): 2001-2009.
82. Pyrc K, Berkhout B, van der Hoek L. Antiviral strategies against human Coronaviruses. *Infectious disorders- drug targets* 2007; **7**: 59-66.
83. Saif LJ. Animal Coronaviruses: Lessons for SARS. In Knobler S, Mahmoud A, Lemon S, Mack A, Sluitz L, Oberholtzer K, editors. *Learning from SARS: Preparing*

- for the Next Disease Outbreak*. Washington D.C.: National Academies Press; 2004. pp. 138-149.
84. Saif L, Wesley R. Transmissible Gastroenteritis Virus. In Straw BE, D'Allaire S, Mengeling WL, Taylor D, editors. *Diseases of Swine*. 8th ed. Ames, IA: Iowa State University Press; 1999. pp. 295-325.
 85. Shao X, Guo X, Esper F, Weibel C, Kahn JS. Seroepidemiology of Group I human Coronaviruses in children. *J Clin Virol* 2007; **40**: 207–213.
 86. Siddel SG, Ziebuhr J, Snijder EJ. Coronaviruses, Toroviruses and Arteriviruses. In Mahy BW, ter Muelen V, editors. *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*. 10th ed. London: ASM Press; 2005. pp. 823-856.
 87. Simon A, Völz S, Fleischhack G, Tillman R, Müller A, Bode U, Schildgen O. Human Coronavirus OC43 pneumonia in a pediatric cancer patient with Down Syndrome and acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Onc* 2007; **29** (6): 432-434.
 88. Simon A, Völz S, Höfling K, Kehl A, Tillman R, Müller A, Kupfer B, Eis-Hübinger AM, Lentze MJ, Bode U, Schildgen O. Acute life threatening event (ALTE) in an infant with Human Coronavirus HCoV-229E infection. *Pediatr Pulm* 2007; **42**: 393–396.
 89. Song HD, Tu CC, Zhang GW, Wang SY, Zheng K, Lei LC, Chen QX, Gao YW, Zhou HQ, Xiang H, Zheng HJ, Chern SW, Cheng F, Pan CM, Xuan H, Chen SJ, Luo HM, Zhou DH, Liu YF, He JF, Qin PZ, Li LH, Ren YQ, Liang WJ, Yu YD, Anderson L, Wang M, Xu RH, Wu XW, Zheng HY, Chen JD, Liang G, Gao Y, Liao M, Fang L, Jiang LY, Li H, Chen F, Di B, He LJ, Lin JY, Tong S, Kong X, Du L, Hao P, Tang H, Bernini A, Yu XJ, Spiga O, Guo ZM, Pan HY, He WZ, Manuguerra JC, Fontanet A, Danchin A, Niccolai N, Li YX, Wu CI, Zhao GP. Cross-host evolution of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus in palm civet and human. *P Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 2430-2435.
 90. Spaan W, Cavanagh D, Horzinek MC. Coronaviruses: structure and genome expression. *J Gen Virol* 1988; **69**: 2939-2952.
 91. Stavrinides J, Guttman DS. Mosaic evolution of the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. *J Virol* 2004; **78** (1): 76-82.
 92. Sturman LS, Holmes KV, Behnke J. Isolation of Coronavirus envelope glycoproteins and interaction with the viral nucleocapsid. *J Virol* 1980; **33**: 449-462.

93. Suzuki A, Okamoto M, Ohmi A, Watanabe O, Miyabayashi S, Nishimura H. Detection of Human Coronavirus-NL63 in children in Japan. *Pediatr Infect Dis J* 2005; **24** (7): 645-646.
94. Theamboonlers A, Samransamruajkit R, Thongme C, Amonsin A, Chongsrisawat V, Poovorawan Y. Human Coronavirus infection among children with acute lower respiratory tract infection in Thailand. *Intervirology* 2007; **50** (2): 71-77.
95. Topçu AW, Yumuk Z. Coronavirüsler ve Ağır Akut Solunum Yetmezliği Sendromu (SARS). İçinde Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M, editörler. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, Sistemlere Göre Enfeksiyonlar*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2008. s. 1759-1768.
96. Tyrrell DA, Bynoe ML. Cultivation of viruses from a high proportion of patients with colds. *Lancet* 1966; **1**: 76-77.
97. Vabret A, Dina J, Gouarin S, Petitjean J, Corbet S, Freymuth F. Detection of the new Human Coronavirus HKU1: a report of 6 cases. *Clin Infect Dis* 2006; **42**: 634–639.
98. Vabret A, Dina J, Gouarin S, Petitjean J, Tripey V, Brouard J, Freymuth F. Human (non-Severe Acute Respiratory Syndrome) Coronavirus infections in hospitalised children in France. *J Paediatr Child H* 2008; **44** (4): 176-181.
99. Vabret A, Mourez T, Gouarin S, Petitjean J, Freymuth F. An outbreak of Coronavirus OC43 respiratory infection in Normandy, France. *Clin Infect Dis* 2003; **36**: 985-989.
100. van der Hoek L, Pyrc K, Berkhout B. Human Coronavirus NL63, a new respiratory virus. *FEMS Microbiol Rev* 2006; **30**: 760–773.
101. van der Hoek L, Pyrc K, Jebbink MF, Vermeulen-Oost W, Berkhout RJM, Wolthers KC, Wertheim-van Dillen PME, Kaandorp J, Spaargaren J, Berkhout B. Identification of a new human Coronavirus. *Nat Med* 2004; **10**: 368-373.
102. van der Hoek L, Sure K, Ihorst G, Stang A, Pyrc K, Jebbink MF, Petersen G, Forster J, Berkhout B, Überla K. Croup is associated with the novel Coronavirus NL63. *PLoS Med* 2005; **2** (8): 764-770.
103. van Elden LJR, van Loon AM, van Alphen F, Hendriksen KAW, Hoepelman AIM, van Kraaij MGJ, Oosterheert JJ, Schipper P, Schuurman R, Nijhuis M. Frequent detection of human Coronaviruses in clinical specimens from patients with respiratory tract infection by use of a novel real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *J Infect Dis* 2004; **189**: 652–657.

104. van Reeth K, Pensaert M. Prevalence of infections with enzootic respiratory and enteric viruses in feeder pigs entering fattening herds. *Vet Rec* 1994; **135** (25): 594-597.
105. Weiss SR, Navas-Martin S. Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. *Microbiol Mol Biol R* 2005; **69**: 635-664.
106. White DO, Fenner FJ. *Medical Virology*. 4th ed. California: Academic Press Inc; 1994.
107. Wong SF, Chow KM, de Swiet M. Severe acute respiratory syndrome and pregnancy. *Brit J Obstet Gynaec* 2003; **110**: 641-642.
108. Woo PCY, Lau SKP, Chu CM, Chan KH, Tsoi HW, Huang Y, Wong BH, Poon RW, Cai JJ, Luk WK, Poon LL, Wong SS, Guan Y, Peiris JS, Yuen KY. Characterization and complete genome sequence of a novel Coronavirus, Coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *J Virol* 2005; **79** (2): 884-895.
109. Woo PCY, Lau SKP, Tsoi HW, Huang Y, Poon RWS, Chu CM, Lee RA, Luk WK, Wong GKM, Wong BHL, Cheng VCC, Tang BSF, Wu AKL, Yung RWH, Chen H, Guan Y, Chan KH, Yuen KY. Clinical and molecular epidemiological features of Coronavirus HKU1-associated community-acquired pneumonia. *J Infect Dis* 2005; **192** (11): 1898-1907.
110. Woo PCY, Lau SKP, Yip CCY, Huang Y, Tsoi HW, Chan KH, Yuen KY. Comparative analysis of 22 Coronavirus HKU1 genomes reveals a novel genotype and evidence of natural recombination in Coronavirus HKU1. *J Virol* 2006; **80** (14): 7136-7145.
111. Wu PS, Chang LY, Berkhout B, van der Hoek L, Lu CY, Kao CL, Lee PI, Shao PL, Lee CY, Huang FY, Huang LM. Clinical manifestations of Human Coronavirus NL63 infection in children in Taiwan. *Eur J Pediatr* 2008; **167** (1): 75-80.
112. Yang Y, Xiong Z, Zhang S, Yan Y, Nguyen J, Ng B, Lu H, Brendese J, Yang F, Wang H, Yang XF. Bcl-xL inhibits T-cell apoptosis induced by expression of SARS Coronavirus E protein in the absence of growth factors. *Biochem J* 2005; **392**: 135-143.
113. Zhang X, Hasöksüz M, Spiro D, Halpin R, Wang S, Stollar S, Janies D, Hadya N, Tang Y, Ghedin E, Saif L. Complete genomic sequences, a key residue in the spike protein and deletions in nonstructural protein 3b of US strains of the virulent and attenuated Coronaviruses, Transmissible Gastroenteritis Virus and Porcine Respiratory Coronavirus. *Virology* 2007; **358** (2): 424-435.

114. Zhao Z, Zhang F, Xu M, Huang K, Zhong W, Cai W, Yin Z, Huang S, Deng Z, Wei M, Xiong J, Hawkey PM. Description and clinical treatment of an early outbreak of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangzhou, PR China. *J Med Microbiol* 2003; **52**: 715-720.
115. Zhu RN, Qian Y, Zhao LQ, Deng J, Wang F, Liao B. Human Coronavirus-NL63 was detected in specimens from children with acute respiratory infection in Beijing, China. *Zhonghua Er Ke Za Zhi* 2006; **44** (3): 202-205.

ETİK KURUL KARARI

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
DEKANLIĞI
Yerel Etik Kurulu



Sayı : 2407

Tarih : 18/10/2007

Konu : Prof.Dr.Emel BOZKAYA hk,

Sayın, Prof.Dr.Emel BOZKAYA
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

İlgi : 19.07.2007 tarihli, 592 sayılı yazınız,

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiği ve Yüksek Lisans Öğrencisi Biyolog Fadime GÜL'ün yürüteceği 2007/1757 dosya no'lu "Akut solunum yolu infeksiyonlarında Human Coronavirus insidansı" başlıklı Epidemiyolojik Tezi kurulumuzun 12.09.2007 tarihli, 08 sayılı toplantısında onaylanmış olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize saygılarımla rica ederim.

Prof.Dr. Zafer ARI
İstanbul Tıp Fakültesi
Etik Kurul Başkanı

Eki: Tutanak

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	FADİME	Soyadı	GÜL
Doğ.Yeri	İSTANBUL	Doğ.Tar.	23.01.1984
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	29033370782
Email	fadimegul@hotmail.com	Tel	0543 427 93 90

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	İ. Ü. İstanbul Tıp Fak. Mikrobiyoloji ve Kli. Mik. ABD	
Lisans	İ. Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2006
Lise	Kağıthane Anadolu Lisesi	2002

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Stajyer Biyolog	İ.Ü. İstanbul Tıp Fak.	2005-2005
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	İyi	Çok İyi	68	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	54,292	54,651	55,010
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
MICROSOFT OFFICE PROGRAMLARI	Çok İyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri**Sertifikalar**

Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti tarafından düzenlenen “Human Papilloma Virus Enfeksiyonları” konulu toplantıya katılım belgesi (03 Mayıs 2007)

İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu ile Deney Hayvanları Araştırma ve Üretim Laboratuvarı tarafından düzenlenen “Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu” katılım sertifikası (21-22 Mart 2006)

İ.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Genetik Kulübü tarafından düzenlenen “3. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Genetik Öğrenci Kış Okulu” katılım sertifikası (13-19 Mart 2006)

Katıldığı kongreler

33. Türk Mikrobiyoloji Kongresi (21-25 Ekim 2008)