

T.C
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

İNFLUENZA A VİRUS ENFEKSİYONLARININ MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİSİ

Deniz YILDIRIM

DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Fügen YARKIN

ADANA-2014

T.C
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

İNFLUENZA A VİRUS ENFEKSİYONLARININ MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİSİ

Deniz YILDIRIM

DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Fügen YARKIN

**Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Rektörlüğü Araştırma Fonu TF2012D3
numaralı proje olarak desteklenmiştir.**

ADANA-2014

TEŞEKKÜR

Gerek Yüksek Lisans tezimde gerekse Doktora çalışmamda benden yardımlarını esirgemeyen sevgili danışman ve tez hocam Prof. Dr. Fügen YARKIN'a, değerli Anabilim Dalı hocamız Prof. Dr. Fatih KÖKSAL'a ve çalışmalarımda bana yardımcı olan viroloji ekibine teşekkürlerimi sunarım.

Deniz YILDIRIM

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
Kabul ve Onay	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Virusun Yapısı	4
2.2. Viral Proteinlerin Genel Özellikleri	4
2.2.1. Antijenik Shift ve Antijenik Drift	6
2.3. Virusun Yaşam Siklusu	6
2.3.1. vRNP'lerin Nukleusa Girişi	10
2.3.2. Viral Genomun Transkripsiyonu ve Replikasyonu	10
2.3.3. vRNP'lerin Nukleusa Eksportu	12

2.3.4. Virus Montajı ve Konak Hücreden Serbest Bırakılma	12
2.4. İnfluenza Virus Enfeksiyonlarının Patolojisi	13
2.5. Hastalığın Klinik Seyri	16
2.6. İnfluenza Virus Enfeksiyonlarının Laboratuvar Tanısı	17
2.6.1. Geleneksel Hücre Kültürü	18
2.6.2. Hızlı Hücre Kültürü	19
2.6.3. Hızlı Antijen Testleri	19
2.6.4. İmmunfloresan Test	21
2.6.5. Nükleik Asit Testleri	21
2.6.5.1. Konvansiyonel Revers Transkriptaz PCR Testi	23
2.6.5.2. Real-Time RT-PCR Testi	25
2.6.5.3. Multipleks PCR Testi	27
2.6.5.4. DNA Mikroarray testi	29
2.6.5.5. Pyrosequencing Test	30
2.6.5.6. Nükleik Asit Sekans Bazlı Amplifikasyon Testi	31
2.6.5.7. Loop-Aracılı İzotermal Amplifikasyon Testi	31
2.7. İnfluenza Virus Enfeksiyonlarında İmmun Cevap	32
2.7.1. Doğal (İnnate) İmmunite	32
2.7.1.1. Alveolar Makrofajlar	33
2.7.1.2. Dendritik Hücreler	34
2.7.1.3. Doğal Öldürücü Hücreler	34
2.7.2. Adaptif İmmunite	35

2.7.2.1. Humoral İmmunite	35
2.7.2.2. Hücresel İmmunite	36
2.8. İnfluenza Viruslarının İmmuniteden Kaçışı	37
2.8.1. Doğal İmmuniteden Kaçış	38
2.8.2. Humoral İmmuniteden Kaçış	39
2.8.3. Hücresel İmmuniteden Kaçış	39
2.9. İmmunoterapi	40
2.10. İnfluenza Aşıları	40
2.10.1. Humoral İmmuniteyi Uyarın İnfluenza Aşıları	41
2.10.2. Hücresel İmmuniteyi Uyarın İnfluenza Aşıları	42
2.11. İnfluenza A pandemik H1N1 2009 virusu	42
2.12. Yüksek Patojeniteli Avian İnfluenza Virus H5N1 Sürveyansı	45
2.12.1. Epidemiyoloji	46
2.12.2. Klinik Yönetim	47
2.12.3. Klinik ve Laboratuvar Tanısı	48
2.13. Antiviral Tedavi	49
2.14. Enfeksiyonun Kontrolü	53
3. GEREÇ VE YÖNTEM	55
3.1. Nazofaringeal Sürüntü Örneklerinin Toplanması	55
3.2. Direkt immunfloresan Antikor (DFA) Testi ile Antijen Tespiti	56
3.2.1. Örneklerin İşlenmesi ve Preparatların Hazırlanması	56
3.2.2. Mikroskopta Değerlendirme Öncesi Yapılan İşlemler	57

3.3. İnfluenza A ve B Real-Time PCR Testi	57
3.3.1. RNA Ekstraksiyonu	57
3.3.2. cDNA Sentezi	59
3.3.3. İnfluenza A ve B Multipleks Real-Time PCR	59
3.4. İnfluenza A H1N1 ve H3N2 Multipleks Real-Time PCR Protokolü	60
3.5. İnfluenza A Virus için Konvansiyonel RT-PCR Test Protokolü	62
3.5.1. cDNA Sentezi	62
3.5.2. İnfluenza A Virus Amplifikasyonu	62
3.6. Agaroz Jel Elektroforezi	63
4. BULGULAR	64
5. TARTIŞMA	72
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	88
7. KAYNAKLAR	91
ÖZGEÇMİŞ	103

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. RT-PCR ürünü 244 bp'lik bandın agaroz jelde görüntülenmesi	63
Şekil 2. İnfluenza A virus ile enfekte vakaların cinsiyet ve yaş gruplarındaki dağılımı	66
Şekil 3. İnfluenza A ve B virus ile enfekte vakaların aylara dağılımı	69
Şekil 4. İnfluenza A virus H1N1 ve H3N2 alttiplerinin aylara göre dağılımı	70

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. İnfluenza A ve B real-time PCR sıcaklık döngüsü	60
Tablo 2. İnfluenza A H1N1 ve H3N2 real-time PCR sıcaklık döngüsü	61
Tablo 3. Hastaların cinsiyet ve yaş gruplarına göre dağılımı	65
Tablo 4. İnfluenza A virus enfeksiyonu olan 98 hastanın cinsiyet ve yaş gruplarına göre dağılımı	65
Tablo 5. İnfluenza enfeksiyonu olan 114 vakanın kliniklere dağılımı	67
Tablo 6. İnfluenza A ve B virus ile enfekte olan ve olmayan hastaların klinik tanıları	67
Tablo 7. İnfluenza olan 114 hastada klinik belirtiler	68
Tablo 8. İnfluenza A virus ve alttıplerin aylara göre dağılımı	69
Tablo 9. İnfluenza virus A ve B real-time PCR testi ve DFA sonuçları	71

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ARDS	Akut Respiratuvar Distres Sendromu
ASYE	Alt Solunum Yolu Enfeksiyonu
CCR7	C-C chemokine receptor type 7
cDNA	Complementary DNA
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CPSF	Cleavage and Polyadenilation Specific Factor
CRM1	Chromosome Region Maintenance 1
CTL	Cytotoxic T Lymphocyte
DFA	Direct immunofluorescence Antibody
DNA	Deoksiribonucleic Acid
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EIA	Enzyme Immunoassay
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FDA	Food and Drug Administration
GTP	Guanozin Trifosfat
HA	Hemagglutinin
HBoV	Human Bocavirus
HCoV	Human Coronavirus
hMPV	Human Metapneumovirus
HPAI	Highly Pathogenic Avian Influenza
hsp40	Heatshock Protein 40

IC50	%50 Inhibitory Concentration
Ig	Immunoglobulin
IPS-1	Interferon-Beta Promoter Stimulator 1
IRF7	Interferon Regulatory Factor 7
LAMP	Loop-Mediated Isothermal Amplification
M	Matriks
MAVS	Mitochondrial Antiviral Signaling
MDCK	Madin Darby Canine Kidney
MGB	Minor Groove Binder
NA	Nöraminidaz
NASBA	Nükleik Asit Sekans Bazlı Amplifikasyon
NEP	Nükleer Eksport Protein
NK	Natural Killer
NLRP3	NOD-like receptor family, pryin domain containing 3
NOS-2	Nitrik Oksid Sentaz
NP	Nükleoprotein
NSP	Non-Structural Protein
PA	Polimeraz Asidik Protein
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern
PB2	Polimeraz Bazik Protein-2
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PIV	Parainfluenza Virus
PKR	RNA-dependent Protein Kinase
PRRs	Pattern Recognition Receptors
RdRp	RNA dependent RNA polymerase

RDTs	Rapid Diagnostic Tests
RhMK	Rhesus Monkey Kidney
RIG-1	Retinoik Asit ile İndüklenebilir Gen-1
RNA	Ribonucleic acid
RPV	Respiratuvar Virus Paneli
rRT-PCR	Real-Time Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction
RSV	Respiratory Syncytial Virus
RT-PCR	Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction
SARS	Severe Acute Respiratory Syndrome
SYE	Solunum Yolu Enfeksiyonu
TIV	Trivalent Inactivated Influenza Vaccine
TLRs	Toll-Like Receptors
TNF	Tümör Nekroz Faktör
Th	T helper
Treg	T regülatör
TRIM25	Tripartite Motif-Containing 25
ÜSYE	Üst Solunum Yolu Enfeksiyonu
vRNP	Viral Ribonükleoprotein
WHO	World Health Organization

ÖZET

İnfluenza A Virus Enfeksiyonlarının Moleküler Epidemiyolojisi

İnfluenza, influenza viruslarının sebep olduğu akut solunum yolu hastalığıdır. İnfluenza virus enfeksiyonları yüksek morbidite ile ilişkilidir ve pnömoni gibi ciddi komplikasyonlara sebep olabilir. Bu çalışmanın amacı solunum yolu enfeksiyonu olan ve hastaneye yatırılan hastalarda influenza tip A ve B virus enfeksiyonlarının insidansı ve influenza A virus alttiplerini real-time RT-PCR test, konvansiyonel RT-PCR test ve direk immunfloresan antikor (DFA) testi ile tespit etmektir. Toplam 476 hastadan 1 Nisan 2012 ve 31 Aralık 2013 tarihleri arasında flocced eküvyon (Copan Diagnostics, Italy) ile nazofaringeal sürüntü örnekleri toplanmıştır. Real-time RT-PCR test (Sacace, Italy) ile influenza A virus vakaların %20.5 (98/476) ve influenza B virus %3.3'ünde (16/476) tespit edilmiştir. Çalışma süresi boyunca 98 influenza virus izolatının %63.3'ünün A(H1N1)pdm09 ve %36.7'sinin A(H3N2) olduğu bulunmuştur. İnfluenza A(H1N1)pdm09 alttipinin Ocak 2013 (12 vaka) ve A(H3N2) alttipinin (11 vaka) Aralık 2013'de baskın olduğu gözlenmiştir. Real-time RT-PCR test referans alındığında influenza A ve B için DFA testinin (Argene SA, France) ve influenza A için WHO primerlerinin (M30F2/08 ve M264R3/08) kullanıldığı konvansiyonel RT-PCR testinin sensitivitesi sırasıyla %72.4, %75, %96 ve spesifitesi %99.2, %99.5 ve %100 bulunmuştur. Sonuç olarak, çalışma grubunda influenza A virus enfeksiyonu %20.5 oranla oldukça yüksek tespit edilmiştir. İnfluenza virus tipleri ve alttiplerinin izlenmesi, influenza aşı suşlarının dolaşımdaki influenza virusları ile uyumunun değerlendirilmesi ve pandemik potansiyeli olan alttiplerin tanısı için gereklidir. Etkili korunma ve kontrol önlemlerinin zamanında alınması, gereksiz antibiyotik kullanımının azaltılması ve antiviral tedaviye başlamak için influenza virus enfeksiyonlarının erken tanısında real-time RT-PCR testinin kullanımı önerilir.

Anahtar Sözcükler: İnfluenza tip A virus, influenza tip B virus, real-time RT-PCR, alttipleme, immunfloresan test

ABSTRACT

Molecular Epidemiology of Influenza A virus Infections

Influenza is an acute respiratory disease caused by influenza viruses. Influenza virus infections are associated with high morbidity and may lead serious complications such as pneumonia. The aim of this study was to determine the incidence of influenza type A and B virus infections and influenza A virus subtypes in hospitalized patients with respiratory tract infections by real-time RT-PCR test, conventional RT-PCR test and direct immunofluorescence antibody (DFA) test. Nasopharyngeal swab specimens were collected from a total of 476 patients by using flocked swabs (Copan Diagnostics, Italy) between 1 April 2012 and 31 December 2013. Influenza A virus was detected in 20.5% (98/476) of cases and influenza B virus in 3.3% (16/476) by real-time RT-PCR test (Sacace, Italy). During the study period, 63.3% of 98 influenza virus isolates was found to be A(H1N1)pdm09 and 36.7% was A(H3N2). Influenza A (H1N1)pdm09 subtype was observed to be predominant (12 cases) in January 2013 and A(H3N2) (11 cases) in December 2013. Compared to real-time RT-PCR test, the sensitivities of DFA test (Argene SA, France) for influenza A and B and conventional RT-PCR test with WHO primers (M30F2/08 and M264R3/08) for influenza A were 72.4%, 75%, 96% and the specificities were 99.2%, 99.5% and 100%, respectively. In conclusion, influenza A virus infection was detected rather high with a rate of 20.5% in the study group. The monitoring of influenza virus types and subtypes is necessary to evaluate the match between influenza vaccine strains and circulating influenza viruses and to identify subtypes with pandemic potential. It is recommended to use real-time RT-PCR test for the early diagnosis of influenza virus infections to take effective prevention and control measures in time, to reduce unnecessary antibiotic use and to start antiviral treatment.

Key Words: Influenza type A virus, influenza type B virus, real-time RT-PCR, subtyping, immunofluorescence test

1. GİRİŞ

İnfluenza virus, influenza (grip) denilen akut solunum yolu hastalığının etkenidir. Grip insanlarda kendi kendini sınırlayan üst solunum yolu enfeksiyonundan pulmoner komplikasyonlarla seyreden fulminan hastalığa kadar değişen bir klinik spektruma sahiptir. İnfluenza virusunun önemli özelliği epidemi ve pandemiler oluşturmaktır. Mevsimsel influenza önemli morbidite ve mortalite sebebidir. Her yıl populasyonun genellikle %5-20'si influenza virus ile enfekte olur. İnfluenza okul ve iş gücü kaybının yüksek olması, tedavi ve hospitalizasyon giderleri ile major sosyal ve ekonomik kayba yol açar. Zanamivir ve oseltamivir gibi antiviral ilaçlar influenzanın önlenmesi veya tedavisi için önerilir, ancak aşılama primer kontrol stratejisidir. İnfluenzaya karşı korunmada en etkili yöntem aşıdır. Ülkemizde uygulanan influenza aşısı inaktif olup üç viral suşa karşı antijenler içeren trivalan influenza aşısıdır. Trivalan influenza aşısı (2013-2014), influenza A(H3N2), A(H1N1)pdm09 ve influenza B gibi 3 farklı influenza virusuna karşı koruma sağlar. Her yıl aşılar yaygın olması en muhtemel suşları yansıtacak şekilde modifiye edilerek değiştirilir⁽¹⁾.

İnfluenza virus, Orthomyxoviridae ailesine ait, 80-120 nm çapında, negatif polariteli tek sarmallı RNA virusudur. Nükleokapsid ve matriks proteinlerine göre influenza A, B ve C virus olmak üzere üç tipe ayrılır. Tip A influenza virusları üç influenza tipi arasında en virülen olanıdır. İnfluenza A viruslarının yüzey glikoproteinleri hemagglutinin (HA) ve nöraminidaza (NA) göre bilinen 16 H ve 9 N alttipi vardır. İnfluenza tip A virusunun geniş konak dağılımı vardır ve segmentli genom yapısı reassortment ile yeni influenza alttiplerinin sentezine olanak verir. Böylece HA ve NA proteinlerinin birçok farklı kombinasyonları mümkündür. Buna karşılık şimdilik dünyada insanlar arasında en yaygın dolaşan influenza A virus alttipleri pandemik A(H1N1) ve A(H3N2)'dir. Yeni bir avian influenza A(H7N9) virus alttipinin ilk kez 2013 yılı Mart ayında Çin'de insanları enfekte ettiği bildirilmiştir. Çin'de H7N9 virusu ile enfekte vakaların sayısının 30 Haziran 2013 tarihi itibarıyla, 132'ye, hayatını

kaybedenlerin sayısının ise 44'e ulaştığı rapor edilmiştir. A(H7N9) virusunun pandemiye sebep olma ihtimali büyük endişe yaratmıştır. İnfluenza viruslarının alttiplemesinin yapılması toplumda dolaşan suşları izlemek, influenzanın yayılımını ve ciddiyetini izlemek, dolaşan suşların karakterizasyonu ile yıllık aşının formülasyonu ve pandemik potansiyeli olan suşların tanınması yönünden önemlidir. Ancak alttipleme ciddi hastalığı olanlar, influenza ile ilişkili hastalıktan kaybedilenler, influenzaya bağlı komplikasyonlar için yüksek riskte olan hastalar ve epidemiyolojik amaçlar için özellikle indikedir^(2,3).

Gribin etkeni olan influenza virus her yıl dünyada 250000-500000 kişinin ölümüyle sonuçlanan mevsimsel epidemilere sebep olmasının yanı sıra pandemiler oluşturması sebebiyle de insan sağlığı için son derece önemli bir virustur. İnfluenza, soğuk algınlığı gibi diğer solunum yolu enfeksiyonlarının aksine, pek çok insanda ciddi hastalık ve hayatı tehdit eden pulmoner komplikasyonlara sebep olur. Bütün yaş grupları influenzaya duyarlı olmakla birlikte, küçük çocuklar, ileri yaşta olanlar, kalp hastalığı, akciğer hastalığı, böbrek hastalığı, şeker hastalığı gibi kronik hastalığı olanlar ve immun sistemi baskılanmış kişilerde influenza virus enfeksiyonlarından kaynaklanan komplikasyonlar ve ölüm riski daha yüksektir. İnfluenza enfeksiyonun komplikasyonları sekonder bakteriyel pnömoni ve altta yatan kronik hastalıkların alevlenmesi, otitis media, ensefalit, ensefalopati, transvers miyelit, miyozit, miyokardit, perikardit ve Reye sendromudur. İnfluenzanın en önemli komplikasyonu, ölümcül olabilen influenza virusuna bağlı primer viral pnömoni veya sekonder bakteriyel pnömonidir^(4,5,6).

Bu çalışmanın amacı solunum yolu enfeksiyonu olan hastalarda real-time revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyon testi (Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction; RT-PCR), konvansiyonel RT-PCR ve direk immunfloresan antikor (Direct immunofluorescence Antibody; DFA) testi ile influenza tip A ve B virus enfeksiyonlarının insidansı ve influenza A virus alttiplerini tespit etmektir.

2. GENEL BİLGİLER

İnfluenza bütün dünyada yaptığı salgınlar sebebiyle yüzyıllardır önemini korumaktadır. İnfluenza virusu her yıl 3-5 milyon vakadan sorumludur ve 250000-500000 kadarı ölümle sonuçlanır. İnfluenza, İtalyanca “etki” anlamına gelen “İnfluenza” kelimesi olup Latince “influentia” kelimesinden gelir. Başlangıçta hastalığın yıldızların olumsuz etkisinden “influence of stars” kaynaklandığına inanılırdı. Daha sonra ise tıp alanındaki düşüncelerin değişmesiyle hastalığın sebebinin, “soğukun etkisi” anlamındaki İtalyanca “influenza del freddo” olduğu kabul edildi. Grip kelimesi ise Fransızca “grippe” ve Frenkçe “kapmak” anlamındaki “gripan” kelimesinden gelir. Grip benzeri hastalık ilk kez Hipokrat tarafından M.Ö. 412 yılında tanımlanmıştır. İlk bilinen grip pandemisi ise 1580 yılında yaşanmıştır ve o zamandan beri 31 influenza pandemisi kaydedilmiştir. En büyük üç pandemi 20. yüzyılda görülmüştür. İnfluenza A virusunun H1N1 alttipi 1918’de “İspanyol gribi” denilen ve milyonlarca ölüme sebep olan pandemiyi meydana getirmiştir. Bu viruslar A/H2N2 alttipinin sebep olduğu 1957’deki “Asya gribi” pandemisine kadar sürmüştür ve bu virus diğeri ile yer değiştirmiştir. H2N2 alttipinin yerini 10 yıl sonra 1968’de Hong Kong pandemisinden sorumlu H3N2 almıştır. İnfluenza A’nın alttipi olan H1N1 1977’de yine büyük pandemi sebebi olarak tanımlanmıştır. Yirmibirinci yüzyılın ilk pandemisine 2009’da, A/H1N1 alttipi neden olmuştur ve domuz orijinlidir. Sporadik olarak hayvandan insana bulaşan H5N1, H7N7 ve H9N2 gibi değişik diğer alttipler tanımlanmıştır. Özellikle yüksek patojeniteye sahip Avian influenza virusunun H5N1 alttipi %60 gibi yüksek oranda mortaliteye sahiptir. Bilindiği gibi 1997 yılından beri Güney Doğu Asya’da ve 2005 yılında ülkemizde de görülen H5N1 enfeksiyonları pandemiye dönüşmemiştir. İnfluenza A virusunun H1N1 ve H3N2 alttipleri ile influenza B virusu ise epidemilerden sorumlu mevsimsel grip etkenleridir^(1, 2, 3,7).

2.1. Virusun Yapısı

İnfluenza A virusu orthomyxoviridae ailesine ait bir virustur. Zarflı, genomu tek sarmallı, negatif polariteli ve segmentli bir RNA virusudur. İnfluenza A viruslarının 8 segmenti hemagglutinin (HA), nöraminidaz (NA), matriks 1 (M1), Matriks 2 (M2), nükleoprotein (NP), yapısal olmayan protein-1(nonstructural protein-1;NSP-1), yapısal olmayan protein -2 (NSP-2; Nükleer eksport proteini; NEP olarak da bilinir), polimeraz asidik protein (PA), polimeraz bazik protein -1 (PB) ve polimeraz bazik protein 1-F2(PB1-F2) ve polimeraz bazik protein -2 (PB2) olmak üzere 11 viral protein kodlar.

İnfluenza virusunun zarfı lipid bir tabaka ve bu tabakaya gömülmüş transmembran proteinler HA, NA ve M2'den meydana gelir. Bu lipid tabaka konak hücre membranı kökenlidir ve kolesterolce zengin lipid zincirleri içerdiği bilinmektedir. HA lipid tabakada en çok bulunan zarf proteini olup oranı %80'dir, bunu takiben NA %17 oranında zarfta bulunmaktadır. M2 zarfta minör komponenttir, her virionda 16-20 molekül oranındadır⁽⁸⁾.

HA ve NA viral lipid membrandaki lipid tabaka ile ilişkilidir, buna karşın M2'nin böyle bir bağlantısı mevcut değildir. Viral lipid membranın hemen altında M1 proteini bulunmaktadır ki bu protein matriksi meydana getirip viral ribonükleoproteinleri (vRNP) tutar. VRNP'ler virus merkezlidir ve NP ile sarılı negatif segmentli viral RNA çok az miktarda NEP içerir. vRNP'lerin son kısmında 3 adet polimeraz (PB1, PB2 ve PA) bulunur, bunlar viral RNA polimeraz kompleksini meydana getirir. İnfluenza virusunun hayat siklusu konak hücreye giriş, vRNP'lerin nuklusa geçişi, transkripsiyon ve replikasyon, vRNP'lerin nukleusa eksportu ve konak hücre membranından salınımı ile gerçekleşir⁽⁹⁾.

2.2. Viral Proteinlerin Genel Özellikleri

İnfluenza A virusunun 8 RNA segmenti 11 protein kodlamaktadır, bunlara polimeraz proteinleri (PB1, PB2, PA, PB1-F2), nükleokapsid proteinleri, hemagglutinin,

nöraminidaz, matriks proteinleri (M1, M2) ve yapısal olmayan proteinler (NS1, NS2) dahildir. Hemaglutinin ve nöraminidaz majör antijenik determinantlardır ve alt sınıflandırmada kriter kabul edilirler. İnfluenza A virusunun 16 Hemaglutinin (H1-H16) ve 9 nöraminidaz (N1-N9) alttipi mevcuttur, hemaglutinin konak hücre membranına virusun bağlanmasından sorumludur, bunu sialik asit rezidülerine bağlanarak yapar, hemaglutinin ayrıca koruyucu humoral immunitede nötralize edici antikorların ana hedefidir. Hemaglutinin hücre membranında var olan sialik asit rezidülerine bağlanma affinitesi farklı influenza A alttiplerinin konağa spesifitesini belirler. İnsan virusları galaktoza alfa 2,6 bağlantılı sialik asit rezidülerine bağlanırlar ki bu insan solunum yolu epitel hücrelerinde mevcuttur bunun yanı sıra; özellikle avian viruslarının ördek intestinal epitelinde var olan alfa 2,3 bağlantısına bağlanma eğilimleri vardır⁽¹⁰⁾.

Farklı reseptörlere spesifik bağlanma özelliği insan ve avian arasındaki tür bariyerini göstermektedir. Domuz trake epitelyumunda alfa 2,3 ve alfa 2,6 bağlantılarının bulunması bu konakta koenfeksiyonların olması ile yeni viral alttiplerin oluşmasına muazzam ortam sağlamaktadır. Tavukların benzer rolü mevcuttur, intestinal ve akciğer hücrelerinde her iki tip bağlantı mevcuttur. İnsan respiratuvar epitelinde alfa 2,3 ve alfa 2,6 bağlantıları silialı ve silia olmayan hücrelerde mevcuttur, bu durum avian virusları ile insanların enfekte olmasını mümkün kılmaktadır⁽¹¹⁾.

H5 proteinin bir aminoasitinin değişmesi A/H5N1 viruslarının reseptöre bağlanma affinitesini tamamen değiştirir, dolayısıyla tür içi enfeksiyonlarda ki bariyerin üstesinden kolaylıkla gelinebilir. Nöraminidaz virusların konak hücreden çıkışını sialik asit rezidülerindeki glikozid bağlantılarını keserek sağlar, aynı zamanda nöraminidaz inhibitörleri için hedeftir. A/H5N1’de varolan nöraminidazdaki 274. pozisyondaki histidin-tirozin mutasyonu oseltamivir’e direnç sağlamakta, fakat zanamivir’de ise direnç görülmemektedir, bu durum Vietnam’da kadınlarından elde edilen izolatlarda klinik olarak kanıtlanmıştır.

M2 iyon kanalı pH bağımlı matriks proteinlerinin nükleokapsitten kopması için elzemdir, aynı zamanda trans-golgi ağında hemaglutinin maturasyonu içinde bu kanal gereklidir. M2 iyon kanallarını bloke etmek için amantidine ve rimantidine kullanılır. M2’de 31. rezidüde meydana gelen serin-asparjin mutasyonu adamantenlere karşı

direnci beraberinde getirmektedir. Bu durum 2003'den beri Doğu Asya'da sirküle olan en son A/H5N1 izolatlarında gözlemlenmiştir. PB1-F2 konak mitokondrisinde hücrel apoptozisi tetikler. Hemaglutinin ve PB2 proteinleri konak spesifitesi ve virulans açısından belirleyici öneme sahiptir⁽¹²⁾.

2.2.1. Antijenik Shift ve Antijenik Drift

İnfluenza viruslarının diğer bir önemli özelliği antijenik shift veya drift yoluyla antijenik varyasyon kazanmalarıdır. Antijenik drift hemaglutinin veya nöraminidazda minör düzeyde alterasyonlara neden olur. Bunun tekrarlanması konak immunitésinin baskılanması ve niçin her yıl farklı insan influenza aşısı kompozisyonlarına ihtiyacı açıklamaktadır.

Antijenik shift 8 gen segmentinde meydana gelen genetik reassortment yoluyla yeni hemaglutinin/nöraminidaz kombinasyonlarının ortaya çıkmasına neden olur ve insan popülasyonu bu yeni kombinasyonlara karşı ya çok az ya da hiç immüniteye sahip değildir. Şayet bu tip influenza suşlarının insandan insan transmisyonu yaygın olursa pandemi gelişmesi söz konusu olur. Son yüzyılda 1918-1919'da H1N1, 1957'de H2N2 ve 1968'de H1N2 suşları majör pandemilere sebep olmuştur.

2.3.Virusun Yaşam Siklusu

Orthomyxoviridae ailesinden olan influenza virusları zarflı olup negatif sarmallı RNA viruslarıdır, segmentli genomu sahiptirler ve segment sayıları 7 ile 8 arasında değişmektedir. İnfluenza virusu matriks veya nükleoprotein antijenlerine göre A, B ve C olmak üzere üç tipe ayrılır ve her tip konak hücre ve patojenite açısından farklı özellik gösterir. Tip B ve C virusları çoğunlukla insanlardan izole edilir. Bunun yanı

sıra influenza B virusları su samurlarından, influenza C virusları ise domuz ve köpeklerden izole edilebilmektedir. İnfluenza A viruslarının ise konak dağılımı geniş olup insanların yanı sıra kuşlar, domuz, atlar ve diğer memeliler sıcakkanlı hayvanların çoğunluğunu enfekte edebilir. Avian influenza virusları için akuatik kuşlar doğal rezervuardır, bilinen tüm influenza A virus suşları için ve insanlarda pandemiye neden olan influenza suşları için de doğal kaynaklardır. İnfluenza A viruslarının gruplandırılması hemaglutinin antijenik karakterizasyonu ve nöraminidaz yüzey glikoproteininin farklılığı ile yapılır. Bilinen 19 HA ve 9 NA alttipi mevcuttur.

İnfluenza viruslarının nomenklatürü üzerine rehber Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından yayınlanmıştır. Buna göre; önce virus tipi (A, B, C), sonrasında konak (şayet insan değilse), izole edildiği yer ve izolasyon yılı belirtilir. İnfluenza A için, HA (H1-H16) ve N (N1-N9) parantez içerisinde belirtilmelidir. Örneğin; Amerika’da 2006-2007 yılına yönelik üretilen trivalan aşıda A/New Celidonia/20/1999(H1N1) benzeri, A/Wisconsin/67/2005(H3N2) benzeri ve B/Malaysia/2506/2004 benzeri suşlar bulunur. H1N1 1918 pandemisini meydana getiren suşudur, 1957’ye kadar insanlarda sirküle olmuştur ve sonra H2N2 virusu ile yer değiştirmiştir. H2N2 ise 1968’e kadar sirküle olmuştur, ardından yerini H3N2 virusuna bırakmıştır. H1N1 1957 den sonra 1977’de tekrar görülmüştür ve o zamandan beri influenza A alttipi H3N2 ve H1N1 birlikte insanlarda sirküle olmuştur.

İnfluenza A ve B’nin benzer yapıları vardır, buna karşın İnfluenza C çok farklıdır. A ve B tipleri 8 genetik segment taşırlar, bunların her biri en azından 1 protein kodlarlar. Virusun yüzeyi HA, NA ve matriks proteinleri olmak üzere 3 protein ile kaplıdır. İnfluenza C virusları 7 segment taşır ve bir yüzey glikoproteini mevcuttur. Her bir influenza RNA segmenti nükleoproteinle enkapside edilmiştir. İnfluenza viruslarında replikasyon boyunca nokta mutasyonlar birikir, çünkü sahip oldukları RNA polimerazın doğru okuma aktivitesi mevcut değildir. İnfluenza virus genlerinin yüksek mutasyon oranlarına sahip olması bu yüzey glikoproteinlerinin antijenik yapısında aminoasit değişimlerini tetikler ve viral suşlar için selektif avantajlar sağlar ki bunlardan en önemlisi önceden gelişmiş immun cevaptan kaçmaktır. HA molekülü konak hücredeki spesifik reseptöre bağlanarak enfeksiyonun ilk adımını atar. HA’ya karşı üretilen antikorlar HA’ya bağlanır ve böylece HA-ligan reaksiyonu bloke olur,

dolayısıyla aynı suşla enfeksiyonunun önüne geçilebilir. HA ve NA daha önce kazanılmış immuniteden kaçabilmektedirler, bunu (a); antijenik drift yoluyla antikor bağlanmasını engelleyerek ya da sınırlayarak, (b); antijenik shift yoluyla yani influenza A'nın iki alttipi arasında genetik reassortment yoluyla yeni HA molekülünün ortaya çıkması ile gerçekleştirirler. Vahşi kuşlarda 16 HA tipi bilinmektedir ve insan influenza virusları için de kaynaklık ederler. Antijenik shift sonucu oluşan hiç bilinmeyen bir alttiple influenza suşunun insanlarda sirküle olması iki influenza pandemisine sebebi olmuştur. Her iki pandemi de (1957 ve 1968), daha önce sirküle olan influenza virusuna tanımlanmayan avian veya avian benzeri virusdan HA importe olmuştur. Pandeminin gerçekleşmesi için kesin gerekli olan olgu HA'nın değişimi olarak bilinmektedir. Sirküle olan H1N1 suşundan 3 gen HA, NA ve PB1' in alt ünitesi avian benzeri genlerle yer değiştirmiştir. Yine 1968'de HA ve PB1 genleri benzer şekilde yer değiştirmiştir. Viral arkeoloji çalışmalarında 1918'de pandemi yapan virusun komple sekansı çıkarılmış ve gerekli olan biyopsi materyalleri 1918 kurbanlarının akciğer dokularından alınmıştır. Böylece 1918 influenza pandemisine neden olan virusun avian benzeri genoma sahip olduğu ve 1957-1968 viruslarına benzemediği gösterilmiştir⁽¹³⁾.

İnfluenza pandemisinin gerçekleşmesi için antijenik olarak farklı HA alttipi gerekli ise de, hayvan kökenli yeni HA alttipi taşıyan ve insanlarda enfeksiyon meydana getiren virusların kişiden kişiye geçişi verimli şekilde olmadığı için pandemi yapamadıkları bilinmektedir, dolayısıyla pandemik suşun ortaya çıkması için reassortment veya tüm genomun insana adaptasyonunun olması gerekmektedir. Örneğin; 1976'da Fort Dix, New Jersey'de birkaç askerin domuz kökenli H1N1 suşuna maruz kalması bir askerin ölümüyle sonuçlanmıştır.

HPAI H1N7 (yüksek patojeniteli avian influenza; highly pathogenic avian influenza; HPAI) 2003'de epizootik olarak Hollanda'da yayılım göstermiş, 86 çiftlik çalışanı ve 3 kişide grip belirtileri ile konjuktivit gelişmiştir. Benzer şekilde, Kanada'da 2004'de HPAI H7N3 salgınında iki kişide konjuktivit gelişmiştir. HPAI H5N1 2003'de tekrar epizootik formda yayılım göstermiştir. Bu virusun insanlara adaptasyonunun pandemilere neden olacağı yaygın kanı olarak düşünülmüştür. Nisan 2007'de, 291 konfirme H5N1 vakası tespit edilmiştir, 172'si fataldır, oranı %59'dur. H5N1 pandemisinde virusun bulaşması sadece enfekte kümes hayvanları ve insanlar arasında

değil insandan insanana da bulaşmanın mümkün olacağı belirlenmiştir. Her ne kadar epidemiyolojik veriler sınırlı ise de özellikle aynı aile bireyleri arasında H5N1'in kişiden kişiye bulaşı mümkün görülmektedir. Pandemiler arasında en çok ölüme neden olarak 1918 pandemisi kayıtlara geçmiştir. Bir çok toplumda morbidite %25-40 arasındadır ve yaşa spesifik morbidite diğer pandemilerle aynıdır, 15 yaşın altındaki çocuklarda enfeksiyon oranı en yüksektir. Klinik olarak 1918 influenza pandemisi semptomlar yönüyle diğer yıllarda gerçekleşen pandemilere benzemektedir, patolojik olarak da benzerlik mevcuttur.

Bunun yanı sıra, 1918 pandemisi birçok klinik ve epidemiyolojik yönden diğerlerinden ayrılmaktadır. Vakaların çoğunluğunda yaygın pnömoni komplikasyonları mevcuttur. Sonuç olarak, Amerika'da mortalite oranı %2.5 olup şimdiki orana nazaran oldukça yüksektir. Dahada fazlası, 1918 pandemisinde en çok etkilenen yaş grupları 20-40 yaş arası olup mortalite oranı genç yaşta oldukça yüksektir ve bu alışlagelmiş verilerin dışındadır. Ayrıca 1918'deki pandemide 65 ve üzeri yaşların %99'unda ölüm meydana gelmiştir. Aksine, 1957 ve 1968'deki pandemilerde 65 ve altı yaşlarda ölüm oranı sırasıyla %36 ve %48'dir.

HA homotrimer yapıda olup viral lipid zarfda bulunur. HA konak hücre zarının üzerinde bulunan sialik asit rezidülerine bağlanır. HA prekürsörü olan HA0, iki alt üiteden meydana gelir. HA1, reseptör bağlayan domain olup HA2 ise füzyon peptidleri içerir. Bu alt üiteler birbirlerine disülfid bağları ile bağlanırlar. Glikoproteinlerin yapısındaki galaktoz ile sialik asit arasında başlıca iki bağlantı alfa(2,3) veya alfa(2,6) bulunur. Bunlar HA moleküllerinin farklı türlerde bulunan sialik asit reseptörlerine bağlanması açısından oldukça önemlidir⁽¹⁴⁾.

İnsanlarda enfeksiyon nedeni olan viruslar alfa (2,6) reseptörüne bağlanır, avian viruslar ise alfa (2,3) reseptörünü kullanırlar. Domuzlarda ise her ikisine de tutulum gerçekleşir, dolayısıyla avian ve insan influenza suşlarının karışımı için uygun konaktır, bu yolla yüksek patojenitede virusların üremesi çok kolaydır.

Konak hücrenin sialik asit rezidülerine virusun bağlanması ile reseptör aracılı endositozis olur ve virus endozoma girer. Endozomun pH değeri 5-6 civarındadır, viral ve endozomal membranlar arası füzyon söz konusudur. Düşük pH HA0'da

konformasyonel değişimlere neden olur, böylece HA1'in reseptör bağlayan bölgesinin aktifleşmesi sağlanır, HA2 füzyon peptidi de açığa çıkar ve bu füzyon proteininin endozomal membranın içine yerleşmesiyle viral ve endozomal membranın birbiri ile bağlantısı sağlanmış olur. Endozomun asidik çevresi HA0'ın konformasyonunu indüklemeye önemli role sahip olmasının yanı sıra viral ve endozomal membranların füzyonunda da önemlidir, aynı zamanda M2 iyon kanallarının açılmasında da öneme sahiptir. M2 proteini tip 3 transmembran proteini olup tetramer formdadır, proton seçici iyon kanalı görevi görür. M2 iyon kanallarının açılması viral merkezi ("core") asidikleştirir. Virionun içindeki bu asidik ortam vRNP'lerin serbestleşmesine ve böylece konak hücre stoplazmasına giriş olur⁽¹⁵⁾.

2.3.1. vRNP'lerin Nukleusa Giriş

İnfluenzanın viral transkripsiyonu ve replikasyonu nukleusta gerçekleşir, bu yüzden stoplazmaya serbest bırakıldıktan sonra, vRNP nukleusa girmek zorundadır. vRNP'yi meydana getiren proteinler; NP, PA, PB1 ve PB2'dir. Bütün bu proteinler nükleer lokalizasyon sinyali taşımakta olup bu sayede hücresel nükleer import makinasına bağlanırlar ve böylece nukleusa giriş gerçekleşir. İmportin alfa ve beta gibi proteinler vRNP'nin nukleusa taşınmasında önemli role sahiptirler⁽¹⁶⁾.

2.3.2. Viral Genomun Transkripsiyonu ve Replikasyonu

İnfluenza viral genomu negatif polariteli RNA'dan meydana gelmiştir, transkripsiyonun sıralı gerçekleşmesi için öncelikle pozitif polariteli RNA'nın oluşması gerekir ki bu viral RNA'nın üretimi için kalıp görevi görür. Genomun replikasyonunda primer ihtiyacı söz konusu değildir, bunun yerine, viral RNA bağımlı RNA polimeraz

(RNA dependent RNA polymerase; RdRp) RNA sentezini başlatır. Ancak viral genomun replikasyonunun tam mekanizması anlaşılmış değildir.

İnfluenza A virusu sadece 11 protein kodlar ve bu proteinler konak hücre mekanizmalarının virus tarafından kullanılması için gerekli tüm yolların sağlaması için yeterlidir. Viral transkripsiyonu sağlamak için virus konağın kendi transkripsiyon faktörlerini eşsiz bir mekanizma ile kendi lehine çevirmektedir. Olgun hücre messenger RNA'sı 5' metillenmiş kep ("cap") ve poli A kuyruğu taşımaktadır, ancak vRNP'de poli A kuyruğu mevcut olup 5' kep mevcut değildir⁽¹⁷⁾.

Hücrel RNA polimeraz II (pol II) DNA'ya bağlanır ve transkripsiyon başlar. Transkripsiyonun başlaması ile birlikte, pol II'nin C-terminali tekrar eden domain'inde serin 5 fosforile olur, böylece hücrel kep sentez kompleksi kurulur. İnfluenza RdRp öncelikle pol II'nin bu formuna bağlanır ki bu "cap snatching" ("kepi yakalama") olarak bilinir. Segment 7 ve 8 splicing'de (kesip ekleme) görev alan iki proteini kodlar, segment 7; M1 ve M2'yi kodlar, segment 8 NS1 ve NEP kodlaması yapar. M2 ve NEP "splice" (birleştirilmiş) ürünlerdir, NS1 ve M1'e göre daha az miktarda bulunurlar. Virus bu proteinleri eksprese etmek için konağın "splice" mekanizmasını kullanır. Virus konağın mRNA "splicing" mekanizmasını tamamen durdurur, bunun için NS1, U6 small (küçük) nükleer RNA ve diğer "splicing" komponentlere bağlanır ve onları tekrar infekte hücrenin nukleusuna gönderir.

Viral RNA'nın poliadenilasyonu tam anlaşılmış değildir. Hücrel mRNA'ların poliadenilasyonu, poliadenilasyon sinyalinin (AAUAAA) kesilmesi ve poliadenilasyon spesifik faktör (cleavage and polyadenylation specific factor; CPSF) ve poli(A) kuyruğunun 3' ucuna bağlanması ile olur. Viral mRNA'da bu sekanslar mevcut değildir, bunun yerine RdRp viral RNA'nın 5' ucuna bağlanır ve böylece viral RNA'nın sentezi blokaj yolu ile sağlanmış olur⁽¹⁸⁾.

2.3.3. vRNP'lerin Nukleusa Eksportu

Sadece negatif polariteli vRNP'lerin nukleustan eksporte edildikleri bilinmektedir. vRNP'lerin nukleer eksport proteini olan CRM1'e (chromosome region maintenance 1) bağımlı olarak nukleer porlardan eksportu söz konusudur. NP'lerin CRM1 ile direkt ilişki geliştirdikleri bilinmektedir, ancak GTP (guanozin trifosfat) hidrolizi belirlenememiştir. M1 proteinlerinin vRNP ile C-terminal ucundan ilişki geliştirdikleri bilinmektedir. Proteinin N-terminal kısmı nukleer lokalizasyon sinyali taşır ve vRNP'lerin importunda önemli role sahiptir. M1 proteininin N-terminal kısmı NEP'e (nukleer eksport protein) bağlanır ve bu yolla nukleer lokalizasyon sinyalini maskeler. NEP ayrıca CRM1'e bağlanır ve bu kompleks GTP hidrolizi yolu ile eksport edilir. Bu yüzden M1'in negatif polariteli vRNP'ye bağlandığı ve aynı zamanda NEP'e de bağlandığı hipotez olarak sunulmuştur. Dönüşte ise NEP CRM1'e bağlanmakta ve vRNP'ler nukleusun dışına bu yolla eksporte edilmektedir^(18,19).

2.3.4. Virus Montajı ve Konak Hücreden Serbest Bırakılma

Zarflı virus olmalarından dolayı konak hücre membranını kullanırlar, viral partikül formunu alırlar ve direkt komşu hücreleri enfekte ederler. Sadece birkaç vRNP ihtiva eden viral partikül formlarına rastlamak mümkündür, fakat normalde viral partikülde mutlaka HA, NA ve M2 proteinleri bulunmaktadır.

Viral partiküller polarize olmuş hücre membranının apikal bölgesinden ayrılırlar, bunun sebebi HA, NA ve M2 proteinlerinin apikal bölgeye taşınması ile ilgilidir. Delesyon ve mutasyon analizlerine dayalı olarak M2 kuyruk bölgesinin viral partikül oluşmasında önemli role sahip olduğu ortaya çıkarılmıştır. M1 proteini lipid tabakanın hemen altında bulunur ve viral partikülün montajı ve plazma membranından tomurcuklanmada öneme sahiptir. Viral genetik segmentin virion formatına paketlenmesine yönelik iki hipotez öne sürülmüştür; birincisi, gelişigüzel paketlenme modeli, oysaki son olarak virionu meydana getiren segmentlerin bir çeşit paketlenme

sinyali taşıdıkları ve bu sinyalin bazı viral segmentlerin kodlanmayan 5' ve 3' bölgelerinde ve kodlanan bölgelerinde mevcut olduğu tespit edilmiştir⁽²⁰⁾.

Viral partiküllerin plazma membranından ayrılmadan önceki önemli adımlardan biri sialik asit rezidülerinin glikoproteinlerden ve glikolipidlerden kesilerek ayrılmasıdır. NA, sialik asitlerden ayrılır ve bu proses gerçekleşmezse viral partiküller plazma membranından ayrılamazlar^(20,21).

2.4. İnfluenza Virus Enfeksiyonlarının Patolojisi

İnfluenza virusları üst solunum yolu enfeksiyonlarının başlıca sorumlusudur ve yüksek mortalite ve morbidite sebebiyle dikkat çekicidir. Ortaçağlardan beri influenza salgınları düzensiz aralıklarla gerçekleşmektedir. Yaşlılarda, infantlarda ve kronik hastalığı olanlarda influenza yüksek mortaliteye sebep olmaktadır.

Yıllık kış salgınları dışında da influenza enfeksiyonları görülebilir. Tek bir pandemik yılda popülasyonun %50'si enfekte olabilir ve influenza nedeniyle gerçekleşen ölümler beklenen sayının üstünde olabilir. Dünya'da görülen önemli pandemiler; 1889, 1918, 1957 ve 1968'de gerçekleşmiştir. Amerika'da 1957 pandemisi 66.000 ölüme sebep olmuştur. En kötü geçen pandemi 1918 pandemisi olarak tarihe kaydedilmiş olup Amerika'da 675.000 ölüme neden olmuştur. Dünya genelinde ise 40 milyon insan ölmüştür. İnfluenza B virusu ise periyodik olarak büyük epidemilere neden olmakta, fakat pandemi gerçekleştirememektedir. İnfluenza C virusları ise endemik ve sporadik orta şiddette hastalığa neden olmaktadır.

İnfluenza A virusunun histopatolojik spektrumu değişkendir. Çünkü patoloji çalışmaları genelde otopsi materyali ile yapılmaktadır, influenza virus enfeksiyonu sonrası patojenik değişiklikler geniş spektruma sahiptir, değişkenlik klinik tablo ve ölüm öncesi hastalığın süresi ile ilişkilidir. Koenfeksiyon şeklinde veya sekonder bakteriyel pnömoninin gerçekleşmesi influenza enfeksiyonu ile birlikte mümkündür,

böylesi bir durumda komplike histopatolojik görünüm farklılık kazanmaktadır. Görülen patolojik değişimlerin spektrumu pandemiden pandemiye fark etmekte veya intrapandemik yıllarda çok az değişiklik göstermektedir. Yüksek fatalite oranı ve ölümlerin alışıla gelmemiş yaş dağılımı 1918 pandemisinde gözlemlenmiştir. Birçok genç yetişkin 1918'de fatal influenza enfeksiyonuna maruz kalmış, tersine yaşlılarda beklenenden az fatalite oranı gözlemlenmiştir. Geçen iki pandemide ve özellikle intrapandemik mevsimsel influenza vakalarında, fatal durum kronik hastalığı olanlarda veya ileri yaş gruplarında daha fazladır⁽²²⁾.

Yüksek patojeniteye sahip avian influenza viruslarından HPAI H5N1'in neden olduğu influenza pandemilerinin bir diğer geçen pandemiyle patolojik ilişkisi değerlendirilmelidir. Ne yazık ki, H5N1 enfeksiyonundan ölen ve otopsi değerlendirilmesi yapılan rapora sahip çok az sayıda vaka mevcuttur. Her ne kadar tipik influenza patolojisi bu otopsi materyallerinde gözlemlense de ek patoloji çalışmaları gerekmektedir. H5N1 influenza virus enfeksiyonlarının patogenezinde özellikle eşsiz hipersitokinemi gözlemlenmektedir. Elde var olan veriler ayrıca H5N1 virusunun respiratuvar yol dışında da replike olduğunu göstermektedir. H5N1 viral enfeksiyonlarının neden olduğu patoloji ve patogenezin enfeksiyonun doğal seyrinin iyi anlaşılması özellikle önemli sorulara cevap bulmak için şarttır, bunun için otopsi çalışmalarına ihtiyaç söz konusudur⁽²³⁾.

İnfluenza virusları solunum yolu epitelyum hücrelerinde replike olur. Enfekte insanların üst ve alt solunum yolundan izole edilebilirler. Histolojik değişikliklerin spesifik olmaması sebebiyle histolojik analiz spesifik tanı için yeterli değildir. Tanı viral izolasyon, RT-PCR, serolojik testler, in-situ hibridizasyon veya biyopsi veya otopsi dokularının immunhistokimyasal tekniklerle konfirme edilmesi ile sağlanır.

İspanya gribi (Spanish Flu) adı verilen 1918 pandemisini gerçekleştiren influenza enfeksiyonu ile başlayan ilk patolojik çalışmalarda üst solunum yolu epitelyum hücrelerinin trakebronşit ve farenjit ile uyumlu değişiklikler gösterdiği kaydedilmiştir. Çok sayıdaki otopsi çalışması 1918 pandemisi ve sonrasındaki vakalarda yaygın trakeitin varlığını ortaya koymuştur. Winternitz ve çalışma arkadaşları, trakea, bronş ve pulmoner alveol epitelyumunun influenzanın

replikasyonunda primer bölge olduğunu açıkca ortaya koymuştur. Akut fazda, trake ve bronşların kolumnar epitelyumunda multifokal destrüksiyon ve deskuamasyon karakterizedir. Epitelyumun bazal bölgesi sıklıkla sağlam kalır. Ödem ve submukozada konjesyon belirgindir.

Üst solunum yolunda epitelyumda influenza virusunun neden olduğu erken yapısal değişiklikler değişkendir, başlangıçta vakuolizasyon ile karakterize sitonekroz, takibinde ise luminal boşluğa bu hücrelerin deskuamasyonu izler, nekrotik hücrelerin makrofajlar tarafından fagosit edilmesi söz konusudur. Epitelyumda meydana gelen bu yapısal değişiklikler düzensiz dağılım gösterir ve patolojik bölgeler ile histolojik olarak normal görünen alanları yan yana görmek olasıdır. Epitelyumun deskuamasyondan etkilenen bölgesi bazal membran üzerinde tek tabakalı yapı halini alır. Kalan epitelyumun tamamen seperasyonu histolojik artefakt meydana getirebilir. Enfeksiyonun erken evrelerinin bir özelliği de nötrofil infiltrasyonunun görülmemesi fakat epitel hücre nekrozunun görülmesidir, sonraki evrelerde mononükleer inflamatuvar hücreler bronş duvarına infiltre olur.

Küçük havayollarında meydana gelen değişimler ile büyük havayollarında meydana gelen değişimler aynıdır. Goodpasture 1919'da küçük ve orta büyüklükteki bronşiollerdeki patolojiyi tanımlamıştır. Vakaların çoğunda erken dönemde epitelyum eritematozdür ve daha sonra epitelyum nekrotik hale gelir. Bronşiol epitelyumun basit yapısından dolayı, büyük hava yollarına göre daha kolay düzleşir ve silili ve goblet hücreler dahil epitelyal tabakanın tamamen kaybı olabilir ve bu bölgede hiyalin membran formasyonunun görülmesi ile ilişkilidir. Bronşiol lumende nötrofilik eksudat gözlemlenebilir. İntersitityumda konjesyon, ödem ve inflamatuvar infiltrat gözlemlenebilir. Havayollarının ödem, fibrin ve nötrofille dolması mümkündür. Lucke ve arkadaşları genellikle ülserin eşlik ettiği deskuamatif bronşiolit varlığını rapor etmişlerdir. Submukozada kapiller konjesyon ve trombus yanısıra bronşial duvarında bazen tamamen nekrotik ve polimorfonükleer infiltratlar olduğu raporda yer almıştır. Yaygın değişiklikler tüm duvarın fokal epitelyal nekrozu, peribronşiol hemoraji ve pnömoni ile karakterizedir^(24,25,26).

İnfluenza virusunun sebep olduğu primer viral pnömonideki yaygın patolojik değişiklikler, kapiller ve küçük ven trombozu, interstisyel ödem, inflamatuvar infiltratlar, alveol ve alveolar kanallarda hiyalin membran formasyonu, değişen derecelerde intraalveolar ödem ve/veya hemoraji, nekrotizan bronşit ve bronşiolit, alveolar hasar, ilerleyen evrelerde alveolar yıkılım, fibrozis, epitelyum rejenerasyonu ve skuamoz metaplazi ile karakterizedir. Genellikle sekonder veya koenfeksiyon şeklinde bakteriyel pnömoni ile komplikedir. Bu tip vakalarda, alveollere nötrofillerin masif infiltrasyonu gözlenir, alveolar hemoraji ve ödem primer influenza virus pnömonisine nazaran daha az mevcuttur^(27,28).

2.5. Hastalığın Klinik Seyri

İnfluenza yüksek ateş, öksürük, burun akıntısı, baş ağrısı, boğaz ağrısı, halsizlik, ve bitkinlik ile karakterizedir. Hastalık genellikle 7-10 gün sürer. İnfluenza genellikle kış aylarında salgınlar veya epidemiler şeklinde görülür. Populasyonda tüm yaş grupları etkilenir, fakat prevalans özellikle okul çağındaki çocuklarda yüksektir, infantlarda hastalık yayılımı fazladır, yaşlılar ve kronik hastalarda da yayılım yüksektir. Krup (laringotrakeit) küçük çocuklarda ciddi bir komplikasyondur. İnfluenza A ve B virusları influenza benzeri hastalıkların yaygın sebebidir, ancak parainfluenza virus (PIV) ve respiratory syncytial virus (RSV) gibi diğer patojenler de influenza benzeri hastalıklara neden olabilmektedir.

Kronik pulmoner veya kardiyak hastalığı olan kişilerde veya diabetes mellitus olan vakalarda influenza A enfeksiyonu sonrası ciddi komplikasyonlar görülmektedir ki bunlara hemorajik bronşit, primer viral pnömoni veya sekonder bakteriyel pnömoni ve ölüm dahildir. Hemorajik bronşit ve pnömoni saatler içerisinde görülebilir. Fulminan fatal influenza pnömonisi nadiren meydana gelir ve dispne, siyanoz, hemoptizi, pulmoner ödem eşlik eder ve ölüm semptomların görülmesinden sonra 48 saat içerisinde olabilir⁽²⁴⁾.

2.6. İnfluenza Virus Enfeksiyonlarının Laboratuvar Tanısı

Antijenik yapısını değiştirmesi ile eşsiz özellikteki influenza virus, yıllık epidemilerin ve periyodik pandemilerin başlıca sebebidir. İnfluenza enfeksiyonu komplikasyonları viral ve bakteriyel pnömoni, akut respiratuvar distres sendromu, ensefalopati, miyokardit, perikardit ve miyozit şeklindedir. İnfluenza tip A için vahşi su kuşları doğal rezervuardır, 16 hemaglutinin ve 9 nöraminidaz alttipi mevcuttur. İnfluenza tip A ve B’de meydana gelen nokta mutasyonlar antijenik drift’e neden olur. Mevsimsel influenza nedeniyle mortalite oranı en yüksek gençlerde ve yaşlılardadır, ölümlerin %90’ı 65 yaş ve üzerinde görülür. Bu olgularla birlikte, yeni suşla meydana gelen ve populasyonun çok az veya hiç immuniteye sahip olmadığı pandemilerde, fatal vakaların neredeyse tamamı çok genç kişilerde meydana gelmektedir⁽²⁹⁾.

İnfluenzaya karşı en önemli savunma yıllık aşılanma ile sağlanmaktadır, her mevsim için aşılar baskın olacak suşlar dikkate alınarak önceden hazırlanmalıdır. Terapi için ise iki grup antiviral ilaç bulunmaktadır, adamantenler (amantadin ve rimantadin) ve nöraminidaz inhibitörleri (zanamivir ve oseltamivir). Antiviral terapiye maksimum etkinin oluşabilmesi için semptomların görülmesinden 24-48 saat sonra başlanmalıdır.

Yıllık aşıların hazırlanabilmesi için sirküle olan suşların izolasyonu ve identifikasyonu oldukça önemlidir. Ek olarak, hızlı influenza testleri gereksiz olan testlerin sayısını azaltmakta, akılcıl antiviral kullanımını sağlamakta ve gereksiz antibiyotik kullanımını engellemektedir. Mevsimsel influenza H1N1 suşunda meydana gelen nokta mutasyonlar 2008-2009 mevsiminde oseltamivir direncini meydana getirmiştir. İnfluenza A H1N1’i, H3N2’den ayırmaya yarayan hızlı tanı testleri, hastanede yatan vakalarda uygun antiviral terapinin uygulanmasını da sağlamaktadır.

Nisan 2009’da yeni H1N1 virusu Meksika’da ve Amerika’da ilk öncelikli görölmüştür takibinde Haziran ayında DSÖ bu suş ile salgını pandemi olarak nitelendirmiştir. Virölansı hakkında kesinlik olmamasından dolayı CDC (Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezi; Centers for Disease Control and Prevention; CDC) yeni H1N1 için mevsimsel influenzaya nazaran daha sıkı temas izolasyonu önermiştir. Dolayısıyla, alttip tespiti dahil influenza tanısı için güvenilir, doğru ve hızlı bir tanı testi

gerekir. İlk zamanlarda kültür tanı testi için kabul edilse de sonrasında vazgeçilmiştir, CDC bunun yerine moleküler test panelini geliştirmiştir^(30,31,32).

Testlerin performansı, influenza virusunda meydana gelen değişikler ve spesifik test metotlarındaki sınırlamalar ve hasta yaşından oldukça çok etkilenmektedir, örnek tipi, toplama zamanı, toplama metodu, eküvyon tipi, transport besiyeri, transport koşulları ve gecikmeleri de test performansını etkileyen faktörler arasındadır. Bunun yanı sıra, laboratuvar koşulları, test protokolü, reagenler ve ekipmanlarda test sonuçların kalitesini etkilemektedir⁽³³⁾.

2.6.1. Geleneksel Hücre Kültürü

Geleneksel influenza virus izolasyonu “altın standart” olarak kabul grmştir, ancak günümüzde daha çok aşı yapımında kullanılacak izolatların üretimi için kullanılmaktadır. Rhesus maymunlarının böbrek hücreleri (rhesus monkey kidney; RhMK) veya Madin Darby Canine Kidney (MDCK) hücrelerinde viral çoğalma mümkün olup 10-14 gün sonunda sitopatik etkinin görülmesi ve hemadsorbsiyon testi ile tanı mümkündür. İnfluenza virus izolatları tip A ve tip B şeklinde immunfloresan yoluyla identifiye edilebilmektedir. Tan 2-14 gün arası veya ortalama 3-5 günde mümkündür. İnfluenza virus suşlarında meydana gelecek olan genetik ve antijenik değişimler konvansiyonel kültür ile izolasyonu çok az etkiler, fakat influenza virülansının yüksekliğinde veya bilinmediğinde biyogvenliğe dikkat edilmesi önerilmektedir. Hücre kültürü PCR testine göre daha az sensitiftir. Çünkü influenza virus labildir, örneklerin dondurulması veya gecikmiş inokulasyon virusun enfeksiyöz özelliğinin kaybolmasına neden olabilir ve üremenin gecikmesi veya hatalı negatif sonuçlara neden olabilir. PCR testinde enfeksiyöz virusa ihtiyaç duyulmaz, prosesler veya gecikmelerden çok az etkilenme olur ve pozitiflik süresi kültüre nazaran daha uzundur. Son zamanlarda yapılan iki çalışmada zayıf kültür sonuçları rapor edilmiştir ki bu oldukça yaşlı vakalardan toplanan örneklerde grlmştir. Bu vakalarda virusun düşük titresi mevcuttur, suboptimal protokoller, denemeler veya semptomların

görülmesinden 14 gün sonra örneklerin toplanması virusun enfeksiyöz özelliğinin kaybolmasına neden olabilmektedir^(34,35).

2.6.2. Hızlı hücre Kültürü

Hızlı hücre kültürleri birçok laboratuvarında konvansiyonel kültürlerin yerini almıştır, çünkü hızlı ve basittir. Konvansiyonel kültürde influenza pozitifliği belirlenenlerin %98.6'sı hızlı kültürlerde tespit edilebilmektedir. RT-PCR ve xTAG revers-transkripsiyon yöntemiyle pozitifliği belirlenenlerin ise %88.9'u hızlı kültürler ile pozitif bulunmaktadır. Dolayısıyla, hızlı influenza kültürü hem hız hem sensitivite açısından değerli bulunmaktadır. Kullanımı yaygın olan hızlı kültürler; A-549 hücreleri ile ya mink lung (R-Mix) veya MDCK hücrelerinin (R-Mix Too) karışımıdır. R-Mix Too adlı hızlı kültür testi SARS (severe acute respiratory syndrome) koronavirüsün çoğalmasının engellenmesi için geliştirilmiştir. Örnekler santrifüj edilir ve tek tabakalı hücre kültürüne inoküle edilir. Böylece enfeksiyöz özellikleri artırılmış olur, 1-2 gün inkübe edilir, sonrasında 7 veya 8 virüsü hedef alan işaretli antikorlar vasıtasıyla immunfloresanda incelenmek üzere fikse edilir ve boyanırlar. Günümüzde H1N1 alttipini belirleyen immunfloresan reageni vardır⁽³⁵⁾.

2.6.3. Hızlı Antijen Testleri

Antijen tespiti spesifik antikorlar vasıtasıyla viral proteinin belirlenmesi esasına dayanır. Antijen testlerine direkt immunfloresan antikor (DFA) testi, enzyeme immunoassay (EIA), immunkromotografi ve floroimmunoassay dahildir.

Basit olmaları ve 10-30 dakikada sonuç vermeleri nedeniyle, hızlı influenza tanı testleri (Hızlı tanı testleri; Rapid Diagnostic Tests; RDTs) en yaygın kullanılan testlerdir.

EIA testi influenza antijeninin yakalanmasını gerektiren bir testtir, bunu yıkama adımları bunu takip eder ve ardından reagenlerin eklenmesi gelir. Buna karşın günümüzde birçok hızlı test, immunkromotografi formatını kullanır, örnek test stribine veya kasete aktarılır, 10-15 dakika sonra sonuç okunabilir. RIDTs'de pozitif sonuç için 10^4 - 10^6 aralığında influenza partikülü gereklidir, testin en iyi performansı küçük çocuklarda elde edilirki bu hastalarda virus titresi oldukça yüksektir. Optimal RIDTs performansı için, örnek tipi, eküvyon tipi önemlidir ve testin protokole göre dikkatli bir şekilde uygulanması gereklidir.

RIDTs'ların pandemilerde H1N1 tanısındaki kapasitesi bilinmemektedir. Yaygın kullanılan 3 RIDT'ne yönelik CDC'nin değerlendirmesi mevsimsel influenzaya nazaran H1N1'in daha düşük düzeyde belirlendiğine yöneliktir. Kitler değişen sensitivitelere sahip olup bu oran H1N1 için %40-69 ve mevsimsel influenza için %60-83 arasındadır. Yanlış negatif sonuçlar nedeniyle, CDC test sonucuna bağlı olarak antiviral terapinin uygulanmasını reddetmektedir. Birçok devam eden çalışmalar, RIDT'lerin H1N1'i tespit için mevsimsel influenzaya nazaran düşük sensitiviteye sahip olduğunu konfirme etmiştir. Bir çalışma RIDT'lerin kültüre göre sensitivitesinin genç yetişkinlerden nazofarinjeal sürüntü örnekleri kullanıldığında %84.1 olduğunu ortaya koymuştur.

Pandeminin erken dönemlerinde, New York'ta yapılan büyük bir çalışmada RDT'in ((BinaxNOW) H1N1 pozitifliğini belirlemede sensitivitesinin %9.6 olduğu bulunmuştur. Bu düşük sensitivitenin sebebi olarak örnek kalitesinin zayıflığı veya uygulamayı yapan personelin yeteri kadar bilgi sahibi olmaması gösterilmektedir. Her ne kadar RIDTs yüksek spesifite gösterse de (%96-99), yapılan iki çalışmada düşük spesifite (%48-50.7) tespit edilmiştir. Bir çalışmada üniversitede RIDT'lerin %92.3 oranında spesifiteye sahip olduğu belirlenmiştir. Benzer bir çalışmada küçük hastane ve doktor ofislerinde ise bu oran %43.1 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar test performansının gözlemlenmesinin kritik öneme sahip olduğunu göstermektedir, yanlış pozitif sonuçlar yanlış karar alınmasına neden olabilir, bu sonuçlar hasta yönetiminde kullanılıyorsa aşırı dikkat edilmelidir.

Son gelişmeler, otomatik okuyucu kullanan iki floroimmunoassay taşıyan cihazı bildirmektedir, cihaz inkubasyon periyodu sonunda sonucu otomatik olarak

yazdırmaktadır ki bu sonuç doğruluğunda artışı beraberinde getirmektedir. Okuyucu ayrıca hastane bilgi iletişim sistemine bağlanabilmekte ve bu sayede gider ve yazılım hataları asgari seviyeye indirilebilmektedir. Son H1N1 alttipinin belirlenmesinde 3M adlı RIDT ilerlemiş sensitiviteye sahiptir. Yeni FluID adlı test influenza A ve B'yi ve mevsimsel H1 ve H3 alttiplerini de belirlenmektedir^(33,36,37,38,39,40).

2.6.4. İmmunfloresan Test

DFA eksfoliye respiratuvar epitelyal hücrelerdeki viral antijenleri belirlemektedir, kaliteli örnek kullanılmalıdır ve RIDT'e göre daha sensitiftir. DFA klinik viroloji laboratuvarlarında geçen 10 yıl boyunca oldukça popüleriteye kavuşmuştur. Bunda etken özellikle yüksek kaliteli havuzlaştırılmış monoklonal antikorlarıdır. DFA testi ile influenza A ve B, RSV, PIV 1, 2, 3 ve adenovirus tek hücre spotlunda belirlenebilmektedir. Örneklerin hazırlanması ve sonucun raporlaştırılması 2 saat içerisinde gerçekleşmektedir. Tespit oranı ise %85-95 aralığındadır. Sitospin'in lamaların hazırlanmasında kullanılması sensitiviteyi güçlendirmekte ve 1-2 pozitif hücrede bile doğru identifikasyona izin vermektedir. DFA testinin manuel test olmasından kaynaklı uzmanlık ve doğru yorumlama önemlidir, dolayısıyla DFA testinin sensitivitesi ve spesifitesi laboratuvarlar arasında oldukça değişkendir. H1N1 pandemisi sırasında DFA testinin sensitivitesi beklenenden düşük çıkmıştır. RT-PCR'a nazaran %47-93 aralığındadır.^(41,42,43)

2.6.5. Nükleik Asit Testleri

İnfluenza virusları insanlarda respiratuvar bölge enfeksiyonlarının başlıca sebebidir, morbidite ve mortalite oranı yüksektir. Sadece Amerika'da her yıl 36.000 kişi bu hastalıktan ölmektedir ve 200.000 hasta yatışı olmaktadır, hatta bazı yıllarda

daha yüksek mortalite bildirilmiştir. İnfluenza A alttipleri 1918 pandemisi (H1N1), 1957(H2N2) ve 1968 (H3N2) gibi beklenmedik pandemilere neden olmuştur. HPAI H5N1 1996'da Asya'da başlayan pandemiyle gündeme gelmiştir. Beklenmedik şekilde, 21. yüzyılın ilk pandemisini yeni H1N1 influenza A virusu Mart 2009'da Meksika ve Güney Batı Amerika'da meydana getirmiştir. İlerleyen aylarda, küresel boyutlarda yayılım göstermiş olup internasyonel komite tarafından halk sağlığını tehdit eden boyutlara ulaştığı bildirilmiştir. Bu pandemi influenza A'nın hızlı, doğru ve sensitif tanısının acil bir gereksinim olduğunu kesinlikle göstermiştir.

İnfluenza virusun sürveyansı ve ortaya çıkışı için hızlı ve doğru tanı metotları şarttır. Salgın yönetimi, antiviral terapinin zamanında uygulanması, profilaksi ve enfeksiyon kontrolü için erken tanı gereklidir. İnfluenza A virusunun tiplmesi ve alttiplmesinde kullanılan geleneksel "altın standart" virusun izolasyonu ve takiben antijenik test kullanılarak HA ve NA alttiplmesidir. İnfluenza enfeksiyonları hakkında doğru bilgi serolojik analizlerle de elde edilebilir, fakat bu yöntem konvelesan ve akut serum gerektirdiğinden retrospektif bir metottur. Bu her iki metodun pratikte aynı anda uygulanması mümkün değildir, zira serolojik reagenlerin eksikliği söz konusudur.

Embriyonik tavuk yumurtası veya doku kültüründe virusun çoğaltılması karakterizasyon için yeteri kadar virus sağlar, ancak bu yöntem oldukça zaman alıcı ve emek yoğun bir çalışmadır. Antijenik testlere tabi tutulması, transport ihtiyacı veya uygun saklama koşullarının gerçekleşmesi için 3-7 gün gerekmektedir. Diğer influenza A virus testlerinden antijen testleri, klinik tanı için hızlı tanıyı sağlar, yaklaşık 30 dakika içerisinde sonuç elde edilir, fakat bu testler düşük sensitiviteye sahiptir ve yüksek kalitede örneğe ihtiyaç söz konusudur. Bazı antijen testleri, örneğin hızlı influenza tanı testleri influenza A ve B'yi tespit edebilir, fakat A alttiplerini belirleyemez. Bu geleneksel metotların sınırlayıcı yönlerine rağmen, bu testler influenza A virus enfeksiyonunun identifikasyonu ve kontrolü için şarttır. PCR-bazlı teknik uygulamalar, mikarray ve diğer moleküler sekanslama ve alttipleme metotları son yıllarda oldukça gelişmiştir^(33,43,44,45,46,47).

RT-PCR RNA viruslarının moleküler amplifikasyonunda oldukça fazla kullanılan yöntemlerden biridir. Klinik örneklerden ekstraksiyon ve purifikasyonu

otomatik ekstraksiyon enstrumanları gerçekleştirmektedir. Real-time PCR testi amplifikasyon ve deteksiyon adımlarını kombine etmektedir, test süresinin kısa olması, kros kontaminasyonun azalması ve viral yük tespiti önemli özelliğidir. Buna karşın, tek multipleks reaksiyonda en fazla 4 real-time test kombine edilebilir. İnfluenza tanısında 2008’de 3 moleküler test FDA tarafından kabul edilmiştir; Prodesse Proflu+, multipleks RT-PCR protokolüdür ve influenza A, influenza B ve RSV’yi belirler. Luminex xTag respiratuvar Virus Paneli (RPV), Luminex flow sitometrede amplikonların tespiti esasına dayanır ve konvansiyonel RT-PCR sonrası etken tespit edilir ve son olarak CDC influenza real-time PCR paneli özellikle halk sağlığı laboratuvarları için üretilmiştir, 6 monopleks belirlenim içerir. Her 3 test influenza A ve B tiplerini, son ikisi bunun yanı sıra mevsimsel H1 ve H3 alttiplerini de tespit eder.

CDC, 29 Nisan 2009’da RT-PCR protokülünü domuz A ve domuz H1 tespiti için DSÖ web sitesinden önermiştir. Laboratuvarlarda bu testin kurulumunu gerçekleştirmiş ve “home brew” adını vermişlerdir, buna karşın bazı modifikasyon ve hatalar dolayısıyla test verimli olmamıştır, verimlilik kazanmak için daha hızlı versiyonlar veya multipleks RT-PCR testleri H1N1 belirlenimi ve tiplemesi için önerilmektedir. Real-time PCR ekipmanları olmayan Avrupa’daki laboratuvarlar için PCR testleri uygundur. Real-time nükleik asit sekans bazlı amplifikasyon (NASBA) ve yeni izotermal metotlar PCR’a nazaran hızlı, kolay ve ucuz yeni H1N1 tanısı ve tiplemesi için geliştirilmiştir. Birçok yeni ticari H1N1 RT-PCR kitleri yakın zamanda FDA tarafından kabul edilecektir. Hiçbir test %100 sensitif değildir, buna RT-PCR da dahildir. Multipleks testler çok verimli ve düşük maliyetli olsa da, monopleks RT-PCR’a nazaran daha az sensitiftir. Laboratuvarların sirküle olan virusda bir nükleik asit sekans değişiminden bile moleküler metotların etkilenebileceği konusunda uyarılması gerekmektedir^(33,44, 45,46,48).

2.6.5.1. Konvansiyonel Revers Transkriptaz PCR Testi

Revers Transkriptaz PCR (RT-PCR) influenza A virus enfeksiyonlarının tanısında yeterli hızlılığa sahiptir. Birçok RT-PCR tekniği tek adımlı veya iki adımlı olarak gerçekleştirilir. Tek adımlı RT-PCR metodunda revers transkripsiyon ve PCR birlikte gerçekleştirilir, buna PCR primerleri, oligo(dT) primerleri veya revers

transkripsiyon için gelişigüzel primerler dahildir. İki adımlı RT-PCR'da ise ilk önce revers transkripsiyon ardından PCR uygulaması söz konusudur. Purifiye influenza viral RNA'sı önce revers transkripsiyona tabi tutulur ve komplementer DNA (complementary DNA; cDNA) elde edilir. Sonrasında cDNA spesifik primerler ile amplifiye edilir. İnfluenza A virusunda bulunan 8 genetik segment için "Multisegment RT-PCR" yaklaşımı geliştirilmiştir. Bu yöntem virus alttipini belirlemede eş zamanlı genomik RNA segmentlerini amplifiye etmekte ve insan nazofaringeal ve orafaringeal sürüntüsü kullanılmaktadır. Tam genomun amplifikasyonu ile özellikle hücre kültüründe izole edilemeyen bazı virusları analiz etme sorunu ortadan kalkmaktadır ve sonrasında sekans analizi ile virus alttipi de belirlenebilmektedir. Farklı 16 HA ve 9 NA bulunmasından ve sekanslarının değişken özellikte olmasından dolayı influenza alttiplerinin belirlenmesi oldukça güçtür. Dejenere RT-PCR testi yeni gen ailelerinin veya yeni genlerin bulunmasında oldukça güçlü bir metoddur. Akraba genlerin tekrar eden sekanslarının belirlenmesi dejenere primerlerin hazırlanmasını ve metodun uygulanmasını sağlamaktadır. İnfluenza alttiplerinin tanısı için hızlı prosedürler gerekmektedir, bu maksatla birçok grup aynı anda farklı HA'ları tanımlayabilecek protokoller geliştirmişlerdir.

Gal ve ark.⁽⁴⁹⁾ HA belirleyen metot geliştirmişlerdir ve buna PanHA RT-PCR adını vermişlerdir. Bu metotta 16 HA alttipinde 164-176 aminoasit içerikli fragmanı amplifiye etmek için 5 tane dejenere primer kullanılmaktadır. Bu PCR ürünleri prekürsör hemaglutinin olan HA0 kesim bölgesinin moleküler karakterizasyonu için kullanılabilir. Ayrıca H5 ve H7'nin alttiplemesi için ve H5 ve H7 olmayan alttiplerin belirlenmesinde kullanılabilir. Alaska vahşi kuşlarında yapılan influenza A çalışmasında, Wang ve ark.⁽⁵⁰⁾ 4 parça dejenere primer kullanarak bilinen tüm Avian influenza A alttiplerinin tamamını etanol fikse kloak sürüntüsünden amplifiye edilmesini denemişlerdir. Bu dejenere primerlerin kullanılması, varolan virusların alttiplemesini doğru şekilde sağlamakta, miks enfeksiyonların belirlenmesini de mümkün kılmaktadır. Etanolde sürüntü örneklerinin fiske edilmesi oda sıcaklığında mümkündür. Bu sayede saklama ve transport maliyeti azalmakta ve ayrıca zaman kazandırmaktadır. Avian influenza A virus surveyansında HA alttiplerini belirleyen bu metod kolay ve pahalı olmayan bir metottur. İnfluenza A virusunun NA genlerinin belirlenmesi ve alttiplerinin belirlenmesi için dejenere RT-PCR testi de

kullanılabilmektedir. İnfluenza A ve alttıplerinin belirlenmesi için geliştirilen ve yayımlanan birçok RT-PCR testi matriks (M1, M2) ve HA segmentlerinin belirlenmesine yöneliktir, fakat son zamanlarda NA'nın belirlenmesine yönelik de metotlar geliştirilmiştir. Alvarez ve ark.⁽⁵¹⁾ 9 NA alttipini belirleyebilecek dejenere primeri, M13 tag'la birlikte geliştirmişlerdir. Bu çalışmada amplifiye edilen 253 bp'lik bant 40 femtogramda görünür halde tespit edilmiş ve agaroz jelde görüntülenmiş bütün bantlar direkt sekanslama için yeterli miktarda elde edilmiştir. Bu metod influenza A virus NA gen alttiplemesi için tanımlamayı sağlamaktadır⁽⁴³⁾.

2.6.5.2. Real-Time RT-PCR Testi

Real-Time PCR, PCR bazlı teknolojiler içinde en önemli gelişmedir. Bu teknik hedef DNA molekülünün amplifiye ve aynı zamanda kantifiye edilmesini sağlamaktadır. Şimdilerde, TaqMan, “moleküler beacons”, “scorpions” ve SYBR green gibi farklı teknikler genel kullanımdadır. Bütün bu testlerde PCR ürünlerinin tespiti yayılan floresan sinyalin ölçümü ile gerçekleşir. Real-Time RT-PCR ve RT-PCR influenza A virus tespitinde yaygın ve artan şekilde kullanılmaktadır, tanı ve sürveyans bu protokolle belirlenebilmektedir ki yüksek sensitivite, iyi tekrarlanabilirlik ve kantifikasyon özelliği taşımaktadır. Geçen 10 yılda, real-time PCR avian influenza virusun yayılımının belirlenmesi, salgın ve araştırma için rutin kullanılmaktadır.

Real-time PCR testlerinin çoğu influenza A virusunda Taqman PCR yaklaşımı ile gerçekleştirilmektedir, PCR ürününün internal bölgesi ile hidrolize olacak probun varlığı yüksek sensitivite ve spesifiteyi beraberinde getirmektedir. Farklı influenza alttıplerinde matriks gen segmentinin konsreve doğasından kaynaklı olarak spesifik matriks gen primerleri ve problemleri influenza virus tiplemesi için kullanılmaktadır ki bu insan örnekleri içinde geçerlidir. Bir diğer matriks gen bazlı real-time PCR insan ve hayvanlarda influenza taraması ve tiplemesi için kullanılmaktadır. Bu test özellikle HA veya NA negatif olduğunda önemlidir, Alaska'da vahşi ördeklerde çok geniş alanda çalışmalar yapılmış olup, çalışma Runstadler ve ark.⁽⁵²⁾ tarafından gerçekleştirilmiştir.

İnfluenza A virus matriks genine spesifik TaqMan prob ve primerleri kullanılmış olup, kloakdan alınan sürüntüler incelenmiştir ve vahşi ördeklerin %25.6'sı pozitif bulunmuştur. Bir diğer çalışmada, Avian influenza A suşları, insan ve domuz orijinli olarak araştırılmıştır, çalışmada matriks gen sekans homolojisi dikkate alınmıştır ve bu maksatla “Minor Groove Binder”(MGB) adlı problemler dizayn edilmiştir. Bu test son derece sensitiftir, bunun yanı sıra Amerika'daki canlı kuş pazarında H5 ve H7 avian influenza virusunun patojenitesini belirleme için real-time RT-PCR (rRT-PCR) yöntemi kullanılmaktadır⁽⁵³⁾.

Asya orijinli HPAI H5N1 vahşi ve evcil avian türlerinde enfeksiyona neden olabilmektedir ki bunun yanı sıra insanlarda ve memelilerde enfeksiyon yapmaktadır, Birçok Taqman rRT-PCR metotları HPAI H5N1'in HA, NA ve matriks proteinlerini belirlemek için geliştirilmiştir. Kardiyak ve iskelet kaslarında viral replikasyonun araştırılması için tavuklara intranazal inokulasyon yapılmış olup sonrasında tavuk etinde HPAI H5N1 varlığı rRT-PCR yöntemiyle araştırılmıştır.

Chen ve ark.⁽⁵⁴⁾ 2007'de sensitif ve spesifik rRT-PCR yöntemini influenza A alttipi olan H5N1 tespiti için geliştirmişlerdir. Son zamanlarda, HPAI H5N1 virus tanısı için HA'nın farklı bölgelerini hedef alan iki set primer ve prob dizayn edilmiştir, sonuçlar yukarıdaki protokolle yapılan testin H5 alttipi için spesifik ve enfekte kuşlarda HPAI H5 RNA'yı tespit edebildiğini göstermektedir. Benzer metot daha önce H5N1 ile enfekte hastaların örneklerinde uygulanmış olup HPAI H5 RNA'nın kantifiye ve belirlenmesi için amaçlanmıştır⁽⁴³⁾.

İnfluenza A H1N1'in 2009'da pandemisinin ortaya çıkması ile birlikte, real-time PCR metotları tanı ve yayılımın takibi için birincil metot olmuştur. H1N1 salgının ortaya çıkmasından kısa bir süre sonra CDC real-time PCR protokolü geliştirmiştir. Tek adımlı rRT-PCR yaklaşımı olan bu protokol ile hedef olarak A/H1N1'in matriks geni tanınmaktadır. H1N1 tespitinde oldukça başarılı sonuçlar vermiştir ve mevsimsel influenza A, H1N1 ve H3N2 alttipleri ile domuz orijinli influenza A(H1N1) kros reaksiyon göstermektedir. Yeni influenza H1N1'in belirlenebilmesi için ayrıca HA ve NA genlerini hedef alan Taqman problemleri geliştirilmiştir, mevsimsel H1N1 ve H3N2 için insan respiratuvar örnekleri kullanılmıştır. Çok yakın bir zamanda yapılan

çalışmada, birçok floresan işaretli nükleik asit hidroliz problemleri universal prob kütüphanesinden seçilmiş olup, pandemik influenza A(H1N1)'da HA ve NA gen segmentlerini hedef alan real-time PCR protokolü geliştirilmiştir. Bu testin analitik spesifite ve sensitivitesi Alman araştırmacılarının verileri ile eşdeğer kabul edilmiştir^(43,55,56).

SYBR green erime eğrisinin tek nükleotid polimorfizminin analizinde kullanılması, identifiye edilmesi ve haritalanması mümkündür, bundan dolayı bazı araştırma grupları influenza A virusunun kantitasyonu ve tiplendirmesi için SYBR green bazlı real-time PCR uygulaması geliştirmişlerdir. Krafft ve ark.⁽⁵⁷⁾ tarafından 2005'de etanolle fikse edilmiş sürüntü örneklerinde 2002-2003'de birlikte sirküle olan influenza H1N1 ve H3N2'nin matriks genindeki farklı minör sekans varyasyonunun erime sıcaklığı ile (T_m) tespit edileceği belirlenmiştir. Bu SYBR green testinin amplifikasyon sınırı 390 femtogramdır (yaklaşık 50000 viral kopya). Çok yakın zamanda yayınlanan bir raporda, SYBR green bazlı real-time PCR protokolünün mevsimsel influenza A (H3N2) ile yeni A H1N1 virusunun ayırımının eğrilik farkından belirlenebileceği bildirilmiştir. SYBR green bazlı RT-PCR ile Taqman rRT-PCR vahşi kuşlarda influenza A virusu taramalarında sensitivite açısından karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada, iki SYBR green reaksiyonu ve bir Taqman rRT-PCR protokolü her bir örnek için karşılaştırılmıştır. Sonuçlarda göstermiştir ki iki SYBR green testi spesifik prob kullanılan protokole göre influenza A tespitinde daha iyi performansa sahiptir^(43,58).

2.6.5.3. Multipleks PCR Testi

Multipleks PCR birden çok hedef DNA'yı amplifiye eden bir protokoldür ve tek bir reaksiyon tüpünde birden fazla primer kullanılmaktadır. Konvansiyonel RT-PCR veya real-time PCR ile yapılan multipleks PCR testi başarılı şekilde influenza tip tespitinde ve alttiplemde kullanılmaktadır. Geçen 10 yılda dizayn edilen bir çok multipleks PCR testi H5N1 identifikasyonu için geliştirilmiştir. Wu ve arkadaşları, tek tüpte influenza virus A tipleri ve H5N1 tanısını 4 set primer kullanarak multipleks rRT-

PCR metodu ile başarmışlardır. Chararaein ve arkadaşları, avian influenza virus alttipleri olan H5, H7 ve H9'u alttip spesifik multipleks RT-PCR kullanarak tanımlamışlardır. Ong ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, düşük patojeniteli avian influenza alttipleri için SYBR-green bazlı multipleks rRT-PCR metodu geliştirilmiş olup influenza A virusu ve NP, H9 ve H2 gen bölgelerinin aynı anda belirlenebileceği ve Tm farklılığı ile bunun yapılabileceği tespit edilmiştir. İnfluenza A tespitinde Amerika'da FDA (Food and Drug Administration; Gıda ve İlaç Dairesi) tarafından ticari olarak kabul gören ve yukarda bahsedilen metotlara göre respiratuvar viral panel (RVP) için dizayn edilmiş tek kit xTAG RVP Assay (Luminex Molecular diagnostic, Inc., Toronto, CANADA) multipleks RT-PCR kökenlidir ve aynı anda 20 virusu ve alttiplerini tespit edebilmektedir^(59,60,61).

İnfluenza H1N1 virusunun neden olduğu 2009 pandemisinin moleküler tespiti ve yayılımını tespit ile 25 Nisan 2009'da DSÖ yeni influenza virus (H1N1) salgınını deklare etmiştir. DSÖ 11 Haziran 2009'da, pandeminin 6. faza yükseldiğini ve virusun küresel yayılımını tamamladığını bildirmiştir. Bu yeni H1N1 virusunun virölansı ve sahip olduğu farklı özellikler hakkında bilgi sınırlı da olsa, genetik karakterizasyonu ve erken tespiti politik kararlara, aşı ve ilaç tedavisine ve hastane yönetimine ışık tutmaktadır. Amerika'da, Ulusal Respiratuvar ve Enterik virus yayılımı sistem laboratuvarı influenza tanısını sistemine eklemiştir. İnfluenza 2009 salgınının başlamasıyla birlikte, serolojik tespit influenza A virus tespiti açısından çok sık kullanılmıştır, fakat yeni ortaya çıkan domuz orjinli influenza H1N1 virusunu belirlemekte yetersiz kalmıştır. CDC rRT-PCR temelli bir metot geliştirmiştir ve yeni H1N1 virusunda HA ve matriks genlerini hedef almaktadır. Bu rRT-PCR Domuz Flu Panel testi FDA tarafından kabul edilmiş olup klinik influenza testi olarak uygulanmıştır ve dünya genelinde hızlı bir şekilde araştırma ve klinik laboratuvarlarına dağıtılmıştır ki maksat yeni influenza A(H1N1) virus enfeksiyonu hakkında doğru bilgi sahibi olmak ve bunun zamanında uluslararası komiteye bildirilmesidir. Bu real-time PCR protokolü respiratuvar klinik örneklerde viral antijen tespiti için RIDT'lerle mukayese edilmiştir. RIDTs ile karşılaştırılan rRT-PCR sonuçlarına göre sensitivite mevsimsel influenza A(H1N1) için %60-80, mevsimsel A(H3N2) için %80-83 ve yeni influenza A(H1N1) için %40-69 aralığındadır.

Ek olarak, salgın sırasında diğer PCR bazlı moleküler protokoller hızlı bir şekilde geliştirilmiş ve araştırma ve klinik laboratuvarlarında kullanılmıştır. Yeni influenza A H1N1 virusunun 2009 Nisan sonlarında Milwaukee’de (WI, USA) büyük bir salgın meydana getirmesi sonrası, He ve arkadaşları, multipleks RT-PCR enzim hibridizasyonuna dayalı hızlı ve doğrulayıcı bir test (FluPlex, Medical College of Wisconsin, WI, USA) geliştirilmişlerdirki bu protokol eyalette ilk enfekte hastaları tespitinde kullanılmıştır. Bu protokol yeni influenza A virus H1N1 ve influenza A ve B tipleri ile influenza viruslarının H1, H2, H3, H5, H7, H9, N1 (insan ve hayvanlarda), N2 veya N7 alttipleni için spesifik olarak dizayn edilmiştir. Yarı otomatik sistem olarak “FluPlex” influenza A virus tespitinde kullanışlı bir platformdur. Klinik seyir ve kontrol amacıyla Wang ve arkadaşları, tek tüp reaksiyonunda 2009 pandemik H1N1 virus ve mevsimsel insan H1N1 virusunu belirleyebilecek ve ayırt edebilecek bir real-time protokolü geliştirmişlerdir. Hong Kong’da, 2009 pandemik H1N1 virus enfeksiyonunu konfirme edecek edecek SYBR green I real-time PCR protokolü geliştirilmiştir. İnfluenza A virus matriks gen segmentinin RT-PCR ile pozitif ve RT-PCR ile H1 (mevsimsel) ve H3 için negatif olması durumunda hasta örneklerinden virusun HA geninin 83bp fragmanı amplifiye edilmiştir.

H1N1 2009 pandemisine karşı, birçok ülke virolojik tarama sistemlerini güçlendirmiş ve yapılandırmıştır. PCR bazlı moleküler tanı testler birçok ülkede sağlık kurumları tarafından influenza A, B, mevsimsel A(H1N1 ve H3N2) ve 2009 pandemik influenza A(H1N1) tanımlaması için kullanılmaktadır. Yakınlarda, CDC rRT-PCR ve diğer 3 rRT-PCR protokolü kıyaslanarak pandemik influenza A(H1N1) tespitinde sensitivite ve spesifitesi yönünden değerlendirilmiştir. Moleküler tanı laboratuvarlarının 2009 pandemik influenza A(H1N1) virusunu diğer sirküle olan influenza A viruslarından ayırt edebilmesi kritik öneme sahiptir⁽⁴³⁾.

2.6.5.4. DNA Mikroarray Testi

DNA mikroarray teknolojisi, sabit oligonükleotidler proplar veya robotik sabitlenmiş DNA’lar içermektedir ve aynı anda binlerce farklı nükleik asit sekansı

taramada kullanılmaktadır. İnfluenza A surveyansı boyunca identifikasyon ve alttıplemede anlamlı bilgiler sunabilecek bir uygulamadır. MChip adı verilen (InDevR, CO, USA) bir mikroçip influenza matriks gen segmentini hedef alarak alttıpleri belirleyebilmektedir. Bu metot daha sonra A/Brewig Mission/1/1918 dahil olmak üzere eski yıllara ait 16 A H1N1 alttipin tespiti için geliştirilmiştir. MChip 16 virusa ait matriks gen segmentini başarılı bir şekilde tespit etmiştir. Townsend ve arkadaşları, H1N1, H3N2 ve H5N1'in tanısı için düşük dansiteli oligonükleotid mikroarray geliştirmişlerdir. Respiratuvar patojen mikroarrayin 2009'da, yeni versiyonu (TessArray RPM-Flu 3.0 ve 3.1, TessArae, LLC, VA, USA) geliştirilmiştir. Bu uygulama tek bir testte influenzanın tüm alttıplerinin HA ve NA genlerini tespit edebilmektedir. Huang ve arkadaşları, influenza A virusunun H1, H3, H5, N1, N2 ve matriks genlerini ve influenza B virusunun NS genini tespiti için iki adımlı revers transkripsiyon- multipleks PCR'ı mikroarray tipleme ve alttıpleme ile kombine ederek yeni bir uygulama geliştirmiştir^(62,63,64).

2.6.5.5. Pyrosequencing Test

Pyrosequencing, DNA dizisine yeni bir nükleotid eklenmesiyle pirofosfatın serbest bırakılmasına dayanan DNA sekanslama tekniğidir. Enzimatik reaksiyonlar sonucunda eklenen nükleotid sayısı ile orantılı olarak ışık emisyonu uğrar ve hedef DNA ile bağlantı gerçekleştiren nükleotidler hakkında bilgi ve veri sunar. Pyrosequencing'in genomik sekans testinde bazı sınırlamalar mevcuttur ki bunlardan en önemlisi okuma uzunluğunun çok kısa olması ile alakalıdır. İlaça dirençli virusların yayılımının ortaya çıkması ile birlikte pyrosequencing çok güçlü bir teknik sunmaktadır. İnfluenza A H5N1 virusunda NA inhibitörlerinin ve M2 iyon kanalı bloklayıcılarına karşı direnç hızlı olarak bu metotla belirlenebilmektedir ve bunun yanı sıra NA inhibitörlerine karşı direnç mutasyonları da belirleyebilmektedir. Pyrosequencing, RT-PCR tekniği ile kombine edilebilmekte, böylece influenza A alttıpleri H1N1, H3N2 ve H5N1'de meydana gelebilecek NA inhibitör direnç mekanizmaları anında, hızlı ve düşük maliyetle tespit edilebilmektedir. H5N1 viruslarında meydana gelen ve artış

gösteren farklılık yine pyrosequencing metodu ile belirlenebilmektedir. Pyrosequencing RT-PCR HA geninin özellikle değişken bölgelerini amplifiye ederek farklı H5HA suşlarını tespit edebilmektedir^(43,65).

2.6.5.6. Nükleik Asit Sekans Bazlı Amplifikasyon Testi

Nükleik asit sekans bazlı amplifikasyon (Nucleic Acid Sequence Based Amplification; NASBA) adı verilen teknik izotermal nükleik asit amplifikasyon metodudur ve transkripsiyon bazlı amplifikasyon sisteminden geliştirilmiştir. Lav ve arkadaşları tarafından 2004’de avian influenza A virus H5 ve H7 alttiplerinde HA geninin belirlemek için tasarlanmıştır. NASBA metodu ayrıca düşük patojeniteli influenza virusların ve HPAI H5 avian influenza virusun tespiti için kullanılabilir. Son yapılan bir çalışmada, real-time NASBA metodu influenza A(H1N1) ve A(H3N2)’nin tespitinde kullanılmıştır, bunun yanı sıra influenza B, RSV ve human metapneumovirus (hMPV) tanısı gerçekleştirebilmektedir. Bu prosesin basitliği influenza A virus tanısında alternatif teknik ve verimli bir test olarak görülmektedir^(66,67).

2.6.5.7. Loop-Aracılı İzotermal Amplifikasyon Testi

Loop-Aracılı İzotermal Amplifikasyon (Loop-mediated isothermal amplification; LAMP) adı verilen spesifik, verimli ve hızlı teknik PCR ile benzerlik göstermektedir, fakat DNA amplifikasyonu izotermal koşullar altında gerçekleşmektedir. Bu metotta DNA polimeraz kullanılmakta olup hedef DNA’daki 6 farklı bölge 4 set spesifik primer ile amplifiye edilmektedir. Birçok deneysel veri LAMP’ın HPAI H5N1 ve diğer influenza viruslarının tespitinde sensitif ve hızlı metot olduğunu göstermiştir. RT-LAMP avian influenza virusun H9 alttipini belirlemek için

geliştirilmiştir, hızlı ve sensitif bir tekniktir ki RT-PCR'a göre 10 kat sensitiftir, vahşi ve evcil kuşlarda geniş çaplı tarama olanağı da sağlamaktadır. Bu metot ayrıca influenza A H1 ve H3 alttiplerini belirleyebilmekte ve influenza B virus suşlarını da tespit edebilmektedir, bunlara HPAI H5N1 tespiti de dahildir ^(68,69).

2.7. İnfluenza Virus Enfeksiyonlarında İmmun Cevap

2.7.1. Doğal (İnnate) İmmunité

İnfluenza virus enfeksiyonlarına karşı ilk defans savunması doğal immunité ile verilir. Mukus ve kollektinler gibi komponentler solunum yolu epitelyal hücrelerinin enfeksiyondan korunmasını sağlar, doğal hücrel immün cevabın hızlı gelişmesi viral replikasyonun sınırlandırılmasını beraberinde getirmektedir.

İnfluenza A virus ile enfekte hücrelerde, patojenle ilişkili moleküler patern (pathogen-associated molecular pattern; PAMP) olan influenza A viruslarının viral RNA'sı patern tanıyan reseptörler aracılığı ile (Pattern recognition receptors; PRRs) tanınır. PRR'ler toll-benzeri reseptörler (Toll-like receptors;TLRs), retinoik asit ile indüklenabilir gen-1 protein (RIG-1) ve NOD-benzeri reseptör ailesi pryin domaini içeren 3 (NOD-like receptor family, pryin domain containing 3; NLRP3) proteindir.

TLR7 tek zincirli viral RNA'ya bağlanır. TLR3 çift zincirli viral RNA'yı tanır. RIG-1 ise tek zincirli 5' ucunda trifosfat taşıyan RNA'ya bağlanır. Bu reseptörlerin sinyalizasyonu ile proinflamatuvar sitokinler ve Tip1 interferonlar üretilir. İnterferon-beta üretilir ve interferon regülâtör faktör 7'nin (interferon regulatory factor 7; IRF7) regülasyonu ile interferon-alfa ve interferon-beta ekspresyonu sitmüle edilir. İnterferonların güçlü antiviral aktiviteleri vardır ve protein sentezini inhibe edip viral replikasyonu durdururlar. Tip 1 interferonlar JAK/STAT sinyalizasyon yoluyla interferonu sitmüle edici genleri aktifleştirirler. İnterferonun sitmüle ettiği genlerden biri, myxovirus (MX) genidir. MxA proteinini kodlar, GTPase aktivitesine sahip güçlü antiviral aktivitesi vardır ve influenza virus replikasyonunu inhibe eder. Tip I interferonlar dendritik hücreleri de sitmüle ederler bu yolla CD4+ ve CD8+ T

hücrelerine antijen sunumu güçlenir ve adaptif immün cevabın devamlılığı sağlanır. NLRP3 reseptörü, stoplazmada moleküler bir kompleks olan NLRP3 inflammozumunun (“inflammasome”) bir parçasıdır ve influenza virusuna karşı immünite ile ilişkilidir. İnfluenza virus M2 iyon kanalının aktivasyonu ile NLRP3 inflammozumu uyarılır ve kaspaz 1 aktive olur, bu sayede pro-IL-1 beta, IL-1 beta'ya dönüşür ki bu Th17 hücrelerinin indüksiyonunda rol oynar, aynı zamanda antijen spesifik CD4+ T hücrelerinin sayısında bu yolla artış sağlanır^(70,71,72,73,74).

2.7.1.1. Alveolar Makrofajlar

İnfluenza virus enfeksiyonlarında alveolar makrofajlar alveollarda meydana gelen enfeksiyonla aktive olurlar ve fagositoz yoluyla influenza ile enfekte hücreleri yok ederler, bu da viral yayılımı sınırlar. Diğer taraftan, makrofajların aktive olması ile birlikte akciğerde influenza enfeksiyonu süresince nitrik oksid sentaz (NOS-2) üretilir. Bununla birlikte tümör nekroz faktör (TNF-alfa) da üretilir, bu yol influenza virusuna bağlı patolojiye katkıda bulunur. Bu iki farklı fonksiyon ile influenza virus enfeksiyonlarına karşı dengelenmiş önemli bir immün cevap gerçekleşmektedir, yüksek patojeniteye sahip avian virus enfeksiyonlarında yüksek düzeyde immünopatoloji gelişmekte olup bu virusların kanda bulunan makrofajlar ve alveolar makrofajları enfekte ettikleri gösterilmiştir.

Kanda bulunan makrofajların influenza A/H5N1 ile enfekte olmaları yüksek düzeyde pro-inflamatuvar sitokinlerin üretilmesine neden olmaktadır. Aksine, H5N1 ile enfekte alveolar makrofajlar verimli virus üretimi göstermemektedir ve düşük seviyede pro-inflamatuvar sitokin üretimi söz konusudur. Daha da fazlası, alveolar makrofajlar immün cevabı regüle eder ve özellikle antijen spesifik T hücre immunitésinin gelişimini tetiklerler. H5N1 gibi influenza viruslarının alveolar makrofajları enfekte etmesi bu hücrelerin immünsupressif fonksiyonunu zorlaştırabilir. Alveolar makrofajlar ve immün cevaptaki rolleri daha fazla araştırılması gereken bir konudur^(75,76).

2.7.1.2. Dendritik Hücreler

Dendritik hücreler antijen sunan profesyonel hücrelerdir, özellikle influenza virus enfeksiyonlarında bu geçerlidir. Konvansiyonel dendritik hücreler bütün solunum yolu epiteli boyunca epitelin altında lamina propriada ve bazal membranın üstünde lokalizedir, solunum yolu epitelyum hücrelerinin arasına uzanan dendritleri ile solunum yolu lumenini patojenler için sürekli gözlerler. Konvansiyonel dendritik hücreler virionların tespiti ve opsonize (nötralize) edilmesinde önemli role sahiptir, virionun hücreye girmesi ile birlikte konvansiyonel dendritik hücreler göç ederler ki bu göçte CCR7'ler (C-C chemokine receptor type 7) rol alır, afferent lenfatik sistem yolu ile lenf nodlarına drene olurlar. Burada influenza virusdan derive antijenleri Th (T helper; T yardımcı) hücrelerine sunar ve aktive ederler.

Konvansiyonel dendritik hücreler viral proteinleri degrade eder ve oluşan immunopeptidleri (epitop) MHC sınıf I ve II yoluyla sunarlar. MHC I sunumu için influenzadan derive olan peptidler sitozole yayılırlar. Bu proteazomlar vasıtasıyla gerçekleşir, ardından endoplazmik retikulumla transpote olurlar ve burada MHC sınıf I moleküllerine bağlanırlar. Sonrasında MHC sınıf I/peptid kompleksi golgi aygıtı vasıtasıyla hücre membranına taşınır ve CD8+ sitotoksik T hücreleri tarafından tanınırlar. MHC sınıf II sunumunda viral proteinler endozom/lizozom yoluyla degrade olurlar, ardından oluşan peptidler MHC sınıf II moleküllerine bağlanırlar. Bu kompleks hücre membranına transpote edilir ve CD4+ T hücreleri tarafından kabul edilirler^(77,78).

2.7.1.3. Doğal Öldürücü Hücreler

Doğal öldürücü hücreler (natural killer; NK) doğal immun cevapta önemli efektör hücrelerdir. Antikor bağlı influenza virus ile enfekte hücreleri tanır ve lizis yolu bu hücreleri yok ederler, bu sürece antikor bağımlı hücrel sitotoksisite adı verilir. Bu hücreler influenza virus ile enfekte hücreleri Nkp44 ve Nkp46 adı verilen sitotoksisite reseptörleri ile tanır. İnfluenza virusun hemagglutininlerine bu reseptörlerin bağlanması ile NK hücreleri aktifleşir ve ve enfekte hücre lizis yolu ile yok edilir⁽⁷⁹⁾.

2.7.2. Adaptif İmmunite

Adaptif immun sistem influenza virus enfeksiyonlarına karşı savunmada ikinci hattır. Humoral ve hücrel immunitiyi barındıran sırasıyla virus karşı spesifik antikorlar ve T hücreleri görev almaktadır.

2.7.2.1. Humoral İmmunite

İnfluenza virus enfeksiyonu virusa karşı spesifik antikor cevabını indükler. HA ve NA'ya karşı spesifik antikorlar salgılanır ki bu proteinler koruyucu immunité ile koreledir. HA-spesifik antikorlar HA'nın trimerik globular başına tutunurlar ve bu yolla virusun hücreye girişı inhibe edilir. Dolayısıyla HA-spesifik antikorlar virusu nötralize ederler. Daha da fazlası bu antikorlar sayesinde Fc eksprese eden hücreler virusu fagositte edebilmektedir. Ayrıca enfekte hücrelerde eksprese edilen HA'ya antikorların bağlanması antikor bağımlı hücrel sitotoksisiteyi de sağlamaktadır. HA-spesifik antikorlar enfeksiyona sebep olan viruslara bağlanmakta ve böylece koruma sağlanmaktadır. Whittle ve arkadaşlarının yaptığı son çalışmada, HA'nın bağlandığı reseptörün bölgesine karşı bir insan antikorumun geliştiğı ve antijen olarak farklı, fakat aynı alttıpteki viruslarıda inhibe ettiğı tespit edilmiştir. HA globular baş bölgesinin oldukça değışken olmasına karşılık HA sap bölgesi son derece korunmuştur, glikoprotein bu kısmı immun sisteme karşı fiziksel olarak maskelenmiştir. İnfluenza enfeksiyonu boyunca sap bölgesine karşı antikorlar düşük titrede sentez edilir. İlginç olan ise, bu antikorların bazılarının farklı alttıplerdeki HA'lara da bağlanmasıdır ve geniş nötralizasyon kapasitesine sahip olmalarıdır⁽⁸⁰⁾.

NA molekülüne karşı da sentez edilen antikorlar mevcuttur ve koruyucu potansiyeli vardır. NA proteinin enzimatik aktivitesi ile sialik asit rezidülerinde kopma meydana gelir ve böylece yeni oluşmuş viruslar hücre yüzeyinden ayrılır ve yayılım gösterirler. NA'ya bağlanma ile birlikte, direkt olarak nötralizasyon değıl, enzimatik aktivitenin engellenmesi ile virus yayılımında sınırlama meydana gelir. Daha da fazlası, NA-spesifik antikorlar, antikor bağımlı hücrel sitotoksitenin aktivitesini sağlamakta ve virus ile enfekte hücrelerin yok edilmesi de bu yolla sağlanmaktadır.

Matriks protein 2 (M2) üçüncü viral membran proteinidir, tetramer formda olup virionun asitleşmesi ve golgi ağında erken ve geç evre virus replikasyonunda pH

düzenlemesi sağlamaktadır. Tüm influenza viruslarında bu protein yüksek düzeyde konservedir ve M2'ye karşı immunité ilk kez fareler aracılığı ile yapılan monoklonal antikorlar vasıtasıyla anlaşılmıştır. Enfekte hücrelerde protein çok düşük düzeyde mevcuttur ve dolayısıyla M2-spesifik antikorlar doğal enfeksiyonda sınırlı düzeyde sirküle olurlar.

Nükleoprotein (NP) koruyucu T hücreleri için önemli hedeftir. Bununla birlikte, NP-spesifik antikorlarda koruyuculukta önemli rol oynamaktadır. Her ne kadar koruyuculukta gerçek mekanizma henüz anlaşılmamış olsa da, bu antikorların kompleman aracılığıyla enfekte hücrelerin lizisini uyardığı bildirilmiştir^(77,78,81).

Humoral immun cevapta influenza spesifik antikor izotipleri IgA, IgM ve IgG'dir. Mukozal veya sekretuar IgA antikorları lokal olarak üretilir ve transepitelyal transport vasıtasıyla mukusla taşınır ve solunum yolu epitelyum hücrelerinin enfeksiyondan lokal korunmasını sağlar. Bu antikorlar aynı zamanda nötrale edici özellik de göstermektedir. Serum antikorları olan IgG'nin alttipleri respiratuvar bölgeye transude olurlar ve uzun vadeli koruma sağlarlar. IgM antikorları influenza virusunun kompleman aracılı nötralizasyonunu sağlar⁽⁸²⁾.

2.7.2.2. Hücresel İmmunité

İnfluenza virus enfeksiyonunda CD4+, CD8+ T hücreleri ile regülatör T hücreleri (Treg) uyarılır. Antijen sunan hücreler üzerinde MHC sınıf II ile sunulan virus derive peptidler aracılığı ile CD4+ T hücreleri aktive olur ki antijen sunan hücreler ayrıca ko-stimülatör moleküllerde eksprese ederler. CD4+ T hücrelerinin bazıları enfekte hücrelere karşı ayrıca sitotoksik aktivite de gösterirler. Th yardımcı hücreler sitokin ekspresyon profiline göre ayrılırlar; Th2, IL-4 ve IL-13 eksprese eder, bu sitokinler sayesinde B hücre cevabı gerçekleşir. Th1, interferon gamma ve IL-2 eksprese eder ki hücresel immun cevapta önemlidir. Ek olarak, regülatör T hücreler ve Th17 de influenza virus enfeksiyonlarında hücresel immun cevapta önemli rol alır.

Aksine inflamatuvar çevrede ise Th17 hücreleri Treg fonksiyonunun inhibe eden IL-6 üreterek yardımcı T hücrelerin cevabını artırır.

Virusa karşı spesifik CD8+ T hücrelerinin ana fonksiyonu sitotoksik T lenfosit hücreleri olmalarıdır. İnfluenza virus enfeksiyonunda lenfoid dokularda bu hücreler aktive olurlar ve enfeksiyonun engellemesini gerçekleştirirler. Bu hücreler influenza ile enfekte hücreleri tanır ve elimine ederler. Litik aktiviteyi perforin ve granzim enzimlerini serbest bırakarak sağlarlar. Perforinler enfekte hücrenin membranında permeabilizasyonu artırır ve ardından granzimler (GrA ve GrB) hücre içerisine girerek apoptozisi indüklerler. Son yapılan in-vivo çalışmalarda GrA ve GrB yokluğunda bile influenza spesifik sitotoksik T lenfositlerinin in vivo hedef hücreyi lizise uğrattıkları bulunmuştur. GrA proinflamatuvar sitokinlerin indüksiyonu ile ilişkilidir, bunun yanı sıra sitotoksik olmayan aktivite de gösterirler. Bu sitotoksik olmayan aktivite ile protein sentezinde rol alan viral proteinler ve konak hücre proteinleri ayrıştırılarak viral replikasyonunun inhibisyonu sağlanır. Sitotoksik T lenfositlerinin Fas/FasL etkileşimi ile enfekte hücrelerin apoptozisini indükledikleri bilinmektedir. Daha da ötesi, sitotoksik T lenfositleri antiviral aktivitede rol alan MHC ekspresyonunu stimüle etme kapasitesine sahiptirler.

Enfeksiyon sonrası, virus-spesifik sitotoksik T lenfositleri lenfoid organlarda ve sirkülasyonda bulunur. Bu hücreler T hücreleri tarafından üretilen IL-17 ve dendritik hücreler vasıtasıyla kontrol altında tutulurlar. Bu hafızalı sitotoksik T lenfositleri sonraki influenza virus enfeksiyonlarına karşı korumada rol alırlar. İnfluenza virus enfeksiyonu ile uyarılan sitotoksik T lenfosit hücreleri direkt olarak NP, M1 ve PA proteinlerine karşı yönelirler. Bu proteinler yüksek derecede korunmuştur ve bu yüzden sitotoksik T lenfosit cevabı influenza A virusunun farklı alttipleri arasında bile yüksek düzeyde çapraz reaktivite gösterir^(77,78,83).

2.8. İnfluenza Viruslarının İmmuniteden Kaçışı

İnfluenza virus proteinleri doğal immun sistemin farklı komponentlerini bağlar ve inhibe ederler. İnfluenza virus genomunun yüksek oranda mutasyona uğraması sonucu oluşan antijenik olarak farklı influenza virusları önceden gelişmiş adaptif humoral ve hücrel immun repertuvar tarafından ya hiç tanınmaz veya çok az tanınır.

2.8.1. Doğal İmmuniteden Kaçış

İnfluenza virusunun NS1 proteininin viral RNA'ya bağlanma özelliği vardır, böylece viral RNA'ya bağlanarak interferon-1 sentezini indükleyen Toll-benzeri reseptörlerin ve RIG-1'in viral RNA'yı tanınması engellenebilmektedir. NS1 proteinleri ayrıca üç parçalı motif içeren protein 25'e (tripartite motif-containing 25; TRIM25) bağlanarak RIG-1 aktivasyonunu inhibe eder veya RNA bağımlı protein kinaza bağlanarak (RNA-dependent protein kinase; PKR) kompleks oluşturup fonksiyonunu inhibe edebilirler. Normalde PKR aktivasyonu ortamda çift zincirli viral RNA'nın varlığına bağlıdır ve translasyonun inhibisyonu böylece mümkün olmaktadır ve viral protein sentezinin inhibisyonu sağlanmaktadır. Normalde, PKR aktivitesi "heatshock" protein 40 (hsp40) ile kompleks oluşturan hücrel inhibitör P58^{IPK} ile düzenlenir. Son zamanlarda influenza virus NP'nin bu kompleksle etkileşime girerek P58^{IPK}'nin ayrışmasına ve aktivasyonuna neden olduğu gösterilmiştir. Ardından bu faktör PKR'yi inaktive eder ve böylelikle hücredeki antiviral durum inhibe edilerek viral protein sentezi ve virus replikasyonu etkinleşir. Ek olarak, influenza virus M2 proteinini, inhibitör ve HSP40'a bağlanarak P58^{IPK} proteinini inhibe eder. Bu durum protein sentezinin durması, hücre apoptozisin indüksiyonu ile sonuçlanır ve yeni oluşmuş virus partikülleri serbest kalır⁽⁸⁴⁾.

İnfluenza PB1-F2 proteinini 66. pozisyonunda bulunan serin aminoasidi aracılığı ile MAVS'a (mitochondrial antiviral signaling protein; mitokondrial antiviral sinyal proteini) bağlanıp inaktive ederek Tip I interferon üretimini inhibe eder. HPAI H5N1 virusları ve 1918/A/H1N1 virusu yüksek virulans ile ilişkili olan PB1-F2 polimorfizmine sahiptir. İlginç olan ise, 2009/H1N1 enfeksiyonunda yüksek düzeyde pro-inflamatuvar sitokinlerin üretimi olmasına karşılık virülansa etkisi minimal

düzydedir. PB1-F2 proteini apoptozisin uyarılması ile de ilişkilidir, bunun yanı sıra influenza virusunun PA ve PB2 polimerazlarının fonksiyonu üzerinde sinerjik etkiye sahiptir. PB2 ile MAVS etkileşerek PB1-F2 proteinlerine benzer şekilde Tip I interferon üretimini inhibe eder. PB2 ayrıca normalde interferon-beta üretimini uyaran interferon promoter stimulator 1'e (interferon-beta promoter stimulator 1; IPS-1) bağlanarak IPS-1'i inhibe eder^(85,86).

2.8.2. Humoral İmmuniteden Kaçış

İnfluenza virusunun HA antijeni humoral cevapta ana hedeftir. HA antijeninde oluşan değişiklikler ile virus humoral immuniteden kaçmaktadır. İnfluenza viruslarının hata okuma ve düzeltme ("proof-reading") özelliği olmadığından viral replikasyon sırasında genomda rastgele nokta mutasyonlar meydana gelir. HA proteininde nokta mutasyonlar birikerek oluşan antijenik değişime "Antijenik Drift" adı verilmektedir. Şimdiye kadar influenza HA proteinin globüler baş kısmında 5 antijenik bölge belirlenmiştir. Bu bölgelerdeki değişimler antijeniteyi değiştirmekte veya HA'nın reseptöre bağlanma affinitesini artırmaktadır. Antijenik driftin aksine, antijenik shift virus antijenitesinde daha dramatik sonuçlar doğurmaktadır. Yeni bir influenza virus alttipinin (H5N1, H7N7 ve H9N2) insan popülasyonuna girişi görülmekte veya insan influenza A virusunun hayvan influenza A virusu ile genetik reassortment oluşturması yepyeni bir suşun ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Sonuncusu ancak iki virusun aynı hücreyi enfekte etmesi ile ortaya çıkar ve bu yeni çıkan alttip ebeveyn virusların gen segmentlerini taşır. Mevsimsel influenza virusuna karşı oluşan antikorlar yeni alttipi çok az tanırlar ve dolayısıyla sınırlı koruma söz konusudur^(87,88).

2.8.3. Hücresel İmmuniteden Kaçış

Virusa karşı spesifik sitotoksik T lenfositleri (cytotoxic T lymphocyte; CTL) tarafından tanınan epitoplara selektif baskı altındadır. Nükleoprotein (NP) geninde meydana gelen sinonim ve sinonim olmayan mutasyonların oranı sitotoksik T

lenfositleri tarafından tanınan epitoplardakine göre daha düşüktür. İnfluenza A/H3N2 viruslarının evolüsyonu sırasında spesifik CTL'lerin tanıdığı epitop bölgelerinde meydana gelen aminoasit değişimlerinin kaçışı sağladığı belirlenmiştir. İlginç olan bir diğer durum ise, NP epitoplarında arginin yerine glisin gelmesi (R384G) görülmektedir ve bu mutasyon viral yapıyı değiştirmekte ve bu yolla T hücrelerinden kaçış mümkün olabilmektedir^(87,88).

2.9. İmmunoterapi

İnfluenza viruslarına karşı kullanılan antiviral ilaçlara karşı hızla direnç geliştiğinden dolayı farklı antiviral terapilere ihtiyaç vardır. İmmun cevap hakkında bilgi edinmek influenza virus enfeksiyonlarına karşı immunterapötik ilaçların gelişimini birlikte getirecektir. HA sap kısmına ve M2 domainine karşı son zamanlarda geliştirilen monoklonal antikorlar umut verici gelişmeler olarak görülmektedir. HA'nın sap bölgesi antiviral ilaçlar içinde hedef bölge gösterilmekte ve virusun endozomda konformasyonel değişiminin engellenmesi ile bunun mümkün olacağı düşünülmektedir. İnfluenza virus enfeksiyonlarına karşı proteaz ile aktive olan reseptör 2 (Protease-activated receptor-2; PAR2) agonistleri, tip I interferonlar ve sitatinler gibi diğer immunomodulator ajanlar ile tedavi seçenekleri araştırılmaktadır.^(77,89)

2.10. İnfluenza Aşıları

İnfluenza virus aşılarında canlı zayıflatılmış aşı, virusun düşük sıcaklıkla replikasyona adapte edilmesi ile sağlanmaktadır. Böylece soğuğa adapte viruslar aşı maksadıyla özellikle Amerika'da kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra NS-1 geninde meydana gelen mutasyonlara dayalı kaçış özelliği kullanılarak da canlı zayıflatılmış aşılar denenmektedir. M1 protein modifikasyonu ile de viruslar zayıflatılabilmekte ve aşıda kullanılabilirler. Bu tip viruslarla enfekte hayvan modellerinde humoral ve hücrel cevap homolog ve heterolog influenza virus enfeksiyonlarına karşı ciddi koruma göstermektedir. Canlı zayıflatılmış aşılar sadece serum antikorlarını artırma

değil, aynı zamanda mukozal immün cevabı ve bunun yanı sıra hücresel immün cevabı da güçlendirmektedirler.

2.10.1. Humoral İmmuniteyi Uyarıcı İnfluenza Aşıları

Geleneksel inaktif aşıların hedefi HA'nın globular baş kısmına yönelik antikor cevabını artırmaktadır. HA'nın sap bölgesi, M2 protein ve NP alternatif aşı adayları olarak görülmektedir ve amaç virusa karşı spesifik antikorların influenza enfeksiyonu sırasında kuvvetli uyarılmasıdır. İnfluenza'ya karşı korunmada en etkili yöntem aşıdır.

Ülkemizde uygulanan influenza aşısı üç viral suşa karşı antijenler içeren trivalan inaktif influenza aşısıdır (Trivalent Inactivated Influenza Vaccine; TIV). Trivalan aşılar influenza A(H3N2), A H1N1 ve influenza B gibi 3 farklı influenza virus suşu içerir. İnfluenza aşısı tipik olarak, iki influenza A virus alttipine ve bir influenza B virus suşuna yöneliktir. Grip aşısı, virusun genetik ve antijenik yapısını değiştirmesi sebebiyle her yıl yenilenmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization; WHO) tarafından her yıl sık görülen grip virusu alttiplerin belirlenerek, o yıla özel virusların antijenik yapısını içeren influenza aşısı üretilmektedir. Bu sezon 2013-2014 mevsimsel trivalan influenza aşısı "A/California/7/2009 (H1N1)pdm09-like virus; A(H3N2) virus antigenically like the cell-propagated prototype virus A/Victoria/361/2011 ve B/Massachusetts/2/2012-like virus" içermektedir. Aşı her yıl Eylül ayının ikinci haftasından itibaren yapılmaya başlanır ve salgınların görüldüğü Aralık-Nisan aylarından önce korunmanın sağlanması için Kasım ayına kadar yapılması önerilmektedir. Grip aşısı 6 ay- 9 yaş arasındaki çocuklara ilk kez yapıldığında en az bir ay ara ile 2 doz şeklinde uygulanır. Daha sonraki yıllarda tek doz yeterlidir. Dokuz yaşından büyük çocuklarda ve yetişkinlerde tek doz yapılır

Grip aşısının etkinliği kişiden kişiye ve yıldan yıla göre değişir. Genç erişkinlerde aşının hastalığı önleme oranının %70-90 arasında olduğu belirtilmektedir. Yaşlı kişilerde koruma oranı daha düşük (%60) olsa da, bu oran yeterli kabul edilir. Altı ay ve yukarıdaki bütün kişilere yıllık influenza aşılama yapılması tavsiye edilir.

Ciddi influenza ile ilişkili komplikasyonlar için yüksek riskte olan kronik pulmoner (astım dahil), kardiyovasküler, renal, hepatik, nörolojik, hematolojik veya metabolik hastalığı (diabetes mellitus dahil) olan kişiler, bağışıklık sistemi yetmezliği olanlar, grip sezonunda gebe olan veya olacaklar, aşırı şişman olanlar, uzun süreli aspirin tedavisi alan çocuk ve adolesanlar (6ay-18 yaş) ve bu yüzden influenzadan sonra Reye sendromu gelişimi için riskte olabilecekler, 50 yaşın üstündeki kişiler, bakım evinde kalanlar, sağlık personeli ve riskli kişilerle aynı ortamda yaşayan sağlıklı kişilerin aşılanması önerilmektedir^(90,91).

2.10.2. Hücresel İmmuniteyi Uyaran İnfluenza Aşıları

Kros-reaktif T hücre cevabının indüklenmesi ümit verici bir yaklaşım olarak görülmektedir ki bu özellikle geniş spektrumlu aşıların gerçekleştirilmesi için beklenen bir aktivasyondur. Sitotoksik T lenfositlerin direkt NP ve M1 proteinlerine yönelmesi ve influenza A viruslarının farklı alttiplerinde bile bu proteinlerin yüksek düzeyde korunması, aşılar da kullanılması için aday proteinler olmasını sağlamıştır. CTL cevabının verimli biçimde indüklenmesi için hedef protein sitozole yayılmalı, endojen antijen sürecine uyması ve MHC sınıf I antijen prezentasyonunun gerçekleşmesi gerekmektedir. Bunu başarabilmek için DNA aşısı, rekombinant viral vektörler veya canlı aşılar gibi özel antijen sunum sistemi gerekmektedir. HA ve NP eksprese eden DNA aşıları ile humoral ve kros-protetif CTL cevabının indüklenmesi hayvan modellerinde gösterilmiştir. İnfluenza NP ve M1 genlerini eksprese eden poksviral vektör insanlarda CTL cevabını indüklemek maksadıyla denenmiştir^(77,92).

2.11. İnfluenza A pandemik H1N1 2009 virusu

İnfluenza A ve B tipi mevsimsel gribe neden olur. Her yıl populasyonun genellikle %5-20'si influenzaya maruz kalmaktadır ve her yıl 250000-500000 ölüm meydana gelmektedir. Pandemi sırasında ise mortalite oranı daha da yükselmektedir. Pandemi genellikle yeni bir influenza A alttipinin ortaya çıkması ile başlar ki insan

populasyonunun bu yeni genotipe karşı daha önceden var olan bir immun koruması yoktur veya çok azdır. Pandemiler düzensiz aralıklarla ortaya çıkmaktadır ve 16. yüzyıldan beri her 10 ile 40 yıl arasında 20’den fazla pandemi meydana gelmiştir. En büyük salgın 1918(H1N1) pandemisidir.

Şimdiye kadar insanlarda sirküle olan üç mevsimsel influenza A virusu mevcuttur, bunlar H1N1, H1N2 ve H3N2’dir. Pandemi viruslarının belirmesinin sebebi H2 veya H5 gibi yeni hemagglutinin tiplerinin ortaya çıkmasıdır. Mevsimsel H1N1 virusundan farklı olan yeni H1N1 virus ilk kez Nisan 2009’da Güney Amerika’da tanımlanmıştır, hızla insandan insana bulaş göstermiştir. Mart başında Meksika’da yaygın hastalığa neden olmuştur. Başlangıçtan itibaren domuz orjinli virus olarak kabul edilmiştir ve 11 Haziran 2009’da virus yayılımı 70’den fazla ülke tarafından bildirilmiştir. Dünya Sağlık örgütü bu virusu influenza A’nın alt genotipi (H1N1/2009) olarak tanımlamıştır. H1N1 2009, 1.5 yıl süreyle evcil domuzlarda mevcut olan 3 virusun reassortment sonucu ortaya çıkmıştır, nerede, ne zaman ve nasıl reassortment olduğu ise net değildir. Sekiz segmentin altısı domuz H1N1 virusundan kaynak almaktadır ve 1999-2000 yılları arasında Kuzey Amerika’daki domuzlardan izole edilmiştir ki bunlara “triple reassortant” virusları da denmektedir. Bu triple reassortment 1999’da ortaya çıkmıştır ve domuz virusuna ait segmentleri mevcuttur. Buna karşın diğer iki gen segmenti ise iki farklı Avrasya domuz virusundan gelmektedir. N geni Avrupa H1N1 virusunda bulunana (1991-1993) oldukça yakındır. Matriks protein geni ise 1999-2000 yılları arasında Asya’da izole edilen H3N2’dekine oldukça yakındır. Dolayısıyla 8 genetik segmentin kökeni 3 farklı domuz ilişkili virusdan kaynaklanmaktadır. İki durumu izah etmek oldukça güçtür. Birincisi; birbirleriyle yakın 8 segmentin mevcut olduğu virus izolatları insan pandemisi başlamadan 10 yıl önce toplanmıştır. Bu zaman aralığında segmentler nerede oluşmuştur. İkincisi; Avrupa ve Asya virusları nasıl oluyorsa Amerika virusları ile reassorte olmuştur. Normalde Atlantik/Pasifik boyunca domuz viruslarında çok kısıtlı bir karışım söz konusudur. Bu iki cevaplanmamış soru virusun evrimi, orijini ve insan aktivitelerinin bu evrimdeki rolü üzerine bir takım spekülasyonların ortaya çıkmasına neden olmuştur⁽⁹³⁾.

Mevsimsel influenza vakalarının sadece %2’si 65 yaş üzeri bireylerde görülür. Ayrıca serolojik çalışmalar yaşlı insanların çapraz koruyucu özellik taşıyan antikolar

taşıdığı ve bunun da geçmiş aşılama veya H1 virusları ile enfeksiyondan köken aldığı belirtilmektedir.

Pandemik enfeksiyonların büyük bir kısmı ılımlı geçmektedir. Asemptomatik ve çok hafif enfeksiyonlar, özellikle çocuklarda beklenenden oldukça yüksektir. Londra ve Birmingham'da enfeksiyonun ilk dalgası 2009 yazında görülmüştür, yapılan serolojik testler çocukların %30'unun pandemik viruslarla enfekte olduğunu ortaya koymuştur. Bu sonuç klinik tanıya göre 10 kat fazladır.

Bu pandemide özel risk faktörleri belirgin şekilde ortaya çıkmıştır ki bu risk faktörleri geçen pandemilerde mevcut değildir. Nörolojik gelişimin gecikmesi, hamilelik ve obezite grip enfeksiyonlarında mortalite ve morbiditeyi artıran potansiyel kofaktörler olarak görülmektedir. Buna karşın, her 3 risk faktörü geçen pandemide minör risk faktörü olarak görülmüş, fakat sonradan majör risk faktörü olduğu bildirilmiştir^(93, 94).

HIV enfeksiyonunun belirgin bir risk faktörü olduğu düşünülmektedir. H1N1 2009 enfeksiyonunda HIV statüsünün çok ciddi bir etkisinin olmadığı öne sürülsede, CD4 sayısındaki düşüş enfeksiyonun gidişatını kötüye doğru çekebilir.

Daha önce de tartışıldığı gibi, influenza virus evrimsel olarak yüzey proteinlerinin antijenitesinde hızlı değişiklik gösterebilmekte, böylece aşılama veya geçirilmiş enfeksiyondan kaynaklı antikor cevabı yetersiz kalmaktadır. Buna karşın, şimdiye kadar H1N1 2009 virusu çok düşük düzeyde genetik değişim göstermiştir. Güney Yarım Küre'de kullanılan aşıdaki viruslar Kaliforniya kökenlidir (pandeminin başladığı bölge) ve yeni izolatlarla nazaran kullanımı daha fazladır. Bu düşük mutasyon düzeyi ilk pandemi dalgasında seleksiyon baskısının sınırlı olduğunun göstergesidir⁽⁹³⁾.

Mevsimsel H1 virus sirkülasyonu 2010'a kadar oseltamivire karşı dirençli bulunmuştur ve bu direnç aynı zamanda geçen iki mevsimsel grip döneminde de görülmüştür. N proteinin aktif bölgesinde meydana gelen tek aminoasitlik değişim dirence neden olmaktadır. Mart 2010'a kadar test edilen 5462 pandemi virusunun 40'ında oseltamivire karşı direnç mutasyonu taşındığı tespit edilmiştir. Oseltamivir direncinin ortaya çıkması özellikle immun yetmezliği olan hastalarda büyük risk

faktörüdür ve özellikle hastanın virusa maruz kaldıktan sonra düşük profilaktik dozajın kullanılması ile alakalıdır⁽⁹³⁾.

2.12.Yüksek Patojeniteli Avian İnfluenza Virus H5N1 Sürveyansı

Yüksek patojeniteli avian influenza virus H5N1 1996'dan beri Asya'da bulunmaktadır ve Güney Çin'de H5N1 virusu (Goose/GD/96-like) ilk kez kaz kusmuğundan izole edilmiştir. Asya'da 2003'den beri, çoklu genetik reassortment olayları olmakta ve farklı antijenik ve genotipik değişimler özellikle evcil su kuşlarında ve kümes hayvanlarında gerçekleşmektedir ki bu Afrika, Avrupa ve birçok Asya ülkesinde söz konusudur. H5N1 ayrıca bu bölgelerde vahşi kuşlardan da izole edilmiştir. Şimdiye kadar, 60 ülkeden 492 HPAI H5N1 vakası bildirilmiştir ve bunların 291'i (%59.2) ölümle sonuçlanmıştır. Bu virus zincirinde insandan insana bulaşma gerçekleşmemiştir, H5N1'in hızlı coğrafi yayılımı söz konusudur, insanlarda yüksek vaka-fatalite oranı ve kümes hayvanlarında %100'e yakın mortalite sebebi olması dünya genelinde yoğun sürveyans çalışmasını artırmıştır. Virus izolasyonu hala altın standart olma özelliğini korumasına rağmen, sürveyans çalışmalarının çoğu moleküler metod olarak real-time RT-PCR, multipleks PCR ve DNA array metotları ile gerçekleştirilmiştir.

Amerika Tarım Departmanı 2006'da, birçok eyalet düzeyinde vahşi yaşam platformu ile işbirliği yaparak pasifik rotasını takib eden kanatlılarda HPAI H5N1 sürveyansı araştırması yapmıştır. H5 real-time PCR kullanılarak yaklaşık 20.000 örnek bu çalışmada araştırılmış olup, 32 örnekde H5N2, H5N3 ve H5N9 tespit edilmiştir, fakat H5N1'e rastlanmamıştır. Avian influenza viruslar 2004'de Avrupa vahşi kuş tarama programının bir parçası olmuştur ve Alman Federal Devleti tarafından ulusal referans laboratuvarlarında incelenmeye başlanmıştır. Kuzey Almanya'da birçok akuatik kuş türünden sahil boyunca taze dışkı materyali toplanmış, 1991 örnek incelemeye tabi tutulmuş, rRT-PCR matriks gen metodu ile araştırma yapılmıştır. Hong Kong'da H5 rRT-PCR metodu kullanılarak 82 genusa ait ölü vahşi kuşlarda H5N1

enfeksiyonu araştırılmış ve 2006 Ocak ve 2007 Ekim döneminde 17692 kloak ve trake sürüntü örneği 33 HPAI H5N1 virusu tespit edilmiştir⁽⁴³⁾.

2.12.1. Epidemiyoloji

Su ördekleri bütün influenza A virusları için doğal rezervuardır. Viruslar evrimsel olarak ilk önce bu kuş konaklarda var olmuşlardır, dolayısıyla kuşlar da enfeksiyon asemptomatiktir ve çok sayıda virion barındırırlar. İnsan avian influenza virus enfeksiyonları virusların kuşlardan insanlara direkt bulaşması ile olur. A/H7N7 ile enfekte sporadik vakalar direkt hayvandan insana bulaşma veya laboratuvar kazaları ile gerçekleşmiştir, bu tip enfeksiyonların çoğunluğu konjuktivit ile sonuçlanmıştır.^(95,96).

Avian influenza viruslarının insanları direkt enfekte ettiğine dair kanıtlar ilk olarak 1997 yılında Hong Kong'daki salgınla anlaşılmıştır, bu salgında bildirilmiş 18 vaka ve 6 ölüm söz konusudur, salgının önüne 1.5 milyon tavuğun itlaf edilmesiyle geçilmiştir. A/H5N1 enfeksiyonları 2001 ve 2002 tekrar gözlemlenmiştir, fakat insanlarda enfeksiyon söz konusu değildir.

Güney Kore'de, Aralık 2003'de A/H5N1 enfeksiyonu gözlemlenmiştir. Kısa süre sonra Vietnam, Japonya, Tayland, Laos, Kamboçya, Çin, Endonezya ve Malezya'da epidemi gelişmiştir. Vietnam, Tayland, Kamboçya, Endonezya ve Çin'de insanlara direkt bulaşma 3 dalga şeklinde görülmüş, 133 insana bulaş olmuş ve 68 ölüm gerçekleşmiştir. Bunun yanı sıra Tayvan'da virülansı düşük vakalar (A/H5N2, A/H7, A/H9) görülmüştür. A/H5N1 virus enfeksiyonları epidemisi iki yolla gerçekleşmiştir. Birincisi coğrafi dağılım, Güney Çin, insan ve avian influenza virusları için merkez kabul edilmektedir. Avian türlerinde etkin yüksek patojeniteye sahip avian viruslarının sirkulasyonu evcil hayvanlar ve çiftlik çalışanlarındaki vakalar en çok bu bölgeden bildirilmiştir. A/H5N1 virus enfeksiyonları 2004'den beri kuzey ve batı sınırları arasındaki bu bölgede görülmektedir ve avian enfeksiyonları Batı Çin, Moğolistan, Rusya, Kazakistan, Türkiye ve Romanya'dan bildirilmiştir. Bu avian viruslarının yukardaki bölgelerde var olması oldukça yüksek sayıda popülasyonun tehlikede

olduğunu göstermektedir. İkincisi ise, virusdaki genetik değişim ve hayvanların değişen ekolojisi kanıt sayılmaktadır. Hong Kong'daki su ördeklerinde 2002'den beri A/H5N1 enfeksiyonları görülmeye başlanmıştır. Güneydoğu Asya'da 2003-2004 yılları arasında toplanan A/H5N1 virusları göstermiştir ki bu viruslar ördeklerde sadece intestinal bölgeyi değil aynı zamanda solunum yolunu da enfekte edebilmektedir ve viral yük trakeada kloaka nazaran daha yüksektir. Bu virusların insanlara bulaşta virülanslarının arttığı bilinmektedir, buna sebep ise PB2'deki aminoasit değişimi (pozisyon 701'de aspartik asidin asparajine ve pozisyon 627'de glutamik asidin lizine değişimi) ile açıklanmaktadır⁽⁹⁷⁾. Dissemine ekstrapulmoner enfeksiyonlar farelerin beyinde gösterilmiştir. Güney Çin'de 1997'den beri A/H5N1'in Z genotipi dominant virus olarak belirlemiştir ve bunun yanı sıra birçok Z genotipi suşunun M2 gen mutasyonu taşıdığı belirlenmiştir, dolayısıyla adamentenlere karşı direnç söz konusu olabilmektedir.

Diğer avian influenza viruslarının insanlarda asemptomatik enfeksiyon yaptığı son yıllarda gözlemlenmiştir. Hong Kong'da 1999'da A/H9N2'nin insanlarda enfeksiyonu iki vaka ile kanıtlanmıştır. Bu viruslar influenza benzeri hastalık yapmaktadır. Kanada'da 2004'de H7N3 enfeksiyonu iki kümes işçisinde belirlenmiştir. Hollanda'da H7N7 avian influenza enfeksiyonu 2003'de gözlemlenmiştir ve 89 konfirme edilmiş vaka ve 1 ölüm bildirilmiştir^(98, 99).

İnsanlara avian influenza virus bulaşı mukoz membranda var olan enfeksiyöz sekresyonla direkt temas ve kontamine çiftlik ürünleri olmaktadır. Girişte ana portal üst solunum yolu ve konjunktivadır. Günümüzde, avian influenza viruslarının insandan insana bulaşması sporadik vakalar halinde az sayıda gerçekleşmektedir. A/H7N7 ve A/H5N1 enfeksiyonlarının insandan insana bulaştığına dair kanıtlar çeşitli ülkelerde yapılan çalışmalarda mevcuttur. Özetle, avian influenza viruslarının değişen epidemiyolojisi ve patojenitesi global epidemilerde belirleyici role sahiptir⁽¹⁰⁰⁾.

2.12.2. Klinik Yönetim

Klinik belirtiler avian influenza virusunun alttipine bağlıdır. A/H7N7 enfeksiyonları konjonktivit ve/veya influenza benzeri hastalıkğa sebep olmaktadır. Hollanda’da 2003’de meydana gelen salgında 89 vakanın 82’sinde (%92.1) konjuktivit gelişmiştir. Bir veterinerin çiftliği ziyareti sonrası 2 gün içerisinde influenza benzeri hastalık gelişmiştir, tedavi edilmemesi ile 7 gün içerisinde pnömoni gelişmiş ve 5 gün sonra akut respiratuvar distres sendromu (ARDS) sebebiyle ölüm gerçekleşmiştir.

Hong Kong’da 1997’de A/H5N1 salgınında, influenza benzeri hastalık, hastalığın yayılmasının başlangıcında görülmüştür ve konjuktivit bazı hastalarda görülmüştür. Hastaların yaş ortalaması 1 ila 60 arasındadır ve 18 hastanın 11’i 14 yaş altıdır. Bazı hastalarda gastrointestinal semptomlar, abdominal ağrı, diare ve mide bulantısı görülmüştür. Onsekiz hastanın 7’sinde influenza benzeri hastalık, 11 hastada pnömoni, 6’sında ise ARDS’den ölüm gerçekleşmiştir. Rey sendromu ve pulmoner hemoraji diğer komplikasyonlardır. İlerlemiş yaş, uzun semptomatik peryod, pnömoni, lökopeni ve lenfopeni hastalığın ilerlemesi ile ilişkili diğer risk faktörleridir. Amantadine 8 hastaya verilmiştir, fakat klinik verimliliğine dair bilgi verilmemiştir^(96,101).

2.12.3. Klinik ve Laboratuvar Tanısı

A/H5N1 enfeksiyonlarının patognomonik işaretleri ve semptomları yoktur. İnfluenza benzeri hastalıkların, kazanılmış pnömoni veya ARDS yönünden klinik laboratuvar veya radyolojik bulgular yönünden ayırt edilemez. Avian influenza virusu şüphesi kazandıran bulgular endemik bölgelerle epidemiyolojik bağlantı veya kümes hayvanlarıyla temas geçmiştir. Dolayısıyla klinisyenler şüpheli vakalarda seyahat geçmişi ve hayvanlarla temas üzerinde durmaktadırlar. Temas veya seyahat geçmişi olan hastalar radyolojik ve mikrobiyolojik araştırmaya tabi tutulurlar. İnfluenza benzeri enfeksiyon geçiren hastalar izole edilebilir ve bu süreç laboratuvar araştırmaları ve gözlemlerin sonuçlanmasına kadar devam eder. Avian influenza virus enfeksiyonu için oseltamavir ve geniş spektrumlu antibiyotikler kullanılabilir.

Avian influenza viruslarının kesin tanısı klinik örneklerden pozitif viral kültür veya biyogüvenlik seviye 3 olan laboratuvarlarda avian influenza virusa karşı serumda nötralize edici antikor titresinin 4 kata ulaşmasının tespiti ile sağlanır. Konvelesan serum hastalığın başlamasından 14 gün sonra alınır. Nötralizasyon testi Baculovirusda eksprese edilen rekombinant H5 western blot testi ile konfirme edilir.

İnfluenza virus tanısı için boğaz sürüntüsü, nazofarinks sürüntüsü veya aspirat örneklerinde antijen tespiti veya RT-PCR kullanılabilir. Örnekler mümkünse antiviral terapi başlamadan önce alınmalıdır. Viral antijenlerin tespiti immunfloresan antikor tespiti, enzim immunoassay veya immunkromotografi ile yapılabilir. Ne yazık ki, bu ticari kitler nükleoproteinleri belirlemekte olup influenza A virusları ile insan avian virusları veya alttipleri (A/H5,A/H7,A/H9) ayırt edememektedir. A/H5N1'in belirlenmesinde bu kitlerin sensitivitesi %33.3-85.7 arasında değişmektedir. İnfluenza açısından pozitif olan örneklerin alt genotipinin belirlenmesi için moleküler tanı testleri kullanılmalıdır⁽¹⁰²⁾.

RT-PCR avian influenza viruslarının belirlenmesinde en güvenilir test olarak görülmektedir. RT-PCR testi için birçok farklı protokoller tanımlanmış olup influenza A viruslarını tanımlayabilir veya H5 ve N1 genlerini spesifik olarak belirleyebilir. Plazmadan ekstrakte edilmiş RNA'da bu test uygulanabilir, ayrıca respiratuvar sekresyona ek olarak dışkıda, dokularda, serebrospinal sıvılarda da bu test uygulanabilir. Revers transkripsiyona dayalı polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan ideal primer kombinasyonu için kesin öneri mevcut değildir ve sonuçlar viral kültür ile kombine edilmelidir⁽¹⁰³⁾.

2.13. Antiviral Tedavi

Adamantenler (Amantadine ve Rimantadine) ve nöraminidaz inhibitörleri (Oseltamivir ve zanamivir) influenza tedavisinde ve kemoprofilaksiste yaygın kullanılan ilaçlardır. Adamantenler influenza A virusuna karşı aktiftir, nöraminidaz inhibitörleri ise influenza A ve B'nin her ikisine karşı aktiftir. Adamantenler avian influenza virus

enfeksiyonlarında tercih edilen ilaçlar değildir. Adamanten dirençli suşlar tedavi sonrası hızla ortaya çıkar, bulaşıcı ve patojeniktirler. Amantadinle tedavi edilen influenza A virusu ile enfekte hastaların %30'a varan kadarının bazen tedavinin başlamasından 2-3 gün kadar kısa bir süre sonra dirençli virusları yaydıkları tespit edilmiştir.

İnfluenza viruslarına karşı aktivitesi olan antiviral ilaçlar influenzanın kontrolünde influenza aşısına önemli yardımcıdır. Antiviral tedavi influenza komplikasyonlarının riskini azaltabilir ve hastaneye kaldırılmış ciddi komplikasyonlar veya progressif hastalığı olan veya influenza komplikasyonu için yüksek riskte olan doğrulanmış veya şüpheli influenzası olan herhangi bir hastada mümkün olduğu kadar erken kullanımı önerilir.

Antiviral tedavinin faydaları tedavi hastalığın başlangıcında ne kadar erken verilirse o kadar fazladır. Hastalığın başlangıcından 48 saat içinde tedavi uygulanmalıdır. Antiviral tedavi ciddi komplike veya progressif hastalığı olan ve hospitalize hastalarda hastalığın başlangıcında 48 saat veya sonrasında verildiğinde de hala faydalıdır. Zanamivir ve oseltamivir şimdilik influenzanın önlenmesi veya tedavisi için önerilir. Zanamivir ve oseltamivir hem influenza A hem de influenza B'ye karşı aktiftir. Zanamivir 7 yaş ve üstü kişilerde komplikasyonu olmayan influenza tedavisi için önerilir. Beş yaş ve üstü için kemoprofilaksi amacıyla kullanılabilir. Oseltamivir 1 yaş ve üstü kişilerde tedavi ve kemoprofilaksi için kabul edilir. Sağlıklı erişkin ve çocuklara profilaktik olarak verildiğinde oseltamivir ve zanamivir influenza A ve influenza B virus enfeksiyonlarında hastalıktan korunmada %70-90 etkilidir^(104,105).

İnsan influenza enfeksiyonlarında antiviral terapinin verimliliği direkt olarak zamanlama ile ilişkilidir. Yüksek düzeyde koruma nöraminidaz inhibitörlerinin hastalığın ilk 48 saatinde uygulandığında görülmektedir, Enfeksiyondan 60 saat sonraki uygulamalarda verimlilikte ciddi farklar görülmektedir. Şimdiye kadar, nöraminidaz inhibitörlerine karşı doğal dirence dair kanıt çok düşük düzeydedir. A/N1 ve A/N2 izolatları nöraminidaz inhibitörlerine karşı aşırı duyarlıdırlar ki %50 inhibitör konsantrasyon (inhibitory concentration; IC50) değeri genellikle <5mmol/L gibi çok düşüktür. Avian influenza viruslarının nöraminidaz inhibitörlerine karşı duyarlılığı değişken ve spesifik nöraminidaz tiplerine bağlıdır.

A/H5N1 (1997’de izole edilen) viruslarına karşı nöraminidaz inhibitörlerinin klinik başarısı oldukça yüksek düzeydedir. Oseltamivir dirençli A/H5N1 izolatı Vietnam’da tanımlanmıştır. Raporda influenza semptomları olan bir kız çocuğundan alındığı ve maruziyet sonrası 4 gün oseltamivir profilaksisi uygulandığı belirtilmiştir. Bu virusun nöraminidaz proteinin 274. pozisyonunda histidin-tirozin mutasyonu taşıdığı belirlenmiştir ve nöraminidaz inhibisyon konsantrasyonu IC₅₀; 90 nmol/L olarak tespit edilmiştir. Sonrasında hastaya 7 gün boyunca teröpatik doz uygulanmış ve ardından virus izolasyonu sağlanamamıştır. Sonuç itibariyle yukardaki verilere ek olarak, yüksek dozda nöraminidaz inhibitörü kullanımının direnç gelişimini özellikle çocuklarda tetiklediği bildirilmiştir. Dolayısıyla, oseltamivir dirençli A/H5N1’in görülmesi vakaların artışıyla doğru orantılıdır, bunun yanı sıra bu ilacın profilaktik ve terapötik maksatlı kullanımı da oldukça yaygın hale gelmiştir. A/H9N2 ile enfekte hayvan çalışmalarında oseltamivir ve rimantadin kombinasyonunun sinerjistik etkiye sahip oldukları belirlenmiştir ki diğer influenza viruslarının bu kombinasyona tepkileri bilinmemektedir. Daha da fazlası, A/H5N1 viruslarının yüksek virülansa sahip izolatlarının nöraminidaz inhibitörlerinin verimliliğini azalttıkları bilinmektedir. Oseltamivirin günlük yüksek doz verimi ve uzun vadeli kullanım süresi hayvanların ömrünü azaltmaktadır.

Kemoterapisi gecikmiş ve viral yükü fazla olan hastalarda artırılmış doz kullanılması önerilmektedir, ilacın düşük düzeyde oral absorpsiyonu yaygın diareye neden olabilmektedir. Bunun yanı sıra, sağlıklı bireylerde terapötik dozdan fazla oseltamivirin kullanılması belirgin yan etkilere neden olmaktadır, yüksek doz rejimlerinde potansiyel toksisite teröpatik çalışmalarla gözlemlenmelidir. Avian influenza enfeksiyonunda şayet artırılmış nöraminidaz inhibitörü kullanımının hakikaten verimli olması isteniyorsa en belirgin etki pandemik durumda görülür.

İlaç rejimine yönelik bir görüş kombinasyonlarla alakalıdır, bir nöraminidaz inhibitörü ile bir adamanten, şayet sirküle olan genotip adamantenlere karşı hassas ise bir nöraminidaz inhibitörü artı ribavirin kombinasyonları olumlu sonuçlar vermektedir. Ribavirin insan influenza A virus enfeksiyonlarında genellikle oral yolla verilir veya aeresol tarzında uygulanır. Klinik çalışmalarda sabit bir fayda gözlemlenmemiştir, ayrıca influenza A enfeksiyonlarında tercih edilen bir ilaç değildir. Ribavirinin

influenza A virusları üzerindeki etkilerine yönelik klinik veriler ve in vitro çalışmalar oldukça sınırlıdır, fakat ribavirinin mannanla güçlendirilmiş formu influenza B bulaşı bulunan farelerde mortaliteyi azalttığına yönelik bulgular mevcuttur, hatta enfeksiyondan 3 gün sonra uygulanmasına rağmen başarılı bulunmuştur ki bu durumda oseltamivir etkisizdir. Oseltamivirin ribavirin ile kombinasyonunun gecikmeli uygulaması fare modellerinde verimi artırmaktadır. Viramidin ribavirinin karboksiamidin analogu olup geniş spektrumlu antiviral aktivitesi mevcuttur. Anti-influenza aktivitesi in-vitro ve hayvan çalışmalarıyla doğrulanmıştır. Klinik kullanımı için henüz lisansı mevcut değildir⁽¹⁰⁶⁾.

Pandemik influenzaya karşı nöraminidaz inhibitörlerinin stoklanması çok önemlidir. İnsan influenza terapisinde zanamivir ve oseltamivir nöraminidaz inhibitörlerinin karşılaştırmalı kanıtlanmış faydasına karşın birçok ulusal pandemi planında ve DSÖ'nün bildiriminde tercihen oseltamivir önerilmektedir, buna sebep olarak zanamivirin düşük serum seviyesi ve insanlarda H5N1 enfeksiyonlarına dair eksik veri gösterilmektedir. Oseltamivir oral yolla alınan bir ilaçtır, buna karşın zanamivirin kuru toz şeklinde oral inhalasyon ile uygulanması genç ve çok yaşlı bireylerde problemlere neden olmaktadır, intübe hastalar veya inhalasyonu gerçekleştiremeyen vakalar çok ciddi sorunlar yaşamaktadır. Oseltamivir'in alımı daha kolay ve ciddi pnömoni veya sistemik enfeksiyonlarda daha etkilidir.

Vietnam'da A/H5N1 izolatı oseltamivir dirençli olup zanamivir'e karşı muazzam hassasiyeti söz konusudur. Zanamivir'in makul düzeyde rezervi sadece oseltamivir direnci geliştiğinde kullanımı değil aynı zamanda oseltamivir tüketimi arttığında da ikincil ilaç olarak kullanımı sağlanabilir. Zanamivir ciddi enfeksiyonu olmayan hastaların tedavisi ve profilaksisi için kullanılabilir, zira bu hastalarda kanda ilacın yüksek konsantrasyonlarda olmasına gerek yoktur. Klinik öncesi çalışmalarda, IV zanamivir'in 1200 mg/gün uygulamasında iyi tolere edildiği, yüksek kan düzeyine ve solunum sekresyon seviyesine başarılı şekilde ulaştığı tespit edilmiştir; bunun yanı sıra deneysel insan influenza çalışmalarında koruyuculuğu da sınanmıştır. Nöraminidaz inhibitörlerinin kombinasyonlarının rolü hakkında bilgi mevcut değildir, bunun yanı sıra diğer antivirallerle kombinasyonları da bilinmemektedir⁽¹⁰⁷⁾.

Viral pnömonilerde immunmodülatörlerin kullanımı kortikosteroidler ve intravenöz immunglobulin ile yapılmaktadır, Hong Kong, Vietnam ve Tayland'da A/H5N1 ile enfekte vakaların çok azında kortikosteroidler kullanılmıştır ve kortikosteroid alan vakaların 3'ünün 2'si, 7'sinin 6'sı ve 8'inin 6'sı sırasıyla ölümle sonuçlanmıştır. Elde var olan kanıtlar A/H5N1 enfeksiyonlarında kortikosteroid veya diğer immunmodülatörlerin faydalı bir role sahip olmadığını göstermektedir^(102,108).

2.14. Enfeksiyonun Kontrolü

İnfluenzaya karşı aşılama yanısıra, enfeksiyonun kontrolü için salgın zamanında risk gruplarına antiviral ilaçların verilmesi, hastalığa yakalananlara ilk 48 saat içinde ilaç başlanması ve sık el yıkanmasına özen gösterilmesi gerekir. Bunların dışında hastalığa yakalananlara solunum izolasyonu uygulanması (evde veya hastanede), hapşırma ve öksürükle etrafa virus saçmalarına engel olunması etkili önlemlerdir.

Avian influenza varlığı şüpheli veya doğrulanmamış vakalarda DSÖ temas ve damlacık önleminin primer öneme sahip olduğunu vurgulamaktadır. Hastane kökenli kazanılmış enfeksiyonlar bir yana laboratuvar kökenli kazanılmış postmortem A/H7N2 enfeksiyonları söz konusudur. Rusya'da 1977 A/H1N1 suşu laboratuvar orjinlidir. A/H2N2 suşu 2005'de, 18 ülkede incelenmek üzere laboratuvarlara gönderilmiştir. Dolayısıyla, dikkat edilmeyen ve yanlış laboratuvar koşulları pandemilere zemin hazırlayabilmektedir. Avian influenza virusları birçok dezenfektan tarafından inaktive edilebilmektedir ve DSÖ %1 sodyum hipoklorit veya %70 alkol'u dezenfeksiyon için önermektedir^(102,109).

Kümes hayvanlarının kontrolündeki tecrübe, kuşlarla temasın minimize edilmesi basit önlemler olup kesinlikle uygulanması gerekmektedir. H5 aşısının kümes hayvanlarına uygulanması bölgede virus bulaşmasının önünü kesebilmektedir, şu ana kadar lisans almış H5 influenza aşısı mevcut değildir, fakat geliştirme çalışmaları devam etmektedir. İnaktive edilmiş H5N3 aşısı daha önce insanlarda sınanmış olup iyi tolere edildiği bilinmektedir. MF-59 adjuvantı barındıran bir aşı ise gönüllülerde immunojenik özellik göstermiş ve uygulamayla birlikte nötralize edici antikorlara rastlanmıştır.

Baculovirusda eksprese edilen H5 hemaglutinin aşısı insanlarda test edilmiştir ve immunojenik özelliği mevcuttur. A/H5N1 aşısı hayvan modellerinde test edilmiştir ve koruyuculuğu ortaya çıkarılmıştır. Her ne kadar aşı geliştirilmesi önemli bir konu ise de pandemik suşun antijenik farklılıkların var olması H5N1 aşısının başarısız olmasına neden olabilmektedir. Şayet antijenik farklılığa dayalı aşı başarısızlığı söz konusu olursa yeni aşı versiyonunun 6 ayda geliştirilmesi ve ticari olarak hazır olması gerekir ki bu zaman dilimi toplu aşılama için gereklidir^(110,111).

İnsanlarda avian influenzaya karşı aşısının olmaması durumunda, antiviral kemoprofilaksi spesifik korumada tek alternatiftir. Hollanda'da yüksek riskli A/H7N7 pnömonisi salgınında yüksek riskteki kişilere oseltamivir uygulanmıştır, uygulananların daha düşük riske sahip oldukları tespit edilmiştir⁽¹⁰²⁾.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde 1 Nisan 2012 ve 30 Aralık 2013 tarihleri arasında Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Ana Bilimdalı'nın yoğun bakım, onkoloji, hematoloji, çocuk enfeksiyon, yenidoğan yoğun bakım, allerji, süt çocuğu ve büyük çocuk servislerinde, Enfeksiyon Hastalıkları Anabilimdalı ve Göğüs Hastalıkları Anabilimdalı servislerinde yatırılan ve solunum yolu enfeksiyonu tanısı konan 476 çocuk ve erişkin hastadan alınan nazofaringeal sürüntü örnekleri İnfluenza A ve B varlığını tespit için multipleks real-time PCR (Influenza A and B Real-TM, Sacace, Italy) ve DFA (Argene SA, France) ile çalışıldı. İnfluenza A virus pozitif bulunan örnekler H1N1 ve H3N2 alttipleri yönünden influenza A H1N1 ve H3N2 Real-TM PCR kiti (Sacace, Italy) ile analiz edildi. Ayrıca bütün örnekler WHO'nun önerdiği influenza A virusunun matriks gen bölgesine yönelik M30F2/08 ve M264R3/08 primerlerin kullanıldığı konvansiyonel RT-PCR ile test edildi⁽¹¹²⁾.

Çalışmaya dahil edilen hastaların demografik verileri ve klinik belirtileri hazırlanan formlara dolduruldu ve yapılacak diğer işlemler ile ilgili hasta ve ebeveynleri bilgilendirilerek rızaları alındı.

3.1. Nazofaringeal Sürüntü Örneklerinin Toplanması

Hasta ve hasta yakını örnek alma işleminin basamakları ile ilgili bilgilendirildikten sonra hastanın işlem sırasında kendini arkaya doğru çekmemesi için yaslanarak oturması sağlandı. Yaş olarak küçük olan hastalarda ise yakınlarından hastalarını kucaklarına alarak kol ve bacak hareketlerini engelleyecek şekilde sabitlemesi istendi.

İşlem sırasında ağızdan nefes alması ve gözlerini kapaması söylenen hastanın alnından tutup steril nazofaringeal naylon flocced eküvyon (Copan Diagnostics, Italy)

yüze dik açıda burun deliğine yavaşça kondu. Eküvyon, kontaminasyonu engellemek amacıyla burun iç yüzeyine değdirilmeden burun ve kulak memesi arasındaki mesafe kadar nazal boşluğun tabanına paralel şekilde direnç hissedilinceye kadar arkaya doğru ilerletildi. Direnç hissedildiğinde eküvyon 10-15 sn nazıkçe döndürülerek hücrelerin toplanması sağlandı. Hiçbir yere temas ettirilmeden yavaşça geri çekilen eküvyon, içinde 3 ml PBS (Phosphate Buffered Saline) bulunan, hastanın adı ve soyadı ile etiketlenmiş transport tüpüne kondu. DFA testi için örneğin 2 ml'si kullanıldı. Örneğin geri kalan 1 ml'si ise real-time PCR çalışılncaya kadar -80°C'de saklandı.

3.2. Direkt İmmunfloresan Antikor (DFA) Testi ile Antijen Tespiti

Nazofaringeal sürüntü örnekleri İnfluenza A ve B antijeni tespiti için DFA testi (Argene SA, France) ile analiz edildi.

3.2.1. Örneklerin İşlenmesi ve Preparatların Hazırlanması

1. Çalışma öncesinde +4°C'de saklanan örnekler buzdolabından çıkarıldıktan sonra 20 saniye yavaş bir şekilde vortekslendi.
2. Tüp içerisindeki eküvyon, üzerindeki hücreleri besiyerine aktarmak için tüp duvarına yavaşça bastırılarak çıkarıldı.
3. Örnekler 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
4. Supernatant kısmı atıldıktan sonra kalan pellet üzerine 10 ml PBS eklendi.
5. Tüpler 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Mukuslu örnekler için bu aşama tekrarlandı.
6. Supernatant kısmı atılıp tüpte kalan pellet üzerine 400 ml PBS eklenerek pipetaj yapıldı.
7. Test edilecek influenza A ve B virus için immunfloresan lamalarının iki kuyucuğuna hasta örneğinden 30 µL eklendi.
8. Lamalar 35-37°C'de tamamen kuruyuncaya kadar etüvde inkübe edildi.
9. Daha sonra hücrelerin fiksasyonu için lamalar soğuk aseton içerisinde en az 10 dakika bekletildi.

10. Lamlar oda ısısında kurumaya bırakıldı. Bu süre sonunda kuruyan lamalar çalışmaya devam edilmeyecekse ikinci aşama yapılıncaya kadar -20°C’de saklandı.

3.2.2. Mikroskopta Değerlendirme Öncesi Yapılan İşlemler

1. Çalışılacak örneklerin preparatları dondurucuda ise çıkartılıp kuruması için laminar flow kabin içerisinde karanlıkta 10-15 dakika bekletildi.
2. Steril ependorf tüpler antijen varlığı araştırılan viruslar (İnfluenza A ve B) için etiketlendi.
3. Fluorescein isothiocyanate ile konjuge virus spesifik monoklonal antikolar 1/40 oranında PBS ile dilüe edildi.
4. Lamadaki kuyucuklarda bulunan örnekler üzerine dilüe monoklonal antikordan 30 µL eklendi.
5. Antikor eklenen preparatlar 37°C’de etüvde nemli ortamda 15 dakika inkübe edildi.
6. İnkübasyonun sonunda preparatlar 5 dakika PBS ile yıkandı.
7. Preparatlar distile su içine daldırılıp çıkarılarak PBS kristallerinin uzaklaşması sağlandı.
8. Preparatlar karanlık ortamda kurumaya bırakıldı.
9. Kuruyan preparatlarda örnek kuyuları üzerine 1-2 damla mounting media damlatıldı. Lameller preparatların üzerine arada hava boşluğu kalmaması için hafifçe kenarlarından bastırılarak kapatıldı.
10. Karanlık alanda floresan mikroskop ile 25X veya 40X büyütme ile antijen varlığı araştırıldı.

3.3. İnfluenza A ve B Real-Time PCR Testi

3.3.1. RNA Ekstraksiyonu

Nazofaringeal sürüntü örneklerinden viral genom eldesi için yapılan ekstraksiyon işleminde Ribo-Sorb RNA/DNA Extraction (İnfluenza A ve B Real-TM,

Sacace, Italy) kiti kullanıldı. RNA ekstraksiyonu üretici firmanın önerilerine göre aşağıdaki gibi yapıldı.

1. Lizis solüsyonu ve yıkama solüsyonu buz kristalleri kayboluncaya kadar 60-65°C'de bekletildi.
2. Negatif kontrol tüpü dahil olmak üzere hasta numarası ile etiketlenmiş ependorf tüpleri hazırlandı.
3. Her tüpe 450 µL lizis solüsyon ve 10 µL Internal Control RNA C+ (IC RNA) pipetaj yapılarak eklendi. Tüpler oda ısısında 5 dakika inkübe edildi.
4. C_{neg} olarak etiketlenmiş negatif kontrol tüpüne 100 µL C- Negative Control, diğer tüplere ise 100 µL örnek eklendi.
5. Tüpler vortekslendi ve 5000 g'de 5 saniye santrifüj edildi. Santrifüj sonrası erimeyen örnekler maksimum hızda (12000 g) tekrar 1 dakika santrifüj edildi.
6. Yeni tüpe aktarılan supernatant üzerine iyice vortekslenmiş sorbent'ten 25 µL eklendi.
7. Tüpler 5-7 saniye vortekslendi.
8. Oda ısısında 10 dakika inkübasyona bırakılan tüpler periyodik olarak vortekslendi.
9. Örnekler 1 dk 10000 g'de santrifüj işleminden sonra supernatant bariyerli pipet ucu kullanılarak pellete zarar verilmeden alınarak atıldı.
10. Her tüpe 400 µL yıkama solüsyonu konuldu. İyice vortekslenen tüpler 1 dakika 10000 g'de santrifüj edildi ve supernatant tekrar atıldı.
11. Tüplere %70'lik etanolden 500 µL eklendi. İyice vortekslenen tüpler 1 dakika 10000 g'de santrifüj edildi. Supernatant atıldı.
12. Tüplere tekrar 500 µL %70'lik etanol eklendi. Tüpler iyice vortekslendi, 10000 g'de santrifüj edildi. Supernatant uzaklaştırıldı.
13. Her tüpe 400 µL aseton eklendi ve tüpler iyice vortekslenip 10000 g'de santrifüj edildi. Supernatant atıldı.
14. Tüpler kapakları açık olarak 60°C'de 10 dakika inkübe edildi.
15. Her tüpe 50 µL RNA-eluent eklenerek pellet tekrar süspanse edildi ve 60°C'de 10 dakika inkübasyona bırakılan tüpler periyodik olarak vortekslendi.
16. Tüpler 2 dakika maksimum hızda (12000 g) santrifüj edildi.

17. RNA içeren supernatant cDNA sentezinde kullanılmak üzere -80°C'ye kaldırıldı.

3.3.2. cDNA Sentezi

Örnek ekstraktlarından aynı gün içerisinde Reverta Reverse Transcription (Influenza A and B Real-TM, Sacace, Italy) kiti ile cDNA sentezi aşağıdaki gibi yapıldı:

1. Altı örneklik reaksiyon karışımı hazırlamak için 125 µL RT-mix içeren tüpe 5 µL RT-G-mix-1 eklendi. Karışım kısa bir süre santrifüj edildi ve 5-10 saniye vortekslendi.
2. Bu karışıma 6 µL M-MLV pipetaj yapılarak eklendi. Vorteks işlemi 3 saniye ve santrifüj işlemi 5-7 saniye yapıldı.
3. Hazırlanan reaksiyon karışımı, hasta numarasıyla etiketlenmiş PCR tüplerine 20 µL dağıtıldı.
4. Nükleik asit ekstraktları maksimum hızda (12000 g) 2 dakika santrifüj edilip supernatantların 20 µL'si dikkatli bir şekilde pipetaj yapılarak reaksiyon karışımı içeren tüplere eklendi.
5. Tüpler MJ Mini Personal Thermal Cyclers (Bio-Rad Life Science Research, France) cihazında 37°C'de 30 dakika inkübe edildi.
6. Elde edilen cDNA örnekleri her tüpe 40 µL TE-buffer eklenerek 1:2 oranında dilüe edildi. Dilüe cDNA örnekleri real-time RT-PCR testinde kullanılmak üzere -70°C'ye kaldırıldı.

3.3.3. İnfluenza A ve B Multipleks Real-Time PCR

İnfluenza A ve B Real-TM multiplex RT-PCR kitinin önerdiği protokole uyarak cDNA örnekleri kullanılarak PCR amplifikasyonu yapıldı.

1. İnfluenza A ve B Real-TM kiti buzdolabından çıkarıldıktan sonra reagenlerin erimesi beklendi. Her örnek için yeni steril ependorf tüpe 10 µL PCR-Mix-1, 5 µL PCR-mix-2-FRT ve 0,5 µL TaqF polymerase olmak üzere örnek sayısı kadar reaksiyon miksi hazırlandı. Ardından her tüpe bu reaksiyon miksinden 15 µL dağıtıldı ve üzerlerine her bir örneğe ait 10 µL cDNA eklendi.

2. Her çalışma aşamasında negatif kontrol tüpüne 10 µL DNA buffer, İnfluenza A pozitif kontrol tüpüne 10 µL cDNA influenza A C+, influenza B pozitif kontrol tüpüne 10 µL c DNA influenza B C+ ve internal kontrol DNA pozitif kontrol tüpüne 10 µL IC DNA dağıtıldı.
3. Reaksiyon tüpleri Rotor Gene Q aletine yerleştirildi. Sıcaklık profili aşağıdaki şekilde ayarlandı.

Tablo 1. İnfluenza A ve B real-time PCR sıcaklık döngüsü

Adım	Rotor Gene Q		
	Sıcaklık °C	Süre	Siklus
1	95	15dk	1
2	95	10sn	10
	54	25sn	
	72	25sn	
3	95	10sn	35
	54	30sn (FloresanTespit)	
	72	25sn	

4. İnfluenza A virus ROX kanalında, İnfluenza B virus JOE kanalında ve internal kontrol FAM kanalında tespit edildi. Örnekler için uygun floresan kanaldaki siklus eşik değeri (cycle threshold; Ct) <33 altında ve floresan eğrisi eşik çizgisini geçtiğinde sonuç pozitif kabul edildi. Örneklerle ait Ct değeri yoksa ve internal kontrole ait FAM kanalındaki Ct değeri <28 ise sonuç negatif olarak değerlendirildi

3.4. İnfluenza A H1N1 ve H3N2 Multipleks Real-Time PCR Protokolü

1. PCR reagenleri oda ısısına getirildi, her örnek için 25 µL reaksiyon miksinden biri H1N1 diğeri H3N2 testinde kullanılmak üzere 2 tüp hazırlandı.

2. Her bir örnek için iki reaksiyon miksi; 10 µL PCR-mix-1 H1N1 veya 10 µL PCR-mix-1 H3N2, 5 µL PCR-mix-2-FRT ve 0,5 µL TaqF polymerase'dan oluştu.
3. Her bir tüpe 15 µL reaksiyon miksi dağıtılıp üzerine örneklerle ait 10 µL cDNA konuldu.
5. PCR negatif kontrol tüpüne 10 µL DNA buffer, pozitif kontrol tüpüne 10 µL cDNA H1N1 veya H3N2 C+ ve internal kontrol DNA pozitif kontrol tüpüne 10 µL IC DNA eklendi. Reaksiyon tüpleri Rotor Gene Q aletine yerleştirildi. Sıcaklık profili Tablo 2'deki şekilde ayarlandı.

Tablo 2. İnfluenza A H1N1 ve H3N2 real-time PCR sıcaklık döngüsü

Rotor Gene Q			
Adım	Sıcaklık °C	Süre	Siklus
1	95	15dk	1
2	95	10sn	10
	54	20sn	
	72	10sn	
3	95	10sn	35
	54	20sn (FloresanTespit) FAM(Yeşil) JOE(Sarı) ROX(Turuncu)	
	72	10sn	

6. İnfluenza A virus H1 ve influenza virus A H3 JOE kanalında, influenza virus A N1 ve influenza virus A N2 ROX kanalında ve internal kontrol FAM kanalında tespit edildi. Örnekler için uygun floresan kanaldaki siklus eşik değeri (Ct) <25 altında ve floresan eğrisi eşik çizgisini geçtiğinde sonuç pozitif kabul edildi.

Örneklere ait Ct değeri yoksa ve internal kontrole ait FAM kanalındaki Ct değeri <26 ise sonuç negatif olarak değerlendirildi.

3.5. İnfluenza A Virus için Konvansiyonel RT-PCR Test Protokolü

İnfluenza A virusunun tespiti için WHO'nun önerdiği influenza A virusunun matriks geninin 244 bp'lik bölgesini hedef alan M30F2/08 ve M264R3/08 primerler kullanıldı⁽¹¹²⁾.

3.5.1. cDNA Sentezi

cDNA sentezi için örneğe ait 5 µL RNA ekstraktı, 100 pmol random hexamer primer ve RNaz içermeyen distile sudan oluşan 12.5 µL karışım 70°C'de 5 dakika MJ Mini Personal Thermal Cyclers cihazında (Bio-Rad, France) inkübe edildi. Ardından 1-2 dakika süreyle buz kalıbında soğutuldu. Steril bir ependorf tüpte 5X RT buffer 4 µL, 1 mM dNTP miks, RiboLock RNase inhibitör (40 U/ µL) 0.5 µL ve 200U RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase (Thermo Scientific) içeren reaksiyon karışımı buz kalıbının üzerindeki örnek tüplerine konuldu. Toplam 20 µL'lik karışım 25°C'de 10 dk, 42°C'de 60 dk ve 70°C'de 10 dk inkübe edilerek cDNA'lar elde edildi. cDNA'lar PCR testine kadar -20°C'de saklandı.

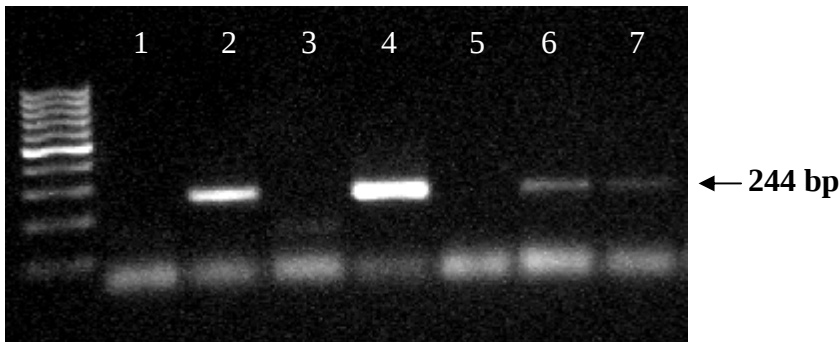
3.5.2. İnfluenza A Virus Amplifikasyonu

İnfluenza A virus amplifikasyonu 10X Taq Buffer 5 µL, 200µM dNTP miks, 1.5mM MgCl₂, 0.5 µM influenza A reverse primeri, 0.5 µM influenza A forward primeri, 2U Taq DNA Polimeraz, distile su ve 5µL cDNA içeren toplam 50 µL reaksiyon karışımının 95°C'de 15 dakika ilk denaturasyondan sonra her siklus 94°C'de 30 sn, 50°C'de 30 sn ve 72°C'de 1 dk olmak üzere 45 siklus ve son elongasyon için 72°C'de 10 dakika tutulmasıyla gerçekleştirildi.

3.6. Agaroz Jel Elektroforezi

1. Amplifikasyon ürünleri etidyum bromürlü %2 agaroz jel elektroforezi ile araştırıldı. Hem tank tamponunun, hem de agaroz jelin hazırlanmasında 107.8g Tris-Base (Sigma), 7.44 g EDTA(Sigma) ve 55 g Borik asit ile yapılan 10X Tris Borik asit EDTA (TBE) stok tamponu kullanıldı. 10X TBE stok solüsyonu kullanım öncesi 1X TBE olacak şekilde distile su ile sulandırıldı (pH 7.2).
2. Steril bir balon içine 100ml 1X TBE tamponu ve 2g agaroz (Sigma) eklenerek mikrodalga fırında eritildi.
3. Agaroz oda ısısında soğutulup içine 0,5µg/ml etidyum bromür eklendi.
4. Jel, tarakları uygun olarak yerleştirilmiş elektroferez tankının (OWL Separation Systems Model B2 Mini Gel Electrophoresis System) üzerine hava kabarcığı olmayacak şekilde yavaşça döküldü ve oda sıcaklığında katılaşması için yaklaşık olarak 30 dakika bekletildi. Jel katılaştıktan sonra taraklar yavaşça çıkarıldı.
5. Jelin ilk kuyucuğunda 6µL 100bp DNA ladder (Fermentas) olmak üzere, 10µL amplikon ile 2µL yükleme tamponu (1X TBE içinde % 20 sukroz, % 0,25 bromfenol mavisi) karıştırılarak jel üzerindeki kuyucuklara yüklendi.
6. Tankın güç kaynağı (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA) 80V ve 120A akıma ayarlanarak çalıştırıldı. Yaklaşık olarak 45 dakika sonra elektroferez durduruldu.
7. Jel tanktan çıkarıldı ve jel görüntüleme sistemi (DNR Bio-Imaging Systems Visible & Ultraviolet Transilluminator, MiniBIS Bio-Imaging System) ile görüntülenerek 244 bp'lik bandların varlığı için analiz edildi (Şekil 1).

Şekil 1. RT-PCR ürünü 244 bp'lik bandın agaroz jelde görüntülenmesi



4. BULGULAR

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'nın yoğun bakım, onkoloji, hematoloji, çocuk enfeksiyon, yenidoğan yoğun bakım, süt çocuğu, allerji ve büyük çocuk servisleri ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı ile Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı servislerinde yatırılan ve solunum yolu enfeksiyonu belirtileri olan 476 hastadan alınan nazofaringeal sürüntü örnekleri influenza A virus ve alttipleri ile influenza B virusu tespit etmek amacıyla influenza A ve B real-time RT-PCR, influenza H1N1 ve H3N2 real-time RT-PCR, influenza A virus için konvansiyonel RT-PCR ve influenza A ve B antijeni için direk immunfloresan test ile çalışıldı.

Solunum yolu enfeksiyonu (SYE) olan toplam 476 hastanın 278'i (%58.4) erkek, 198'i (%41.6) kızdı. Erkeklerin kızlara oranı 1.4 idi. Toplam 476 hastanın yaş gruplarına göre cinsiyet dağılımına bakıldığında, 2 yaş ve altındaki 206 (%43.3) çocuğun 120'si (%58.3) erkek ve 86'sı (%41.7) kızdı. Yaşları 3-5 arasında olan 76 (%16) hastanın ise %71'i erkek, %29'u kızdı. Diğer 6-10 yaş, 11-20 yaş ve 20-65 yaş grupları ise sırasıyla % 13.4, %14.5 ve %12.8 oranlarında idi (Tablo 3).

Nazofaringeal örneklerin 146'sı (%30.7) çocuk yoğun bakım, 78'i (%16.4) çocuk onkoloji, 54'ü (%11.3) büyük çocuk, 49'u (%10.3) süt çocuğu, 42'si (%8.8) yenidoğan yoğun bakım, 31'i (%6.5) enfeksiyon hastalıkları, 28'i (%5.9) çocuk enfeksiyon, 23'ü (%4.8) göğüs hastalıkları, 18'i (%3.8) çocuk hematoloji ve 7'si (%1.5) çocuk allerji bölümlerinde yatırılan hastalara aitti.

Tablo 3. Hastaların cinsiyet ve yaş gruplarına göre dağılımı

SYE olan çocuklar	Yaş grupları											
	≤ 2 yaş		3-5 yaş		6-10 yaş		11-20 yaş		20-65 yaş		Toplam	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Erkek	120	58.3	54	71	39	61	36	52	29	47.5	278	58.4
Kız	86	41.7	22	29	25	39	33	48	32	52.5	198	41.6
Toplam	206	43.3	76	16	64	13.4	69	14.5	61	12.8	476	100

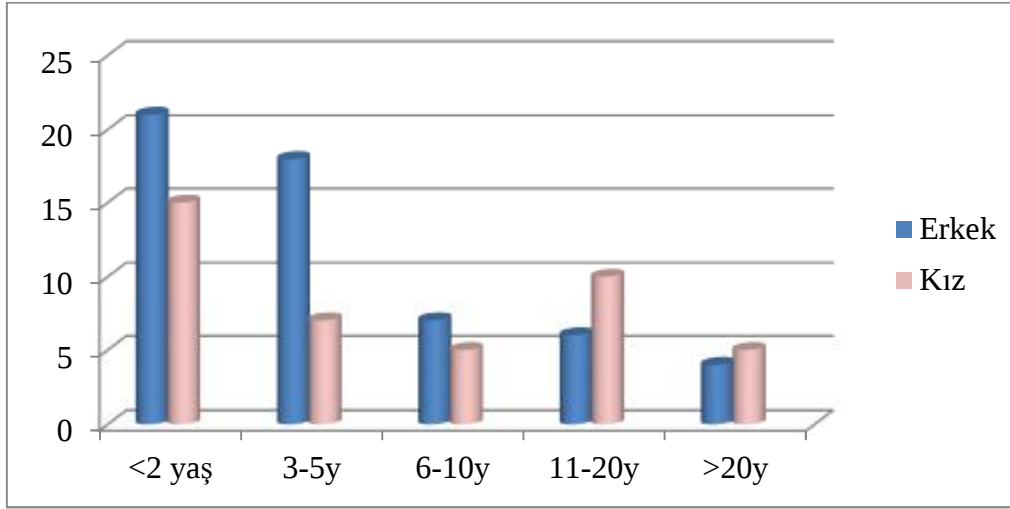
SYE olan toplam 476 hastadan real-time PCR yöntemi ile 98'inde (%20.5) influenza A virusu ve 16'sında (%3.3) influenza B virus tespit edildi. İnfluenza A virus enfeksiyonu olan hastaların cinsiyet ve yaş gruplarına göre dağılımına bakıldığında 36'sı (%36.7) ≤2 yaş, 25'i (%25.5) 3-5 yaş, 12'si (%12.3) 6-10 yaş, 16'sı (%16.3) 11-20 yaş ve 9'u (%9.2) 20-65 yaş grubunda idi. İnfluenza A enfeksiyonu olan 98 hastanın 56'sı (%57.2) erkek ve 42'si (%42.8) kız idi (Tablo 4, Şekil 2).

İnfluenza B virus enfeksiyonu olan 16 hastanın ise 11'i erkek ve 5'i kız olup 6'sı (%37.5) ≤2 yaş, 3'ü (%18.7) 3-5 yaş, 2'si (%12.5) 6-10 yaş, 3'ü (%18.7) 11-20 yaş ve 2'si (%12.5) 20-65 yaş grubunda idi.

Tablo 4. İnfluenza A virus enfeksiyonu olan 98 hastanın cinsiyet ve yaş gruplarına göre dağılımı

SYE olan çocuklar	Yaş grupları											
	≤2 yaş		3-5 yaş		6-10 yaş		11-20 yaş		20-65 yaş		Toplam	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Erkek	21	58.3	18	72	7	58.3	6	37.5	4	44.4	56	57.2
Kız	15	41.7	7	28	5	41.7	10	62.5	5	55.6	42	42.8
Toplam	36	36.7	25	25.5	12	12.3	16	16.3	9	9.2	98	100

Şekil 2. İnfluenza A virus ile enfekte vakaların cinsiyet ve yaş gruplarındaki dağılımı



İnfluenza A virus (98 vaka) ve influenza B virus (16 vaka) enfeksiyonu olan toplam 114 hastanın kliniklere dağılımına bakıldığında 31'i (%27.2) çocuk yoğun bakım, 27'si (% 23.7) çocuk onkoloji, 17'si (%15) büyük çocuk, 11'i (%9.6) enfeksiyon hastalıkları, 10'u (%8.8) süt çocuğu, 7'si (%6.1) yenidoğan yoğun bakım, 4'ü (%3.5) çocuk enfeksiyon, 3'ü (%2.6) çocuk hematoloji, 3'ü (%2.6) çocuk allerji ve 1'i (%0.9) göğüs hastalıkları bölümlerinde yatan hastalardı (Tablo 5).

Tablo 5. İnfluenza enfeksiyonu olan 114 vakanın kliniklere dağılımı

Klinik	İnfluenza A n	İnfluenza B n	Toplam vaka n %
Çocuk yoğun bakım	28	3	31 27.2
Çocuk onkoloji	25	2	27 23.7
Büyük çocuk	14	3	17 15
Enfeksiyon hastalıkları	10	1	11 9.6
Süt çocuğu	8	2	10 8.8
Yenidoğan yoğun bakım	4	3	7 6.1
Çocuk enfeksiyon	4		4 3.5
Çocuk hematoloji	3		3 2.6
Çocuk allerji	2	1	3 2.6
Göğüs hastalıkları	-	1	1 0.9
Toplam	98	16	114 100

SYE olan toplam 476 hastanın 138'i pnömoni, 43'ü bronşiolit, 35'i üst solunum yolu enfeksiyonu ve 260'ı hematolojik, immunolojik, kardiyak, metabolik, nörolojik ve onkolojik hastalık gibi altta yatan hastalığı olup solunum yolu enfeksiyon ön tanısı alan vakalardı. Pnömoni, bronşiolit, üst solunum yolu enfeksiyonu (ÜSYE) ve altta yatan hastalığı olup SYE olan influenza A virus pozitif hastaların oranı sırasıyla %17.4, %23.2, %25.7 ve %21.1 olup influenza B ile enfekte hastalarda ise bu oranlar sırasıyla % 2.9, %4.6 , %2.8 ve %3.4 idi (Tablo 6).

Tablo 6. İnfluenza A ve B virus ile enfekte olan ve olmayan hastaların klinik tanıları

Hastalık	İnfluenza A virus pozitif n %	İnfluenza B virus pozitif n %	Virus negatif n %	Toplam n %
Pnömoni	24 17.4	4 2.9	110 79.7	138 29
Bronşiolit	10 23.2	2 4.6	31 72	43 9
ÜSYE	9 25.7	1 2.8	25 71.4	35 7.4
SYE + Altta yatan hastalık	55 21.1	9 3.4	196 75.3	260 54.6
Toplam	98 20.5	16 3.3	362 76.1	476 100

İnfluenza enfeksiyonu olan 114 çocuktan 76'sında (%66.6) öksürük, 63'ünde (%55.2) ateş, 56'sında (%49.1) burun tıkanıklığı, 50'sinde (%43.8) solunum güçlüğü, 45'inde (%39.4) takipne, 39'unda (%34.2) burun akıntısı, 37'sinde (%32.4) boğaz ağrısı ve 30'unda (%26.3) bulantı ve kusma vardı (Tablo 7).

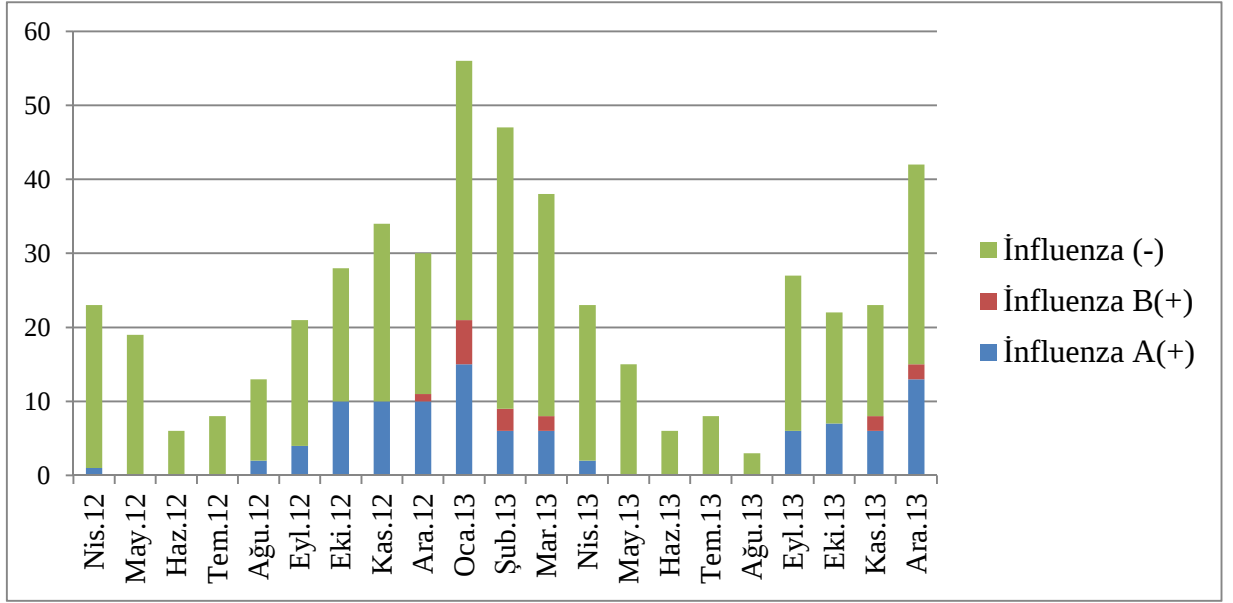
Tablo 7. İnfluenza olan 114 hastada klinik belirtiler

Belirtiler	no	%
Öksürük	76	66.6
Ateş	63	55.2
Burun tıkanıklığı	56	49.1
Solunum güçlüğü	50	43.8
Takipne	45	39.4
Burun akıntısı	39	34.2
Boğaz ağrısı	37	32.4
Bulantı ve kusma	30	26.3

Çalışmada 1 Nisan 2012 ve 31Aralık 2013 tarihleri arasında hastaneye başvuran 476 hastaya ait nazofaringeal örnekler influenza virus için test edildi. Vakaların aylara göre dağılımına bakıldığında yılında 23'ü Nisan 2012, 19'u Mayıs, 6'sı Haziran, 8'i Temmuz, 13'ü Ağustos, 21'i Eylül, 28'i Ekim, 34'ü Kasım, 29'u Aralık, 50'si Ocak 2013, 44'ü Şubat, 36'sı Mart, 23'ü Nisan, 15'i Mayıs, 6'sı Haziran, 8'i Temmuz, 3'ü Ağustos, 27'si Eylül, 22'si Ekim, 21'i Kasım ve 40'ı Aralık ayında idi (Tablo 8).

İnfluenza A pozitif vakaların 1'i Nisan, 2'si Ağustos, 4'ü Eylül, 10'u Ekim, 10'u Kasım, 10'u Aralık, 15'i Ocak 2013, 6'sı Şubat, 6'sı Mart, 2'si Nisan, 6'sı Eylül, 7'si Ekim, 6'sı Kasım, 13'ü Aralık ayında tespit edildi. İnfluenza B pozitif vakaların ise 1'i Aralık 2012, 6'sı Ocak 2013, 3'ü Şubat, 2'si Mart, 2'si Kasım ve 2'si Aralık ayında görüldü. İnfluenza virus enfeksiyonu 2012 yılının Mayıs, Haziran ve Temmuz ve 2013 yılının Mayıs, Haziran, Temmuz ve Ağustos aylarında tespit edilmedi (Şekil 3).

Şekil 3. İnfluenza A ve B virus ile enfekte vakaların aylara dağılımı



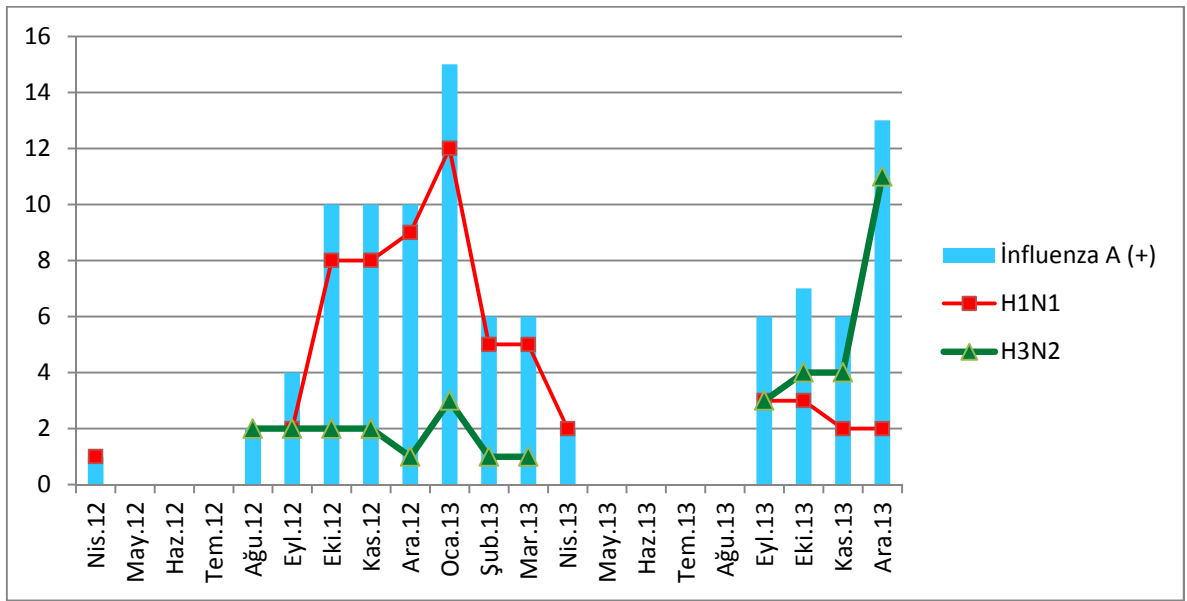
İnfluenza A virus alttıplemesi yapıldığında 1 Nisan 2012 ve 31 Aralık 2013 döneminde 98 influenza virus izolatının 62'si (%63.3) A(H1N1)pdm09 ve 36'sı (%36.7) A(H3N2) idi. İnfluenza A alttıplerin aylara göre dağılımı Tablo 8'de verilmiştir.

Tablo 8. İnfluenza A virus ve alttıplerin aylara göre dağılımı

Ay	İnfluenza A n	H1N1 n	H3N2 n	Ay	İnfluenza A n	H1N1 n	H3N2 n
Nisan 2012	1	1		Eylül 2013	6	3	3
Ağustos	2		2	Ekim	7	3	4
Eylül	4	2	2	Kasım	6	2	4
Ekim	10	8	2	Aralık	13	2	11
Kasım	10	8	2				
Aralık	10	9	1				
Ocak 2013	15	12	3				
Şubat	6	5	1				
Mart	6	5	1				
Nisan	2	2					
Toplam	66	52	14		32	10	22

İnfluenza A(H1N1)pdm09 alttipi 1 Nisan 2012 ve 30 Nisan 2013 arasındaki dönemde toplam 66 influenza izolatının 52'sini (%78.8), A(H3N2) ise 14'ünü (%21.2) oluşturmuştur. Sonraki 1 Mayıs ve 31 Aralık 2013 döneminde ise 32 influenza A izolatının 10'u (%31.3) A(H1N1)pdm09 alttipi olup 22'si (%68.7) H3N2 idi. İnfluenza A(H1N1)pdm09 alttipi Ocak 2013'de 12 vaka ile pik yaparken, H3N2 ise Aralık 2013'de 11 vaka ile pik yapmıştır (Şekil 4).

Şekil 4. İnfluenza A virus H1N1 ve H3N2 alttiplerinin aylara göre dağılımı



İnfluenza B virus 1 Nisan 2012 ve 31 Aralık 2013 arasındaki sürede SYE olan toplam 476 hastadan real-time PCR yöntemi ile 16'sında (%3.3) tespit edilmiştir. İnfluenza B virus enfeksiyon insidansı 1 Nisan 2012 ve 30 Nisan 2013 arasındaki dönemde %3.5 (12/334) iken sonraki 1 Mayıs ve 31 Aralık 2013 döneminde ise %2.8 (4/142) bulunmuştur.

İnfluenza A ve B için real-time RT-PCR test referans alındığında influenza A ve B için direk immunfloresan testin (Argene SA, France) sensitivitesi sırasıyla %72.4, %75, spesifitesi %99.2 ve %99.5 bulunmuştur (Tablo 9).

İnfluenza A virus WHO primerlerinin kullanıldığı konvansiyonel RT-PCR testi ile örneklerin 94'ünde (%19.7) tespit edilmiştir ve real-time RT-PCR testine göre sensitivitesinin %96 ve spesifitesinin %100 olduğu bulunmuştur.

Tablo 9. İnfluenza virus A ve B real-time PCR testi ve DFA sonuçları

DFA		Real-time PCR		DFA	
		Pozitif	Negatif	Sensitivite	Spesifite
İnfluenza A	Pozitif	71	3	%72.4	%99.2
	Negatif	27	375		
İnfluenza B	Pozitif	12	2	%75	%99.5
	Negatif	4	458		

5. TARTIŞMA

Grip olarak bilinen influenza ani başlayan yüksek ateş, titreme, öksürük, burun akıntısı, baş ağrısı, halsizlik ve kas ağrıları ile seyreden akut solunum yolu hastalığıdır. Enfeksiyonun klinik ciddiyeti asemptomatik hastalıktan ölümcül olabilen primer viral pnömoniye kadar değişebilir.

Grip her yıl milyonlarca kişiyi ve her yaş grubunu etkiler. Birçok viral solunum yolu enfeksiyonu benzer klinik tabloya yol açabilir. Gribi diğerlerinden ayıran temel özellikler salgınlar (epidemiler) yapabilmesi, tüm dünyada salgınlara (pandemiler) yol açması ve önemli ölçüde iş gücü ve okul süresinden kayba sebep olmasıdır. Grip, tüm dünyada, iş gücü kayıplarının %10'undan sorumludur ve önemli ekonomik kayıpla sonuçlanır. İnfluenza mevsiminde atak hızı genellikle % 5-20 olarak bilinmektedir ve her yıl 250000- 500000 kişi yaşamını yitirmektedir⁽²⁾.

İnfluenza virus enfeksiyonları oldukça bulaşıcı olup, toplumda hızlı yayılım gösterir. İnfluenza virusu genellikle belirtilerin ortaya çıkmasından bir gün ve sonraki 5-7 gün süreyle yayılır. Çocuklar erişkinlere göre daha çok bulaştırıcıdır. İnfluenza başlıca üç yolla yayılır; direkt bulaşma (enfekte kişinin başka bir kişinin göz, burun veya ağız içine direkt olarak hapşırması), hava yolu (enfekte kişinin öksürmesi veya hapşırması ile yayılan aerosollerin başka birisi tarafından solunması) ve kontamine yüzeylerden ya da el sıkışması gibi doğrudan kişisel temas ile elden göze, elden buruna veya elden ağıza bulaşma yoluyla olur. Havadaki küçük damlacıkların çapları 0,5-5 mikron kadardır ve sadece bir damlacık enfeksiyon için yeterli sebep olabilir. İnfluenza, kış aylarında pik prevalansa ulaşır. İnfluenza epidemileri genellikle ılıman iklim kuşağında, kuzey yarım kürede Ekim-Nisan aylarında, güney yarım kürede Mayıs-Eylül aylarında

görülür. Tropikal bölgelerde tüm yıl boyunca görülebilir. Hastane ve huzurevlerinde nozokomiyal salgınlar görülebilir. Türkiye’de influenza epidemiyolojisi ait olduğu kuzey yarım küre ılıman kuşak özelliğini gösterir. Her yıl influenza virusunun yeni suşları enfeksiyonlara sebep olur. Şimdilik gelecekte influenzanın yeni bir suşunun pandemik enfeksiyon yapacağı hakkında endişe vardır^(113,114).

İnfluenza virusları internal nükleokapsid veya matriks proteininin antijenik yapısına dayanarak A, B ve C olmak üzere üç tipe ayrılır. İnfluenza A virusu sadece insanları değil kuş türlerini, atları ve domuzları da enfekte edebilir. İnfluenza B ve C ise sadece insanlarda hastalığa sebep olur. En sık görülen influenza A, daha az oranda B’dir. İnfluenza C virusu çok daha hafif hastalık tablosuna sebep olur ve salgınlara yol açmaz.

İnfluenza virusunun hemaglutinin (HA) ve nöraminidaz (NA) olmak üzere iki önemli yüzey glikoproteini vardır. HA konak hücre membranındaki sialik asit reseptörüne bağlanır. Bu glikoprotein konakta koruyucu immunitayı uyaran antijendir. NA, yeni virus partiküllerinin konak hücre membranına bağlanmasında rol alan sialik asit bağıntıyı ayrıştırarak virusların hücreden serbest bırakılmasını sağlar. İnfluenza A ve B viruslarının HA ve NA proteininde antijenik drift olarak bilinen sürekli minör antijenik değişiklikler olur. Antijenik drift, hemaglutinin veya nöraminidazı kodlayan RNA segmentinde küçük noktasal mutasyonlarla oluşur. Sonuçta virusun protein yapılarında bir veya birkaç aminoasidi ilgilendiren değişiklikler meydana gelir. Antijenik drift, influenza virusunun epidemilerinden sorumludur. Bu antijenik değişikliklerin sonucu olarak enfeksiyon sonrası veya daha önceki suşlara karşı aşılama sonucu influenza viruslarına karşı oluşan antikorlar, daha sonraki yıllarda dolaşan viruslara karşı koruyucu olmayabilir. Sonuç olarak populasyonlarda genellikle yıllık epidemiler olur. Antijenik değişiklikler, aynı zamanda aşının sirküle eden suşlarla uyumunu sağlamak için influenza aşısı komponentlerinin sıklıkla güncelleştirilmesini gerektirir.

Antijenik driftte ilaveten influenza tip A virusları antijenik shift denilen daha dramatik bir değişime uğrar. Antijenik driftte göre çok daha büyük bir değişikliktir. Hemaglutinin, nöraminidaz veya her ikisini de kodlayan RNA segmentinde tamamen farklı bir genetik yapılanma meydana gelir. Antijenik shift geçiren influenza virusunun

orijinal virusla antijenik yakınlığı çok azdır veya yoktur. Antijenik shift, influenza virusunun pandemilerinden sorumludur. Yeni HA proteini 2009 H1N1 pandemisinde görüldüğü gibi virusun aynı alttipini içerebilir, fakat antijenik olarak önemli ölçüde değişiktir. Antijenik drift sürekli olduğu halde antijenik shift çok sık oluşmaz. Yeni influenza A virusları hastalığa sebep olur ve insanlar arasında bulaşıcı ise pandemi denilen bütün dünyada salgınlar ile sonuçlanabilir. Sadece influenza A virusları influenza pandemilerine sebep olur. İnfluenza A virusu HA ve NA'larına göre alttiplere ayrılır. İnfluenza A viruslarının antijenik olarak farklı 16 HA (H1-H16) ve 9 NA alttipi (N1-N9) tanınmıştır. Memeli türlerinden oldukça az sayıda alttip (subtip) kombinasyonları izole edilmesine rağmen tüm alttipler, birçok kombinasyonlarda kuşlardan izole edilir. Her virus bir HA ve bir NA alttipi gösterir. İnsan influenza A tipleri H1, H2, H3, N1 ve N2'ye sınırlıdır⁽⁹⁾.

Yirminci yüzyılda üç influenza pandemisi, 1918'de H1N1, 1957'de H2N2 ve 1968'de H3N2 pandemileri meydana gelmiştir. İnsanlarda ortaya çıkan yeni bir virus suşunun sebep olduğu bu pandemilerde milyonlarca insan ölmüştür. Bugüne kadar görülen en şiddetli pandemi, 1918 yılında 20 milyondan fazla insanın yaşamını yitirmesine sebep olan İspanyol gribidir. Yeni suşlar genellikle mevcut bir influenza virusunun, diğer hayvan türlerinden insanlara yayılması ile oluşur veya varolan bir insan suşu genellikle kuşlar veya domuzları enfekte eden bir virustan yeni genler alır. Asya'da 1997'de ortaya çıkan avian influenza virusu olan influenza A(H5N1) kuşlardan insanlara bulaşmıştır ve kuş gribi virusu insanlarda %60 mortalite ile seyretmiştir. İnfluenza A(H5N1) yeni bir influenza pandemisi endişesi yaratmış, ancak insanlar arasında kolayca yayılan bir form gelişmemiştir. Bu virus tipinin niçin tür bariyerini aşarak kanatlıdan insana geçiş yaptığı araştırılmaktadır. Bu durum ileriki yıllarda influenza virusunun yeni alttipleri ile karşılaşabileceğimizi düşündürmektedir. Daha önce kişilerin karşılaşmadığı bir antijenik yapının ortaya çıkması ve yayılması halinde yeni bir pandemi dalgası ortaya çıkabilecektir. Nisan 2009'da yeni bir influenza A(H1N1) virusu 40 yıldan fazla bir süre sonra 21. yüzyılın ilk influenza pandemisinin oluşmasına sebep olmuştur. Yeni influenza A(H1N1) virusu 2009 ki bu insan influenza A(H1N1) viruslarından farklıdır. Nisan 2009'da başlangıçta "domuz gribi" olarak adlandırılan ve aynı zamanda influenza A(H1N1) olarak bilinen insan, domuz ve kuş gribi genlerinden kombine yeni bir influenza suşu Meksika, Amerika Birleşik Devletleri

ve diğer bazı ülkelerde ortaya çıkmıştır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), 11 Haziran 2009 tarihinde pandemik salgını resmen ilan etmiştir. DSÖ açıklaması, pandemi seviyesinin 6 olmasının virus yayılmasının bir göstergesi olduğu hastalığın ciddiyetini göstermediği idi ve yeni suş aslında yaygın influenza salgınlarına göre daha düşük ölüm oranına sahipti. DSÖ enfeksiyonun tedavi ve kontrol altına alınmasında mevsimsel influenza virusu ile H1N1 virusunun kesin olarak ayrımının yapılmasının çok önemli olduğunu belirtmiştir. Pandeminin sebep olduğu hastalık ve ölümden en az etkilenmek için ülkelerin çok dikkatli planlamalar ve uygun politikalar üretmesi gerekmektedir. Pandemiler arasında oluşan sık epidemiler antijenik drift denilen baskın suşa giderek artan antijenik değişimin sonucudur. Epidemiler H1N1 ve H3N2 alttipleri gibi influenza A ve influenza B virusları ile enfeksiyona bağlı olarak bütün dünyada görülür⁽¹⁾.

İnfluenza enfeksiyonu genellikle diğer respiratuvar viruslara göre daha ciddi hastalığa sebep olmasına rağmen influenza enfeksiyonları sadece klinik bilgiye dayanarak diğer respiratuvar virus enfeksiyonlarından kesinlikle ayırt edilemez. Tanıyı doğrulamak için laboratuvar testi gereklidir. İnfluenza virus testi için uygun klinik örnekler, nazofaringeal sürüntü, nazal sürüntü, boğaz sürüntüsü, trakeal aspirat ve bronkoalveolar lavajdır. Örnekler hem hospitalizasyon gerektiren ciddi hasta vakalarından hem de sadece dışardan tedavi edilen hafif hastalığı olanlardan toplanabilir, çünkü baskın virus tipi veya alttipi hastalığın ciddiyetine göre değişebilir. Belli bir popülasyonda hasta veya hastaneye yatırılanlarda sistematik örnek alma hastalık yükünün tahminine izin verir. Örnekler hastalığın başlangıcından 72 saat içinde alınmalıdır. İnfluenza tanısı için kullanılan metodlar virus izolasyonu (konvansiyonel hücre kültürü ve hızlı hücre kültür metodu), moleküler testler (RT-PCR ve real-time RT-PCR) ve viral antijenlerin tespiti için ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), direk veya indirek immunfloresan testtir. Hızlı testlerin kolay kullanımı ve çabuk olması hasta yönetimi için faydalıdır, ancak bu testler viral kültür ve RT-PCR'a göre daha düşük sensitivite ve spesifiteye sahiptir. İnfluenza A alttiplemesi de yapılamaz. RT-PCR testinin kuş gribi etkeni influenza tip A(H5N1) viruslarının tanısı için yaygın kullanımı influenza taramasında moleküler metodların kullanımında genel artışa yol açmıştır. RT-PCR testi mevsimsel influenza virusları ve tiplendirilemeyen influenza A viruslarının tanısı için en sensitif metoddur^(6,36,43).

İnfluenza virus enfeksiyonlarının laboratuvar tanısı ile dolaşımdaki virusların coğrafik dağılımı üzerine temel bilgi sağlanmasının yanı sıra influenza virus sürveyansının amaçları aşı suşu seçimi için viruslardaki antijenik değişiklikleri izlemek, antiviral direnci izlemek ve pandemik tehdit yaratacak yeni influenza alttiplerinin tespitidir^(35,115).

Spesifik influenza virus suşlarının zamanında ve doğru tanısı, etkili korunma, aşı hazırlanması ve erken antiviral tedavi için önemlidir. Viral kültür, tanı için altın standart olmasına rağmen moleküler metodlar yerine geçmiştir. Moleküler testler yüksek sensitivite ve spesifiteye sahiptir, genellikle %100'e yaklaşır^(35,114). Solunum yolu viruslarının erken ve spesifik tanısı antiviral tedavinin başlanması, antibiyotik kullanımında azalma, nozokomiyal yayılımın azaltılması, hastanede kalış süresinin kısalması, diğer laboratuvar testlerinin azaltılması ve hasta yönetimi için maliyetin azaltılması gibi bir çok avantajlar sağlar.

DSÖ tarafından 1950'li yıllardan beri izlem altına alınan grip ile ilgili dünyada ve ülkemizde sürveyans çalışmaları yapılarak o yıl dolaşımdaki influenza viruslarının insidansı, alttipleri, bu tiplerin mevcut antivirallere karşı direnç kazanıp kazanmadıkları ve dolaşıma giren yeni bir alttipin var olup olmadığı saptanmaktadır.

Ülkemizde solunum yolu enfeksiyonu olan hastalarda viral etyolojinin araştırıldığı çalışmalardan Akçakaya ve ark.⁽¹¹⁶⁾ yaptığı çalışmada 5 Kasım 2009 ve 10 Mart 2010 tarihleri arasında grip benzeri hastalık tablosuyla İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi çocuk acil polikliniğine başvuran ve solunum sıkıntısı, tekrarlayan kusma ve genel durum bozukluğu sebebiyle yatırılan hastalara ait nazal ve nazofaringeal örneklerde PCR yöntemiyle influenza A(H1N1) varlığı araştırılmıştır. Çalışmada 182 hastadan alınan 187 örnek değerlendirilmiştir. Hastaların yaş ortalamasının 3.2 olup 2 ay ve 16 yaş arasında olduğu belirtilmiştir. Toplam 139 örnekten 84 örnekte bir, 23 örnekte iki ve üç örnekte üç ayrı respiratuvar virus tespit edilmiştir. Pozitif sonuçlanan örnekler dikkate alındığında sırasıyla; influenza A(H1N1) (63, %45.3), PIV 3 (18, %13), rhinovirus (16, %11.5), coronavirus 229 (8, %5.8), RSV A (7, %5), RSV B (7, % 5), PIV 1 (6, %4.3), adenovirus (5, %3.6), PIV 2 (4, %2.9), metapnömovirus (4, %2.9) ve coronavirus 43 (1, %0.7) saptanmıştır. Virus pozitif olan

hastaların %53.1'i grip benzeri hastalık, %31.2'si bronşiolit, %9.4'ü pnömoni ve %6.3'ü akut astım tanısıyla izlenmiştir.

Hatipoğlu ve ark.¹¹⁷ Konya'da 1 Ekim 2006 ve 31 Mart 2007 tarihleri arasında yaptığı çalışmada alt solunum yolu enfeksiyonu olup hospitalize edilen yaşları 1 ay-5 yaş arasında olan 147 hastada influenza A virusu %9.3 oranında, diğer viruslar ise RSV %55.6, PIV %27.8, hMPV %13 ve adenovirus %5.6 oranlarında bulunmuştur. Hastaların %72.1'inin erkek ve 116'sının (%79.8) ≤ 2 yaş ve altında olduğu kaydedilmiştir.

Özdemir ve ark.¹¹⁸ tarafından yine Konya'da yapılan diğer bir çalışmada 2008-2009 ve 2009-2010 yılları Ekim ve Mart ayları arasında grip benzeri belirtileri olan 130 çocuk ve erişkin hastadan alınan nazofaringeal sürüntü örneklerinin multipleks PCR test ile %18.5 inde (24) influenza A ve %3.1'inde (4) influenza B tespit edilmiştir.

Beka ve ark.¹¹⁹ İstanbul'da yaptıkları çalışmada akut solunum yolu enfeksiyonu olan 109 çocuğa ait örnekler multipleks PCR ile test edildiğinde solunum virusları vakaların %39.4'ünde (43/109) tespit edilmiş olup en yaygın rhinovirus %14.7 iken RSV B %7.3, influenza A %6.4, hMPV %3.6, adenovirus %3.6, HCoV(Human coronavirus) %0.9, PIV 3 %0.9, PIV tip 4 %0.9 ve RSV %0.9 oranlarında bulunmuştur.

Sancaklı ve ark.¹²⁰, Aydın'da Şubat 2010 ve Ağustos 2010 tarihleri arasında alt solunum yolu enfeksiyonu (ASYE) olan 87 çocukta multipleks PCR Seeplex RV 15 ACE detection kiti (Seegene, Seoul, South Korea) ile %67.8'inde (59) virus tespit etmiştir. En yaygın viral etkenler sırasıyla rhinovirus, RSV ve hMPV (%26.4, %10.3, %6.9) olmuştur. İnfluenza A virus ise vakaların %3.4'ünde (3/87) bulunmuştur. Alt solunum yolu enfeksiyonlarında PCR ile viral etken saptanmasının gereksiz antibiyotik kullanımını önleyeceği ve PCR ile virus taramasının hem hasta hem de ülke ekonomisinin yararına olacağı bildirilmiştir.

Yüksel ve ark.¹²¹ Manisa'da 2002-2004 yılları arasında yaptıkları çalışmada, direk floresan test ile ASYE olan 151 çocuğun %25.2'sinde solunum yolu virusu saptanmıştır. ASYE etkeni olarak en yaygın viruslar RSV (%7.9; 12) ve adenovirus (%7.9; 12) olup ardından PIV (%6.6; 10) ve influenza virus (%5.9; 9) izlemiştir.

Kandemir ve ark.¹²² Afyon'da Ekim 2005 ve Mayıs 2006 tarihleri arasında Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi ve Afyonkarahisar Zübeyde Hanım Doğum ve Çocuk Hastanesi'ne bronşit veya bronşiolit ön tanısı ile yatırılan 1 ay-13 yaş arasındaki 46 hastadan (22 kız, 24 erkek) alınan nazofaringeal sürüntü örneklerinde yedi farklı solunum yolu virusunu multipleks kantitatif RT-PCR Enzim Hibridizasyon Assay (Hexaplex Plus; Prodesse, USA) ile araştırmışlardır. Multiplex PCR ile influenza A %17.3 (8/46), influenza B 2.1 (1/46), hMPV %10.8 (5/46), PIV 3 %6.5(3/46) ve RSV %2.1 (1/46) oranlarında tespit edilmiştir.

Direk immunfloresan testinin RT-PCR ile kıyaslandığı çalışmalarda Sandora ve ark.¹²³ tarafından Boston'da 29 Nisan 2009 ve 12 Haziran 2009 tarihleri arasında yapılan araştırmada 18 yaşından küçük 614 hastaya ait nazofaringeal örnekler pandemik (H1N1) 2009 virus için RT-PCR, DFA testi ve hızlı test BinaxNOW testi ile incelenmiştir. RT-PCR ile pandemik (H1N1) 2009 virusunun 230 (%37.5) örnekte pozitif, 380 (%61.9) örnekte negatif ve 4 örnekte (%0.7) ise belirsiz olduğu gözlenmiştir. RT-PCR testine göre DFA testinin sensitivitesi %57.3 ve spesifitesi %99.7 oranında bulunmuştur.

Ganzenmueller ve ark.¹²⁴ Almanya Hannover'de, Mayıs 2009 ve Eylül 2009 döneminde yaptıkları çalışmada laboratuvara gönderilen rutin örneklerde influenza A(H1N1)2009 virus için hızlı test olan Quidel QuickVue POC test, DFA test (Light Diagnostics, Millipore), MDCK hücre kültüründe virus izolasyonu ve RT-PCR ile test edilmiştir. A(H1N1)2009 örneklerin %9.1'inde (48/526) pozitif bulunmuştur. RT-PCR testine göre Quidel QuickVue POC test %18.2, DFA test %38.7 ve virus izolasyonu %45.7 oranında sensitivite ve sırasıyla %100, %100 ve %99.8 oranlarında spesifite göstermiştir.

Bakerman ve ark.¹²⁵ tarafından Arizona'da 2009 H1N1 influenza A salgını sırasında 30 Eylül ve 1 Aralık 2009 döneminde yapılan çalışmada 773 çocuğa ait nazofaringeal örnekler DFA ve RT-PCR testi ile analiz edilmiştir. RT-PCR ile hastaların %31.8'inde (246) 2009 H1N1 influenza A virus tanınmıştır. DFA testinin sensitivitesi %65 ve spesifitesi %99.6 bulunmuştur.

Landry ve ark.'nın¹²⁶ çalışmasında Connecticut'da Mayıs 2009 ve Temmuz 2009 tarihleri arasında, 323 çocuk ve 278 erişkin hastaya ait 601 nazofaringeal örnek Cytospin-enhanced DFA (SimulFluor respiratory screen reagents, Millipore Inc. Temecula, CA) ve RT-PCR ile test edilmiştir. RT-PCR test ile 272 (%45.2) örnek swine influenza A pozitif bulunmuştur. Cytospin-DFA testinin sensitivitesi %84.6 (230/272) ve spesifitesi %99.3 oranında tespit edilmiştir.

Nutter ve ark.¹²⁷ tarafından yapılan çalışmada Kaliforniya'da Nisan 2009 ve Ekim 2009 tarihleri arasında 638 örnek (394 çocuk, 243 erişkin ve 1 yaşı bilinmiyor) 2009 pandemik H1N1 virus için PCR ve IFA (BartelsH Viral Respiratory Screening and Identification Kit, Trinity Biotech, PLC, Co Wicklow, Ireland) ile test edilmiştir. Toplam 245 örnek (%38) influenza A(H1N1)pdm09 (139 çocuk ve 106 erişkin) için pozitif bulunmuştur. Hospitalize hastalardan alınan 438 örnekten ise 131'i (%30) A(H1N1)pdm09 (82 çocuk ve 49 erişkin) pozitifdir. IFA testinin toplamda sensitivitesi %71 iken hospitalize çocuklarda ise IFA testinin sensitivitesi %75 ve spesifitesi %94 bulunmuştur. IFA ile negatif test sonuçlarına göre influenza virus enfeksiyonunun dışlanmaması gerektiği belirtilmiştir.

Leonardi ve ark.¹²⁸ New York'da 2009 yılında influenza A(H1N1) virus salgını sırasında (22 Mart ve 18 Temmuz 2009 dönemi) yaptıkları araştırmada solunum yolu enfeksiyonu olan 613 hastanın nazofaringeal örnekleri viral transport besiyerine alınmış (Diagnostic Hybrids, Inc., Athens, OH) ve influenza virus 145'inde (%23.6) hücre kültüründe izole edilmiştir. Toplam 50 örnek DFA (Diagnostic Hybrids Inc.) ile incelenmiştir. Hücre kültürü sonuçlarına göre DFA testinin sensitivitesi %80 ve spesifitesi %100 bulunmuştur.

Esposito ve ark.¹²⁹ İtalya, Milano'da yaptıkları çalışmada dört sezon boyunca (2007-2008, 2008-2009, 2009-2010 ve 2010-2011) 1 Kasım ve 30 Nisan dönemlerinde pnömonili 592 çocuktan 435'i (%73.5) Luminex xTAG Respiratory Virus Panel Fast test ile en az bir virus için pozitif bulunmuştur. RSV, %31.7, rhinovirus %24.3, human bocavirus (HBoV) %10.1, influenza virus %9.6 [57 vaka; 6'sı mevsimsel influenza A(H1N1), 17 influenza A(H3N2), 8'i influenza B, ve 26'sı pandemik A(H1N1)] ve hMPV %8.2 oranlarında tespit edilmiştir.

Sentilhes ve ark.'nın¹³⁰ çalışmasında Güneydoğu Asya'da bulunan Laos'da Ağustos 2009-Ekim 2010 tarihleri arasında ASYE olup hospitalize edilen 292 hastanın %55'inde multipleks RT-PCR testi ile virus pozitif olup sırasıyla rhinovirus/enterovirus %35, RSV %26 ve influenza virus %13 oranlarında bulunmuştur. İnfluenza A virus örneklerin %9.1'inde (17 vaka, 2009 pandemik H1N1 virus), influenza B %2.7'sinde (beş vaka) ve influenza C sadece bir vakada pozitifdir. Hastaların yaşı 12 gün ve 87 yaş arasında ve hastaların %64'ü 5 yaşın altındadır. Viral enfeksiyonların çoğu beş yaşın altında görülmüştür.

Tran ve ark.¹³¹ Vietnam'da Ekim 2008 ve Eylül 2010 döneminde akut solunum yolu hastalığı olup hastaneye başvuran toplam 2144 çocuk ve erişkin hastadan alınan burun ve boğaz sürüntü örneklerinden 1235'inde (%57.6) en az bir virus pozitif bulmuştur. En yaygın %17.9 oranla influenza A olup, pandemik influenza A(H1N1) 2009 ve H3N2 suşların sırasıyla %52 ve %43'ünü oluşturmuştur. Tespit edilen diğer viruslar rhinovirus (%12.4), enterovirus (%8.9), influenza B (%8.3), adenovirus (%5.3), PIV (%4.7), RSV (%3.9), human coronavirus (%3) ve hMPV'dur (%0.3). Viral enfeksiyonların çoğu beş yaş altındaki çocuklarda görülmüştür.

Zhang ve ark.¹³² Çin'de Şangay'da Mayıs 2009 ve Temmuz 2010 tarihleri arasında akut solunum yolu enfeksiyonu olup hastaneye yatırılan 3 yaşın altındaki 164 çocuktan alınan nazofarinks sürüntü örneklerinde 15 solunum virusunu SeeplexH RV15 ACE Detection kit (Seegene Inc., Seoul, South Korea) ile araştırmıştır. SeeplexH RV15 ACE detection kiti kullanarak, virus enfeksiyonu 129 (%8.7) ve koenfeksiyon 49 (%29.9) hastada tespit edilmiştir. Human rhinovirus 37 (vakaların %22.6), influenza A virus 32 (%19.5), PIV 2, 30 (%18.3), PIV 3, 23 (%14), human enterovirus 15 (%9.1), PIV 1, RSV B ve adenovirus her biri 14 (%8.5), HCoV 229E/NL63, 8 (%4.9), HBoV 6 (%3.7), influenza B virus ve RSV A her biri 5 (%3), PIV 4, 3 (%1.8), HCoV OC43/HKU1, 2 (%1.2) ve hMPV 1 (%0.6) vakada bulunmuştur.

Kosasih ve ark.¹³³ Endonezya'da 2003-2007 yılları arasında influenza benzeri hastalığı olan 21030 kişiden %20.1'inde (4236) influenza (%13 influenza A ve %7.1 influenza B) tespit etmiştir. Hastaneye yatırılan hastaların %21.7'sinde (221/1018), ayakta tanı konulan hastaların ise %20.1'inde (4015/20012) influenza virus bulunmuştur. İnfluenza virus için pozitif olan 4236 vakada, influenza A virus ve

influenza B virus sırasıyla %64.9'unda (2749) ve %35.1'inde (1487) tanınmıştır. Altipleme yapılan 2314 influenza A virus suşunun %64.6'sı H3N2, %34.9'u H1N1 ve %0.4'ü H5N1'dir.

Guerrier ve ark.'nın¹³⁴ Kamboçya'da Nisan 2007 ve Şubat 2010 arası 3 yıllık çalışmasında ASYE olan beş yaş altındaki 1006 çocuktan %55'inde (551) viral enfeksiyon bulunmuştur. RSV %34, rhinovirus %34, PIV %8, hMPV %8, influenza virus %6, bocavirus %3, adenovirus %3, coronavirus %2 ve enterovirus %1'inde tespit edilmiştir. Hastaların %58'i erkek ve %78'i 2 yaşın altındadır. Çoğunda ateş ve öksürük olduğu belirlenmiştir.

Choi ve ark.¹³⁵ Kore'de Mart 2010-Şubat 2011 döneminde yoğun bakım ünitesinde yatan ciddi pnömonisi olan 198 erişkin hastadan alınan nazofaringeal örnekten %36.4'ünde (72) viral enfeksiyon tespit etmiştir. İnfluenza A virus vakaların %5.6 (11) ve influenza B virus %0.5'inde (1) bulunmuştur. Virus pozitif 72 hastada rhinovirus %23.6 (17), PIV %20.8 (15), hMPV %18.1 (13) influenza virus %16.7 (12), RSV %13.9 (10) cytomegalovirus %11.1 (8), human coronavirus OC43 %5.6 (4) ve adenovirus/enterovirus %1.4 (1) oranlarında bildirilmiştir.

Sung ve ark.¹³⁶ Honk Kong'da Kasım 2005 ve Ekim 2006 tarihleri arasında akut solunum yolu enfeksiyonu sebebiyle hospitalize edilen beş yaşın altında 475 çocuktan multipleks PCR ile %7.2'sinde influenza A ve %3.4'ünde influenza B tespit etmiştir.

Avrupa'da influenza virus enfeksiyonlarının sürveyans sonuçlarına göre 2012-2013 influenza sezonunda 2012 yılının 40. haftasından (1-7 Ekim) 2013 yılının 17. haftasına (22-28 Nisan) kadar olan sürede 94358 örnekten %63'ü (59270) influenza A ve %37'si (35088) influenza B olarak tespit edilmiştir. Altipleme yapılan 38106 suştan, %67'si A(H1N1)pdm09 ve %33'ü A(H3N2) olarak bildirilmiştir. Grip sezonları arası 2013 yılının 21. haftasından (20-26 Mayıs) 38. haftasına (16-22 Eylül) kadar olan sürede 449 influenza suşundan %58'i (260) influenza A ve %42'si (189) influenza B olarak tanımlanmıştır. Altipleme yapılan 137 suştan ise 57'si (%41.6) A(H1N1)pdm09 ve 80'i (%58.4) A(H3N2) idi. Ardından 2013 yılının 40. haftasından (30 Eylül-6 Ekim) 52. haftasına (23-29 Aralık) kadar olan sürede ise toplam 1399 influenza suşunun %84'ü A tip ve %16'sı B tipi olarak belirlenmiştir. Altipleme sonucu 819 suşun %37'si

A(H1N1)pdm09 ve %63'ü A(H3N2) tespit edilmiştir. Sadece 2013 Aralık ayı sonuçlarına bakıldığında 49. haftada alttıpleme yapılan 61 suştan %48'i (29) A(H1N1)pdm09, %52'si (32) A(H3N2), 50. haftada 78 suştan %53'ü (41) A(H1N1)pdm09, %47'si (37) A(H3N2), 51. haftada 106 suştan %23'ü (24) A(H1N1)pdm09, %77'si (82) A(H3N2) ve 52. haftada 148 suştan %19'u (28) A(H1N1)pdm09 ve %81'i (120) A(H3N2) olup böylece Aralık ayında toplam 393 suştan %31'i (122) A(H1N1)pdm09 ve %69'u (271) A(H3N2) idi ⁽¹³⁷⁾.

Ülkemizde 2009-2010 influenza döneminde 18216 örnekten %72.9 influenza virus pozitif, 2010-2011 döneminde ise 2010 yılı. 40. haftasından 2011 yılı 20. haftasına kadar olan sürede influenza sürveyansı çalışması sonuçlarına göre 2831 örnekten %11.3'ü influenza virus pozitifdir. Örneklerin %14,5'inde (410) İnfluenza B, %8,2'sinde (233) influenza A pandemik H1N1 ve %6,2'sinde (176) influenza A(H3N2) bulunmuştur. İnfluenza virus enfeksiyonu %52.9 oranla 2011 yılının 5. haftasında pik yapmıştır⁽¹³⁸⁾.

Ülkemizde 2011-2012 sezonunda influenza aktivitesi 2011 yılının 40. haftası ile 2012 yılının 18. haftası arasında izlenmiştir. Bu süreçte Ulusal İnfluenza Referans Laboratuvarına gönderilen toplam 912 örneğin 283'ünde (%31) influenza virusunun varlığı tespit edilmiştir. Bunların 211'i (%74.6) influenza A(H3N2), 2'si (%0.7) influenza A pandemik H1N1, 70'i (%24.7) ise influenza B şeklinde tiplendirilmiştir⁽¹³⁹⁾.

İnfluenza surveyansı ülkemizde 2012-2013 sezonunda (40. hafta, 1-7 Ekim/2012-20. hafta, 13-19 Mayıs/2013) 6109 örnekten %16,8'si (1027) influenza virus pozitif bulunmuştur. Pozitif vakaların 951'i (%92,5) influenza A(H1N1)pdm09, 48'i (%4,6) influenza A(H3N2) ve 28'i (%2,7) influenza B virusudur⁽¹⁴⁰⁾.

İnfluenza sürveyans raporuna göre ülkemizde 2013-2014 grip sezonunda 52. hafta (22 -29 Aralık) itibariyle çalışılan örneklerdeki influenza pozitiflik yüzdesi önceki haftalara göre artmaya devam ederek %49'a ulaşmış olup influenza A(H3N2) tipi diğer influenza virus alttıplerine göre bu sezon daha fazla görülmeye devam etmiştir. Avrupa genelinde 51. hafta itibariyle tespit edilen haftalık influenza virus sayıları artmakta olup, influenza A ülkemizde olduğu gibi Avrupa genelinde de en çok tespit edilen influenza virus tipi olmuştur. Grip benzeri hastalığı olanlardan alınan örneklerin sürveyans

çalışmasında 30 Eylül 2013'den itibaren 52. hafta dahil test edilen 1923 örnekten %17'sinde (330) influenza virus bulunmuştur. İnfluenza virus pozitif suşların %92.1'i (304) A(H3N2), %3.7'si (12) A(H1N1)pdm09 ve %4.2'ü (14) influenza B olarak tanımlanmıştır⁽¹⁴¹⁾.

Aralık ayında influenza aktivitesi ile ilgili olarak 49. hafta (2 -8 Aralık) itibariyle çalışılan 126 örneğin %18'inde (23) influenza virus tespit edilmiş olup 22'si A(H3N2) alttipi pozitif iken 1'inde influenza B virus bulunmuştur⁽¹⁴²⁾.

Aralık ayında 50. hafta (9-15 Aralık) itibariyle çalışılan örneklerdeki influenza pozitiflik yüzdesi önceki haftalara göre artmaya devam ederek %25'e (40/161) ulaşmış, H3N2 alttipi diğer influenza virus alttiplerine göre daha fazla tespit edilmiştir. İnfluenza A(H3N2) virusu 35 örnekte, pandemik influenza A H1N1 virusu 4 örnekte ve influenza B virusu 1 örnekte bulunmuştur⁽¹⁴³⁾.

Aralık 51. hafta (16-22 Aralık) itibariyle çalışılan örneklerdeki influenza pozitiflik yüzdesi %36'ya (78/219) yükselmiştir. Toplam 78 influenza suşundan 77'si influenza A(H3N2) alttipi olup pandemik influenza A(H1N1) virusu tespit edilmemiştir. İnfluenza B ise 1 vakada pozitif bulunmuştur⁽¹⁴⁴⁾.

Aralık ayında 52. haftada (22 -29 Aralık) taranan 272 örnekten 134'ünde (%49) influenza virus pozitif olup 131'i influenza A(H3N2), 3'ü ise influenza B virustur. Bu dönemde pandemik influenza A(H1N1) virusuna rastlanmamıştır⁽¹⁴¹⁾.

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'ne 1 Nisan 2012 ve 30 Aralık 2013 tarihleri arasında başvuran ve solunum yolu enfeksiyonu tanısı ile hastaneye yatırılan 476 hastada influenza A ve B viruslarının insidansı ve influenza A virus alttiplerinin tespiti için yaptığımız bu çalışmada hastalardan nazofaringeal sürüntü örnekleri flocced eküvyon ile alındı. Solunum yolu viruslarının saptanmasında en önemli yeniliklerden biri flocced eküvyonların kullanımınıdır. Flocced eküvyon, dik naylon fiberlerden yapılmış olup hücreleri toplamak için yumuşak fırça gibi davranır ve hücreleri taşıma besiyerine kolayca serbest bırakır, diğer bazı fiber matriksten yapılan eküvyonların aksine örnek materyalinin çoğunu içinde tutmaz⁽¹⁴⁵⁾.

Çalışma grubunda SYE olan 476 hastanın 278'i (%58.4) erkek, 198'i (%41.6) kızdı. Erkeklerin kızlara oranı 1.4 idi. Hastaların %43.3'ü 2 yaş ve altında olup, %16'sı 3-5 yaş arasında olmak üzere toplam %59.3'ü 5 yaş ve altındaki grupta yer aldı. Diğer 6-10, 11-20 ve 20-65 yaş grupları ise vakaların sırasıyla %13.4, %14.5 ve %12.8'ini oluşturdu.

Nazofaringeal örneklerin %30.7 oranla çoğu çocuk yoğun bakım bölümünde yatan hastalardan olmak üzere diğerleri azalan oranlarda %16.4'ü çocuk onkoloji, %11.3'ü büyük çocuk, %10.3'ü süt çocuğu, %8.8'i yenidoğan yoğun bakım, %6.5'i enfeksiyon hastalıkları, %5.9'u çocuk enfeksiyon, %4.8'i göğüs hastalıkları, %3.8'i çocuk hematoloji ve %1.5'i çocuk allerji bölümlerinden gönderildi.

Real-time PCR yöntemi ile çalışma grubunda influenza A virus enfeksiyon insidansının %20.5 (98/476) ve influenza B virus enfeksiyon insidansının %3.3 (16/476) olduğu tespit edildi. İnfluenza A virus enfeksiyonu %36.7 oranla en yüksek ≤ 2 yaş grubunda ve %25.5'i de 3-5 yaş grubunda görüldü. İnfluenza A enfeksiyonu olan 98 hastanın 56'sı (%57.2) erkek ve 42'si (%42.8) kız idi (Tablo 4, Şekil 2). İnfluenza B virus enfeksiyonu olan 16 hastanın ise 11'i erkek ve 5'i kız olup vakaların %37.5'i ≤ 2 yaş ve altında idi.

İnfluenza A virus (98 vaka) ve influenza B virus (16 vaka) enfeksiyonu olan toplam 114 hastanın kliniklere dağılımına bakıldığında çoğu çocuk yoğun bakım (%27.2) ve çocuk onkoloji (%23.7) bölümlerinde yatan hastalardı. Pnömoni, bronşiolit, ÜSYE ve altta yatan hastalığı olup SYE olan influenza A virus pozitif hastaların oranı sırasıyla %17.4, %23.2, %25.7 ve %21.1 olup influenza B ile enfekte hastalarda ise bu oranlar sırasıyla % 2.9, %4.6 , %2.8 ve %3.4 idi.

İnfluenza enfeksiyonu olan 114 çocukta görülen klinik belirtiler sırasıyla öksürük (%66.6), ateş (%55.2), burun tıkanıklığı (%49.1), solunum güçlüğü (%43.8), takipne (%39.4), burun akıntısı (%34.2), boğaz ağrısı (%32.4) ile bulantı ve kusma (%26.3) idi.

İnfluenza A ve B için real-time RT-PCR test referans alındığında influenza A ve B için direk immunfloresan test (Argene SA, France) ve influenza A için WHO primerlerinin kullanıldığı konvansiyonel RT-PCR testinin sensitivitesi sırasıyla %72.4,

%75, %96, spesifitesi %99.2, %99.5 ve %100 bulundu. DFA testinin sensitivitesi biraz düşük (%72.4) olsa da hasta yönetiminde hızlı tanı için kullanılabilir, ancak negatif test sonuçlarının RT-PCR test ile doğrulanması önerilir. Konvansiyonel RT-PCR test ile influenza A virus örneklerin 94'ünde (%19.7) tespit edildi. Konvansiyonel RT-PCR testinin ise sensitivitesi %96 oranında oldukça yüksek olup real-time RT-PCR test ekipmanının bulunmadığı laboratuvarlarda kullanımı uygundur.

Çalışmamızda DFA testinin sensitivitesi %72.4 olup 2009 yılında influenza A H1N1 pandemik virus salgını sırasında yapılan çalışmalardan Boston'da Sandora ve ark.'nın bildirdiği %57.3, Almanya'da Ganzenmurella ve ark.'nın %38.7, ve Arizona'da Bakerman ve ark.'nın %65 bulgularından yüksek, Kaliforniya'da Nutter ve ark.'nın %75'lik bulgusuna benzer ve Connecticut'da Landry ve ark.'nın %84.6 ve New York'da Leonardi ve ark.'nın %80 oranındaki bulgusundan düşüktür. Bu çalışmada DFA testinin spesifitesi ise %99.2 olup yine aynı araştırmacıların bildirdiği sırasıyla %99.7, %99.8, %99.6, %94, %99.3 ve %100 spesifite oranları ile uyumludur^(123,124,125,126,127,128).

Çoğu alt solunum yolu enfeksiyonu olan 476 hastada bulduğumuz %20.5'lik influenza virus A enfeksiyon insidansı ülkemizde yapılan benzer çalışmalarda tespit edilen Konya'da %18.3, Afyon'da %17.3 oranlarına benzer, ancak Konya'da Hatipoğlu ve ark.'nın bulduğu %9.3, İstanbul'da %6.4, Manisa'da %5.9 ve Aydın'da %3.4 oranlarından oldukça yüksektir⁽¹¹⁷⁻¹²²⁾.

Diğer ülkelerde yapılan çalışmalarda ise Endonezya'da %21.7, Çin'de %19.5 ve Vietnam'da %17.9 influenza A virus enfeksiyon oranları bizim %20.5'lik bulgumuz ile uyumlu olup, Laos'da %9.1, İtalya'da %9.6, Hong Kong'da %7.2, Kamboçya'da %6 ve Kore'de %5.6 oranları ise daha düşüktür⁽¹²⁹⁻¹³⁶⁾. İnfluenza A(H1N1) pandemisinin olduğu 2009 yılında Connecticut, Kaliforniya, Boston, Arizona ve New York'da yapılan çalışmalarda ise SYE olan hastalarda pandemik A(H1N1) virus enfeksiyonu %45.2, %38, %37.5, %31.8 ve %23.6 gibi oldukça yüksek oranlarda bulunmuştur^(123,125-128).

Çalışmamızda influenza A virus pozitif 98 hastanın 1 Nisan 2012 ve 31 Aralık 2013 döneminde aylara göre dağılımına bakıldığında vakalar en fazla 15 vaka ile Ocak 2013 ve 13 vaka ile Aralık ayında tespit edildi. İnfluenza B pozitif 16 vakadan 6'sı 2013

yılının Ocak ayında görüldü. İnfluenza virus enfeksiyonuna 2012 yılının Mayıs, Haziran Temmuz ve 2013 yılının Mayıs, Haziran, Temmuz ve Ağustos aylarında rastlanmadı.

İnfluenza A virus alttıplemesi yapıldığında 1 Nisan 2012 ve 31 Aralık 2013 döneminde 98 influenza virus izolatının 62'sinin (%63.3) A(H1N1)pdm09 ve 36'sının (%36.7) A(H3N2) olduğu bulundu. İnfluenza A(H1N1)pdm09 alttıpi 1 Nisan 2012 ve 30 Nisan 2013 arasındaki dönemde toplam 66 influenza izolatının 52'sini (%78.8) ve H3N2 ise 14'ünü (%21.2) oluşturmuştur. Sonraki 1 Mayıs ve 31 Aralık döneminde ise 32 influenza A izolatının 10'u (%31.3) A(H1N1)pdm09 alttıpi olup 22'si (%68.7) H3N2 idi. İnfluenza A(H1N1)pdm09 alttıpinin Ocak 2013'de 12 vaka ile pik yaparken, H3N2 alttıpinin ise Aralık 2013'de 11 vaka ile pik yaptığı gözlemlendi (Şekil 4).

İnfluenza B virus 1 Nisan 2012 ve 31 Aralık 2013 arasındaki sürede SYE olan toplam 476 hastadan real-time PCR yöntemi ile 16'sında (%3.3) tespit edilmiştir. İnfluenza B virus enfeksiyon insidansı 1 Nisan 2012 ve 30 Nisan 2013 arasındaki dönemde %3.5 (12/334) iken sonraki 1 Mayıs ve 31 Aralık 2013 döneminde ise %2.8 (4/142) bulunmuştur.

Bu çalışmada influenza A(H1N1)pdm09 alttıpi 1 Nisan 2012 ve 30 Nisan 2013 arasındaki dönemde (14. hafta/2012-17. hafta/2013) toplam 66 influenza izolatının %78.8'ini, H3N2 ise %21.2'sini oluşturmuştur. Ülkemizde ise influenza surveyansı 2012-2013 sezonunda (40. hafta/2012-20. hafta/2013) 1027 influenza virus pozitif vakaların %92,5'i influenza A(H1N1)pdm09, %4,6'sı influenza A(H3N2) olup bizim bulgularımız ile uyumlu olarak yine influenza A(H1N1)pdm09 baskın bulunmuştur⁽¹⁴⁰⁾. İnfluenza B virus insidansı bu çalışmada 1 Nisan 2012 ve 30 Nisan 2013 arasındaki dönemde %3.5 olup ülkemize ait %2,7'lik bulguya benzerdir⁽¹⁴⁰⁾.

Yine çalışmamızda 1 Mayıs ve 31 Aralık 2013 döneminde (18. hafta/2013-52. hafta/2013) ise 32 influenza A izolatından çoğu %68.7 oranla A(H3N2) iken %31.3'ü A(H1N1)pdm09 alttıpi idi. Ülkemizde grip benzeri hastalığı olanlardan alınan örneklerin sürveyans çalışmasında 30 Eylül'den itibaren 52. hafta dahil test edilen 330 influenza virus pozitif suşun %92.1'si A(H3N2), %3.7'si A(H1N1)pdm09 ve %4.2'si influenza B olarak tanımlanmış olup bulgumuza benzer şekilde yine A(H3N2) baskın bulunmuştur⁽¹⁴¹⁾. Avrupa'daki influenza sürveyans sonuçları da 2013 yılının 21. ve 38. haftaları arasında A(H3N2) %58.4 oranla A(H1N1)pdm09 alttıpine (%41.6) göre daha

fazla oranda iken 40. ve 52. haftalar arası dönemde A(H3N2) artarak %63'e yükselmiş, (H1N1)pdm09 ise daha düşük, %37 oranında tespit edilmiştir⁽¹³⁷⁾.

Çalışmamızda 2013 Aralık ayında influenza A virus pozitif 13 suşun 11'i (%84.6) A(H3N2) olarak tespit edildi. Ülkemizde de 2013 Aralık ayında influenza A virus pozitif suşların %96.3'ü (265/275) influenza A(H3N2) olup baskın bulunmuştur⁽¹⁴¹⁻¹⁴⁴⁾. Avrupa'da ise 2013 Aralık ayında %69 (271/393)oranla yine influenza A(H3N2) alttipi baskın olup A(H1N1)pdm09 oranı %31'dir (122/393)⁽¹³⁷⁾.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde 1 Nisan 2012 ve 31Aralık 2013 tarihleri arasında SYE sebebi ile yatırılan 476 hastada real-time RT-PCR test, konvansiyonel RT-PCR ve DFA testi ile influenza tip A ve B virus enfeksiyonlarının insidansının ve influenza tip A virus alttiplerinin tespiti için yapılan çalışmanın sonuçları;

1. Çalışma grubunda SYE olan 476 hastanın 278'i (%58.4) erkek, 198'i (%41.6) kızdı. Hastaların %43.3'ü 2 yaş ve altında olup, %16'sı 3-5 yaş arasında olmak üzere toplam %59.3'ü 5 yaş ve altındaki grupta yer aldı. Diğer 6-10, 11-20 ve 20-65 yaş grupları ise vakaların sırasıyla %13.4, %14.5 ve %12.8'ini oluşturdu.
2. SYE olan hastalara ait nazofaringeal örneklerin %30.7 oranla çoğu çocuk yoğun bakım bölümünde olmak üzere diğerleri azalan oranlarda %16.4'ü çocuk onkoloji, %11.3'ü büyük çocuk, %10.3'ü süt çocuğu, %8.8'i yenidoğan yoğun bakım, %6.5'i enfeksiyon hastalıkları, %5.9'u çocuk enfeksiyon, %4.8'i göğüs hastalıkları, %3.8'i çocuk hematoloji ve %1.5'i çocuk allerji bölümlerinden gönderildi.
3. Real-time PCR yöntemi ile çalışma grubunda influenza A virus enfeksiyon insidansının %20.5 (98/476) ve influenza B virus enfeksiyon insidansının %3.3 (16/476) olduğu tespit edildi.
4. İnfluenza A virus enfeksiyonu %36.7 oranla en yüksek ≤ 2 yaş grubunda ve %25.5'i de 3-5 yaş grubunda görüldü. İnfluenza A enfeksiyonu olan 98 hastanın 56'sı (%57.2) erkek ve 42'si (%42.8) kız idi. İnfluenza B virus enfeksiyonu olan 16 hastanın ise 11'i erkek ve 5'i kız olup vakaların %37.5'i ≤ 2 yaş ve altında idi.
5. İnfluenza A virus (98 vaka) ve influenza B virus (16 vaka) enfeksiyonu olan toplam 114 hastanın kliniklere dağılımına bakıldığında çoğu çocuk yoğun bakım (%27.2) ve çocuk onkoloji (% 23.7) bölümlerinde yatan hastalardı. Pnömoni,

bronşiolit, ÜSYE ve altta yatan hastalığı olup SYE olan influenza A virus pozitif hastaların oranı sırasıyla %17.4, %23.2, %25.7 ve %21.1 olup influenza B ile enfekte hastalarda ise bu oranlar sırasıyla % 2.9, %4.6 , %2.8 ve %3.4 idi.

6. İnfluenza enfeksiyonu olan 114 çocukta görülen klinik belirtilerin sırasıyla öksürük (%66.6), ateş (%55.2), burun tıkanıklığı (%49.1), solunum güçlüğü (%43.8), takipne (%39.4), burun akıntısı (%34.2), boğaz ağrısı (%32.4) ve bulantı ve kusma (%26.3) olduğu görüldü.
7. Çalışmamızda influenza A virus pozitif 98 hastanın 1 Nisan 2012 ve 31Aralık 2013 döneminde aylara göre dağılımına bakıldığında vakalar en fazla 15 vaka ile 2013 yılının Ocak ve 13 vaka ile Aralık ayında tespit edildi. İnfluenza B pozitif 16 vakadan 6'sı 2013yılının Ocak ayında görüldü. İnfluenza virus enfeksiyonuna 2012 yılının Mayıs, Haziran Temmuz ve 2013 yılının Mayıs, Haziran, Temmuz ve Ağustos aylarında rastlanmadı.
8. İnfluenza A virus alttiplemesi yapıldığında 1 Nisan 2012 ve 31Aralık 2013 döneminde 98 influenza virus izolatının 62'sinin (%63.3) A(H1N1)pdm09 ve 36'sının (%36.7) A(H3N2) olduğu bulundu.
9. İnfluenza A(H1N1)pdm09 alttipi 1 Nisan 2012 ve 30 Nisan 2013 arasındaki dönemde toplam 66 influenza izolatının 52'sini (%78.8), H3N2 ise 14'ünü (%21.2) oluşturdu. Sonraki 1 Mayıs ve 31 Aralık döneminde ise 32 influenza A izolatının 10'u (%31.3) A(H1N1)pdm09 alttipi olup 22'si (%68.7) H3N2 idi. İnfluenza A(H1N1)pdm09 alttipi Ocak 2013'de 12 vaka ile pik yaparken, H3N2 alttipi ise Aralık 2013'de 11 vaka ile pik yaptı.
10. İnfluenza A ve B için real-time RT-PCR test (Sacace, Italy) referans alındığında influenza A ve B için DFA testi (Argene SA, France) ve influenza A için WHO primerlerinin (M30F2/08 ve M264R3/08) kullanıldığı konvansiyonel RT-PCR testinin sensitivitesi sırasıyla %72.4, %75, %96, spesifitesi %99.2, %99.5 ve %100 bulundu.
11. Hasta yönetiminde hızlı tanı için DFA testi kullanılabilir, ancak negatif test sonuçlarının RT-PCR test ile doğrulanması önerilir. İnfluenza A virus konvansiyonel RT-PCR testi ile örneklerin %19.7'sinde (94) tespit edilmiştir. Konvansiyonel RT-PCR testinin sensitivitesi %96 oranında oldukça yüksek olup

real-time RT-PCR test ekipmanının bulunmadığı laboratuvarlarda kullanımı uygundur.

Sonuç olarak çalışma grubumuzda influenza A virus enfeksiyonu %20.5 gibi oldukça yüksek bir oranda ve influenza B virus enfeksiyon insidansı %3.3 tespit edilmiştir. Çalışma süresi boyunca influenza pozitif vakaların %63.3'ü A(H1N1)pdm09 ve %36.7'si A(H3N2) olup influenza aşısında bulunan alttipler ile uyumludur. Dolaşımdaki influenza virus tipleri ve alttiplerinin izlenmesi, influenza aşı suşları ile uyumunun değerlendirilmesi ve pandemik potansiyeli olan influenza virus alttiplerinin erken tanısı için gereklidir. İnfluenza enfeksiyonlarına karşı etkili korunma ve kontrol önlemlerinin zamanında alınması, gereksiz antibiyotik kullanımının azaltılması ve antiviral tedavinin uygulanması için influenza enfeksiyonlarının erken tanısında real-time RT-PCR testinin kullanımı önerilir.

7. KAYNAKLAR

1. **Clark NM, Lynch JP.** Influenza: epidemiology, clinical features, therapy, and prevention. *Semin Respir Crit Care Med*, **2011**;32(4):373-92.
2. **Nicholson KG, Wood JM, Zambon M.** Influenza. *Lancet*. 2003;362(9397):1733-45. *Lancet*, **2003**;362(9397):1733-45.
3. **Stephenson I, Zambon M.** The epidemiology of influenza. *Occup Med (Lond)*, **2002**;52(5):241-7.
4. **Rothberg MB, Haessler SD.** Complications of seasonal and pandemic influenza. *Crit Care Med*, **2010**;38(4 Suppl):e91-7.
5. **Rothberg MB, Haessler SD, Brown RB.** Complications of viral influenza. *Am J Med*, **2008**;121(4):258-64.
6. **Petric M, Comanor L, Petti CA.** Role of the laboratory in diagnosis of influenza during seasonal epidemics and potential pandemics. *J Infect Dis*, **2006**;194 Suppl 2:S98-110.
7. **Sarangi MJ.** A review on swine flu. *JAPR*, **2012**; 3(4): 58- 69.
8. **Nayak DP, Balogun RA, Yamada H, Zhou ZH, Barman S.** Influenza virus morphogenesis and budding. *Virus Res*, **2009**;143(2):147–161.
9. **Noda T.** Native morphology of influenza virions. *Front Microbiol*, **2012**;2:269.
10. **Couceiro JN, Paulson JC, Baum LG.** Influenza virus strains selectively recognize sialyloligosaccharides on human respiratory epithelium; the role of the host cell in selection of hemagglutinin receptor specificity. *Virus Res*, **1993**;29(2):155-65.
11. **Matrosovich MN, Matrosovich TY, Gray T, Roberts NA, Klenk HD.** Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2004**;101(13):4620-4624.

12. **Li KS, Guan Y, Wang J, Smith GJ, Xu KM, Duan L, Rahardjo AP, Puthavathana P, Buranathai C, Nguyen TD, Estoepangestie AT, Chaisingh A, Auewarakul P, Long HT, Hanh NT, Webby RJ, Poon LL, Chen H, Shortridge KF, Yuen KY, Webster RG, Peiris JS.** Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. *Nature*, **2004**;430(6996):209-13.
13. **Morens DM, Fauci AS.** The 1918 influenza pandemic: insights for the 21st century. *J Infect Dis*, **2007**;195:1018–28.
14. **Skehel JJ, Wiley DC.** Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem*, **2000**;69:531–569.
15. **Pinto LH, Lamb RA.** The M2 proton channels of influenza A and B viruses. *J Biol Chem*, **2006**;281(14):8997–9000.
16. **Boulo S, Akarsu H, Ruigrok RW, Baudin F.** Nuclear traffic of influenza virus proteins and ribonucleoprotein complexes. *Virus Res*, **2007**;124(1-2):12–21.
17. **Plotch SJ, Tomasz J, Krug RM.** Absence of detectable capping and methylating enzymes in influenza virions. *J Virol*, **1978**;28(1):75–83.
18. **Watanabe T, Watanabe S, Kawaoka Y.** Cellular networks involved in the influenza virus life cycle. *Cell Host Microbe*, **2010**;7(6):427-39.
19. **Samji T.** Influenza A: understanding the viral life cycle. *Yale J Biol Med*, **2009**;82(4):153-9.
20. **Michael P, Brabant D, Bleiblo F, Ramana CV, Rutherford M, Khurana S, Tai TC, Kumar A, Kumar A.** Influenza A induced cellular signal transduction pathways. *J Thorac Dis*, **2013**;5(Suppl 2):S132-41
21. **Rossman JS, Lamb RA.** Influenza virus assembly and budding. *Virology*, **2011**;411(2):229-36.
22. **Thompson WW, Shay DK, Weintraub E, Brammer L, Cox N, Anderson LJ, Fukuda K.** Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States. *JAMA*, **2003**;289(2):179-86.
23. **Peiris JS, Yu WC, Leung CW, Cheung CY, Ng WF, Nicholls JM, Ng TK, Chan KH, Lai ST, Lim WL, Yuen KY, Guan Y.** Re-emergence of fatal human influenza A subtype H5N1 disease. *Lancet*, **2004**;363(9409):617-19.
24. **Taubenberger JK, Morens DM.** The pathology of influenza virus infections. *Annu Rev Pathol*, **2008**;3:499-522.
25. **Kuiken T, Riteau B, Fouchier RA, Rimmelzwaan GF.** Pathogenesis of influenza virus infections: the good, the bad and the ugly. *Curr Opin Virol*, **2012**;2(3):276-86

26. **Zambon MC.** The pathogenesis of influenza in humans. *Rev Med Virol*, **2001**;11(4):227-41.
27. **Almond MH, McAuley DF, Wise MP, Griffiths MJ.** Influenza-related pneumonia. *Clin Med*, **2012**;12(1):67-70.
28. **Rello J, Pop-Vicas A.** Clinical review: primary influenza viral pneumonia. *Crit Care*, **2009**;13(6):235.
29. **Simonsen L, Clarke MJ, Schonberger LB, Arden NH, Cox NJ, Fukuda K.** Pandemic versus epidemic influenza mortality: a pattern of changing age distribution. *J Infect Dis*, **1998**;178(1):53-60.
30. **Bonner AB, Monroe KW, Talley LI, Klasner AE, Kimberlin DW.** Impact of the rapid diagnosis of influenza on physician decision-making and patient management in the pediatric emergency department: results of a randomized, prospective, controlled trial. *Pediatrics*, **2003**;112(2):363-7.
31. **Barenfanger J, Drake C, Leon N, Mueller T, Troutt T.** Clinical and financial benefits of rapid detection of respiratory viruses: an outcomes study. *J Clin Microbiol*, **2000**;38(8):2824-8.
32. **Jennings LC, Skopnik H, Burckhardt I, Hribar I, Del Piero L, Deichmann KA.** Effect of rapid influenza testing on the clinical management of paediatric influenza. *Influenza Other Respir Viruses*, **2009**;3(3):91-8.
33. **Kim DK, Poudel B.** Tools to detect influenza virus. *Yonsei Med J*, **2013**; 54(3):560-6.
34. **Talbot HK, Williams JV, Zhu Y, Poehling KA, Griffin MR, Edwards KM.** Failure of routine diagnostic methods to detect influenza in hospitalized older adults. *Infect Control Hosp Epidemiol*, **2010**;31(7):683-8.
35. **Liao RS, Tomalty LL, Majury A, Zoutman DE.** Comparison of viral isolation and multiplex real-time reverse transcription-PCR for confirmation of respiratory syncytial virus and influenza virus detection by antigen immunoassays. *J Clin Microbiol*, **2009**; 47:527–532.
36. **Uyeki TM.** Influenza diagnosis and treatment in children: a review of studies on clinically useful tests and antiviral treatment for influenza. *Pediatr Infect Dis J*, **2003**;22(2):164-77.
37. **Chartrand C, Leeflang MM, Minion J, Brewer T, Pai M.** Accuracy of rapid influenza diagnostic tests: a meta-analysis. *Ann Intern Med*, **2012**;156(7):500-11.
38. **Uyeki TM, Prasad R, Vukotich C, Stebbins S, Rinaldo CR, Ferng YH, Morse SS, Larson EL, Aiello AE, Davis B, Monto AS.** Low sensitivity of rapid diagnostic test for influenza. *Clin Infect Dis*, **2009**;48(9):e89-92.

39. **Andresen DN, Kesson AM.** High sensitivity of a rapid immunochromatographic test for detection of influenza A virus 2009 H1N1 in nasopharyngeal aspirates from young children. *J Clin Microbiol*, **2010**; 48:2658–2659.
40. **Dale SE, Mayer C, Mayer MC, Menegus MA.** Analytical and clinical sensitivity of the 3M rapid detection influenza A+B assay. *J Clin Microbiol*, **2008**; 46:3804–3807
41. **Pollock NR, Duong S, Cheng A, Han LL, Smole S, Kirby JE.** Ruling out novel H1N1 influenza virus infection with direct fluorescent antigen testing. *Clin Infect Dis*, **2009**;49(6):e66-8.
42. **Johnson J, Higgins A, Navarro A, Huang Y, Esper FL, Barton N, Esch D, Shaw C, Olivo PD, Miao LY.** Subtyping influenza A virus with monoclonal antibodies and an indirect immunofluorescence assay. *J Clin Microbiol*, **2012**;50(2):396-400.
43. **Wang R, Taubenberger JK.** Methods for molecular surveillance of influenza. *Expert Rev Anti Infect Ther*, **2010**;8(5):517-27.
44. **Chauhan N, Narang J, Pundir S, Singh S, Pundir CS.** Laboratory diagnosis of swine flu: a review. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, **2013**;41(3):189-95.
45. **Kumar S, Henrickson KJ.** Update on influenza diagnostics: lessons from the novel H1N1 influenza A pandemic. *Clin Microbiol Rev*, **2012**;25(2):344-61.
46. **Vernet G.** Use of molecular assays for the diagnosis of influenza. *Expert Rev Anti Infect Ther*, **2007**;5(1):89-104.
47. **Taubenberger JK, Layne SP.** Diagnosis of influenza virus: coming to grips with the molecular era. *Mol Diagn*, **2001**;6(4):291–305.
48. **Mahony JB, Petrich A, Smieja M.** Molecular diagnosis of respiratory virus infections. *Crit Rev Clin Lab Sci*, **2011**;48(5-6):217-49.
49. **Gall A, Hoffmann B, Harder T, Grund C, Beer M.** Universal primer set for amplification and sequencing of HA(0) cleavage sites of all influenza A viruses. *J Clin Microbiol*, **2008**;46(8):2561-2567.
50. **Wang R, Soll L, Dugan V, Runstadler J, Happ G, Slemons RD, Taubenberger JK.** Examining the hemagglutinin subtype diversity among wild duck-origin influenza A viruses using ethanol-fixed cloacal swabs and a novel RT-PCR method. *Virology*, **2008**;375(1):182–189.
51. **Alvarez AC, Brunck ME, Boyd V, Lai R, Virtue E, Chen W, Bletchly C, Heine HG, Barnard R.** A broad spectrum, one-step reverse-transcription PCR amplification of the neuraminidase gene from multiple subtypes of influenza A virus. *Virol J*, **2008**;5:77.

52. **Runstadler JA, Happ GM, Slemons RD, Sheng ZM, Gundlach N, Petrula M, Senne D, Nolting J, Evers DL, Modrell A, Huson H, Hills S, Rothe T, Marr T, Taubenberger JK.** Using RRT-PCR analysis and virus isolation to determine the prevalence of avian influenza virus infections in ducks at Minto Flats State Game Refuge, Alaska, during August 2005. *Arch Virol*, **2007**;152(10):1901–1910.
53. **Di Trani L, Bedini B, Donatelli I, Campitelli L, Chiappini B, De Marco MA, Delogu M, Buonavoglia C, Vaccari G.** A sensitive one-step real-time PCR for detection of avian influenza viruses using a MGB probe and an internal positive control. *BMC Infect Dis*, **2006**;6:87.
54. **Chen W, He B, Li C, Zhang X, Wu W, Yin X, Fan B, Fan X, Wang J.** Real-time RT-PCR for H5N1 avian influenza A virus detection. *J Med Microbiol*, **2007**;56(Pt 5):603–607.
55. **Spackman E, Suarez DL.** Type A influenza virus detection and quantitation by real-time RT-PCR. *Methods Mol Biol*, **2008**;436:19–26.
56. **Chidlow GR, Harnett GB, Speers DJ, Smith DW, Wang J, Yang Y.** Evaluation of real-time reverse transcriptase PCR assays for detection of pandemic influenza A/H1N1 2009 virus. *J Clin Microbiol*, **2011**;49(9):3444-5.
57. **Krafft AE, Russell KL, Hawksworth AW, McCall S, Irvine M, Daum LT, Connolly JL, Reid AH, Gaydos JC, Taubenberger JK.** Evaluation of PCR testing of ethanol-fixed nasal swab specimens as an augmented surveillance strategy for influenza virus and adenovirus identification. *J Clin Microbiol*, **2005**;43(4):1768–1775
58. **Giglio S, Monis PT, Saint CP.** Demonstration of preferential binding of SYBR Green I to specific DNA fragments in real-time multiplex PCR. *Nucleic Acids Res*, **2003**;31(22):e136.
59. **Daum LT, Canas LC, Schadler CA, Ujimori VA, Huff WB, Barnes WJ, Lohman KL.** A rapid, single-step multiplex reverse transcription-PCR assay for the detection of human H1N1, H3N2, and B influenza viruses. *J Clin Virol*, **2002**;25(3):345-50.
60. **Kaul KL, Mangold KA, Du H, Pesavento KM, Nawrocki J, Nowak JA.** Influenza A subtyping: seasonal H1N1, H3N2, and the appearance of novel H1N1. *J Mol Diagn*, **2010**;12(5):664-9.
61. **Furuse Y, Odagiri T, Okada T, Khandaker I, Shimabukuro K, Sawayama R, Suzuki A, Oshitani H.** Differentiation of human influenza A viruses including the pandemic subtype H1N1/2009 by conventional multiplex PCR. *J Virol Methods*, **2010**;168(1-2):94-7.
62. **Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO.** Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, **1995**;270(5235):467–470.
63. **Pease AC, Solas D, Sullivan EJ, Cronin MT, Holmes CP, Fodor SP.** Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1994**;91(11):5022–5026.

64. **Townsend MB, Dawson ED, Mehlmann M, Smagala JA, Dankbar DM, Moore CL, Smith CB, Cox NJ, Kuchta RD, Rowlen KL.** Experimental evaluation of the FluChip diagnostic microarray for influenza virus surveillance. *J Clin Microbiol*, **2006**;44(8):2863-71.
65. **Levine M, Sheu TG, Gubareva LV, Mishin VP.** Detection of hemagglutinin variants of the pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus by pyrosequencing. *J Clin Microbiol*, **2011**;49(4):1307-12.
66. **Ge Y, Cui L, Qi X, Shan J, Shan Y, Qi Y, Wu B, Wang H, Shi Z.** Detection of novel swine origin influenza A virus (H1N1) by real-time nucleic acid sequence-based amplification. *J Virol Methods*, **2010**;163(2):495-7.
67. **Moore C, Corden S, Sinha J, Jones R.** Dry cotton or flocked respiratory swabs as a simple collection technique for the molecular detection of respiratory viruses using real-time NASBA. *J Virol Methods*, **2008**;153(2):84–89.
68. **Ito M, Watanabe M, Nakagawa N, Ihara T, Okuno Y.** Rapid detection and typing of influenza A and B by loop-mediated isothermal amplification: comparison with immunochromatography and virus isolation. *J Virol Methods*, **2006**;135(2):272–275.
69. **Imai M, Ninomiya A, Minekawa H, Notomi T, Ishizaki T, Van Tu P, Tien NT, Tashiro M, Odagiri T.** Rapid diagnosis of H5N1 avian influenza virus infection by newly developed influenza H5 hemagglutinin gene-specific loop-mediated isothermal amplification method. *J Virol Methods*, **2007**;141(2):173-80.
70. **Ichinohe T, Pang IK, Iwasaki A.** Influenza virus activates inflammasomes via its intracellular M2 ion channel. *Nat Immunol*, **2010**;11(5):404-10.
71. **Pang IK, Iwasaki A.** Inflammasomes as mediators of immunity against influenza virus. *Trends Immunol*, **2011**;32(1):34-41.
72. **Wu S, Metcalf JP, Wu W.** Innate immune response to influenza virus. *Curr Opin Infect Dis*, **2011**;24(3):235-40.
73. **Haller O, Weber F.** The interferon response circuit in antiviral host defense. *Verh K Acad Geneeskd Belg*, **2009**;71(1-2):73-86.
74. **Ramos I, Fernandez-Sesma A.** Cell receptors for influenza a viruses and the innate immune response. *Front Microbiol*, **2012**;3:117.
75. **Wang J, Nikrad MP, Travanty EA, Zhou B, Phang T, Gao B, Alford T, Ito Y, Nahreini P, Hartshorn K, Wentworth D, Dinarello CA, Mason RJ.** Innate immune response of human alveolar macrophages during influenza A infection. *PLoS One*, **2012**;7(3):e29879.
76. **Wijburg OL, DiNatale S, Vadolas J, van Rooijen N, Strugnell RA.** Alveolar macrophages regulate the induction of primary cytotoxic T-lymphocyte responses during influenza virus infection. *J Virol*, **1997**;71(12):9450-7.

77. **Kreijtz JH, Fouchier RA, Rimmelzwaan GF.** Immune responses to influenza virus infection. *Virus Res*, **2011**;162(1-2):19-30.
78. **Almansa R, Bermejo-Martín JF, de Lejarazu Leonardo RO.** Immunopathogenesis of 2009 pandemic influenza. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, **2012**;30 Suppl 4:18-24.
79. **Jost S, Altfeld M.** Control of human viral infections by natural killer cells. *Annu Rev Immunol*, **2013**;31:163-94.
80. **Fleishman SJ, Whitehead TA, Ekiert DC, Dreyfus C, Corn JE, Strauch EM, Wilson IA, Baker D.** Computational design of proteins targeting the conserved stem region of influenza hemagglutinin. *Science*, **2011**;332(6031):816-21.
81. **Oshansky CM, Thomas PG.** The human side of influenza. *J Leukoc Biol*, **2012**;92(1):83-96.
82. **Gerhard W.** The role of the antibody response in influenza virus infection. *Curr Top Microbiol Immunol*, **2001**;260:171-90.
83. **Gotch F, McMichael A, Smith G, Moss B.** Identification of viral molecules recognized by influenza-specific human cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med*, **1987**;165(2):408-16.
84. **Sharma K, Tripathi S, Ranjan P, Kumar P, Garten R, Deyde V, Katz JM, Cox NJ, Lal RB, Sambhara S, Lal SK.** Influenza A virus nucleoprotein exploits Hsp40 to inhibit PKR activation. *PLoS One*, **2011**;6(6):e20215.
85. **Hale BG, Albrecht RA, García-Sastre A.** Innate immune evasion strategies of influenza viruses. *Future Microbiol*, **2010**;5(1):23-41.
86. **Graef KM, Vreede FT, Lau YF, McCall AW, Carr SM, Subbarao K, Fodor E.** The PB2 subunit of the influenza virus RNA polymerase affects virulence by interacting with the mitochondrial antiviral signaling protein and inhibiting expression of beta interferon. *J Virol*, **2010**;84(17):8433-45.
87. **van de Sandt CE, Kreijtz JH, Rimmelzwaan GF.** Evasion of influenza A viruses from innate and adaptive immune responses. *Viruses*, **2012**;4(9):1438-76
88. **Schmolke M, García-Sastre A.** Evasion of innate and adaptive immune responses by influenza A virus. *Cell Microbiol*, **2010**;12(7):873-80.
89. **Mancini N, Solforosi L, Clementi N, De Marco D, Clementi M, Burioni R.** A potential role for monoclonal antibodies in prophylactic and therapeutic treatment of influenza. *Antiviral Res*, **2011**;92(1):15-26
90. **Osterholm MT, Kelley NS, Sommer A, Belongia EA.** Efficacy and effectiveness of influenza vaccines: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*, **2012**;12(1):36-44.

91. **Centers for Disease Control and Prevention (CDC).** Prevention and control of seasonal influenza with vaccines. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices--United States, 2013-2014. *MMWR Recomm Rep*, **2013**;62(RR-07):1-43.
92. **Ulmer JB.** Influenza DNA vaccines. *Vaccine*, **2002**;20 Suppl 2:S74-6.
93. **McCaughey C.** Influenza: a virus of our times. *Ulster Med J*, **2010**;79(2):46-51.
94. **Kumar A.** Pandemic H1N1 influenza. *J Thorac Dis*, **2011**;3(4):262-70.
95. **Kurtz J, Manvell RJ, Banks J.** Avian influenza virus isolated from a woman with conjunctivitis. *Lancet*, **1996**;348(9031):901-2.
96. **Yuen KY, Chan PK, Peiris M, Tsang DN, Que TL, Shortridge KF, Cheung PT, To WK, Ho ET, Sung R, Cheng AF.** Clinical features and rapid viral diagnosis of human disease associated with avian influenza A H5N1 virus. *Lancet*, **1998**;351(9101):467-71.
97. **Maines TR, Lu XH, Erb SM, Edwards L, Guarner J, Greer PW, Nguyen DC, Szretter KJ, Chen LM, Thawatsupha P, Chittaganpitch M, Waicharoen S, Nguyen DT, Nguyen T, Nguyen HH, Kim JH, Hoang LT, Kang C, Phuong LS, Lim W, Zaki S, Donis RO, Cox NJ, Katz JM, Tumpey TM.** Avian influenza (H5N1) viruses isolated from humans in Asia in 2004 exhibit increased virulence in mammals. *J Virol*, **2005**;79(18):11788-800.
98. **Tweed SA, Skowronski DM, David ST, Larder A, Petric M, Lees W, Li Y, Katz J, Kraiden M, Tellier R, Halpert C, Hirst M, Astell C, Lawrence D, Mak A.** Human illness from avian influenza H7N3, British Columbia. *Emerg Infect Dis*, **2004**;10(12):2196-9.
99. **Koopmans M, Wilbrink B, Conyn M, Natrop G, van der Nat H, Vennema H, Meijer A, van Steenbergen J, Fouchier R, Osterhaus A, Bosman A.** Transmission of H7N7 avian influenza A virus to human beings during a large outbreak in commercial poultry farms in the Netherlands. *Lancet*, **2004**;363(9409):587-93.
100. **Ungchusak K, Auewarakul P, Dowell SF, Kitphati R, Auwanit W, Puthavathana P, Uprasertkul M, Boonnak K, Pittayawonganon C, Cox NJ, Zaki SR, Thawatsupha P, Chittaganpitch M, Khontong R, Simmerman JM, Chunsutthiwat S.** Probable person-to-person transmission of avian influenza A (H5N1). *N Engl J Med*, **2005**;352(4):333-40.
101. **Chan PK.** Outbreak of avian influenza A(H5N1) virus infection in Hong Kong in 1997. *Clin Infect Dis*, **2002**;34 Suppl 2:S58-64.
102. **Wong SS, Yuen KY.** Avian influenza virus infections in humans. *Chest*, **2006**;129(1):156-68.
103. **Payungporn S, Phakdeewirot P, Chutinimitkul S, Theamboonlers A, Keawcharoen J, Oraveerakul K, Amonsin A, Poovorawan Y.** Single-step multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for influenza A virus subtype H5N1 detection. *Viral Immunol*, **2004**;17(4):588-93.

104. **Smith JR, Rayner CR, Donner B, Wollenhaupt M, Klumpp K, Dutkowski R.** Oseltamivir in seasonal, pandemic, and avian influenza: a comprehensive review of 10-years clinical experience. *Adv Ther*, **2011**;28(11):927-59.
105. **Das K.** Antivirals targeting influenza A virus. *J Med Chem*, **2012**;55(14):6263-77.
106. **Sidwell RW, Bailey KW, Wong MH, Barnard DL, Smee DF.** In vitro and in vivo influenza virus-inhibitory effects of viramidine. *Antiviral Res*, **2005**;68(1):10-7.
107. **Calfee DP, Peng AW, Hussey EK, Lobo M, Hayden FG.** Safety and efficacy of once daily intranasal zanamivir in preventing experimental human influenza A infection. *Antivir Ther*, **1999**;4(3):143-9.
108. **Beigel JH, Farrar J, Han AM, Hayden FG, Hyer R, de Jong MD, Lochindarat S, Nguyen TK, Nguyen TH, Tran TH, Nicoll A, Touch S, Yuen KY; Writing Committee of the World Health Organization (WHO) Consultation on Human Influenza A/H5.** Avian influenza A (H5N1) infection in humans. *N Engl J Med*, **2005**;353(13):1374-85.
109. **Davison S, Benson CE, Ziegler AF, Eckroade RJ.** Evaluation of disinfectants with the addition of antifreezing compounds against nonpathogenic H7N2 avian influenza virus. *Avian Dis*, **1999**;43(3):533-7.
110. **Treanor JJ, Wilkinson BE, Masseoud F, Hu-Primmer J, Battaglia R, O'Brien D, Wolff M, Rabinovich G, Blackwelder W, Katz JM.** Safety and immunogenicity of a recombinant hemagglutinin vaccine for H5 influenza in humans. *Vaccine*, **2001**;19(13-14):1732-7.
111. **Lipatov AS, Webby RJ, Govorkova EA, Krauss S, Webster RG.** Efficacy of H5 influenza vaccines produced by reverse genetics in a lethal mouse model. *J Infect Dis*, **2005**;191(8):1216-20.
112. **World Health Organization.** WHO information for molecular diagnosis of influenza virus in humans-update. Erişim: ([http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/molecular_diagnosis_influenza_virus_humans_u](http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/molecular_diagnosis_influenza_virus_humans_update_201211.pdf) pdate_201211.pdf) Erişim Tarihi: 10.02.2014.
113. **Fraaij PL, Heikkinen T.** Seasonal influenza: the burden of disease in children. *Vaccine*, **2011**;29(43):7524-8.
114. **Harper SA, Bradley JS, Englund JA, File TM, Gravenstein S, Hayden FG, McGeer AJ, Neuzil KM, Pavia AT, Tapper ML, Uyeki TM, Zimmerman RK; Expert Panel of the Infectious Diseases Society of America.** Seasonal influenza in adults and children--diagnosis, treatment, chemoprophylaxis, and institutional outbreak management: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*, **2009**;48(8):1003-32
115. **Chan PA, Mermel LA, Andrea SB, McCulloh R, Mills JP, Echenique I, Leveen E, Rybak N, Cunha C, Machan JT, Healey TT, Chapin KC.** Distinguishing characteristics between

pandemic 2009-2010 influenza A (H1N1) and other viruses in patients hospitalized with respiratory illness. *PLoS One*, **2011**;6(9):e24734.

116. **Akçakaya N, Kılıç Ö, Camcıoğlu Y, Çokuğraş H, Midilli K.** Pediatric non-influenza respiratory viruses during pandemic influenza. *Influenza Other Respir Viruses*, **2011**;5(6):373-4.
117. **Hatipoğlu N, Somer A, Badur S, Ünüvar E, Akçay-Cıblak M, Yekeler E, Salman N, Keser M, Hatipoğlu H, Siraneci R.** Viral etiology in hospitalized children with acute lower respiratory tract infection. *Turk J Pediatr*, **2011**;53(5):508-16.
118. **Özdemir M, Yavru S, Baysal B.** Comparison of the detection of influenza A and B viruses by different methods. *J Int Med Res*, **2012**;40(6):2401-8.
119. **Beka H, Kilic A, Unuvar E, Onel M, Oguz F, Sidal M, Aslan S, Bozkaya E, Badur S, Agacfidan A.** Frequency of common viruses in etiology of acute respiratory tract infections. *Indian J Pediatr*, **2013**; 80(2):91-96.
120. **Sancaklı Ö, Yenigün A, Kırdar S.** Results of polymerase chain reaction in nasopharyngeal swab specimens of patients with lower respiratory tract infection. *J Pediatr Inf*, **2012**; 6:84-89.
121. **Yüksel H, Yılmaz O, Akçali S, Söğüt A, Yılmaz Ciftdoğan D, Urk V, Ertan P, Sanlıdağ T.** Common viral etiologies of community acquired lower respiratory tract infections in young children and their relationship with long term complications. *Mikrobiyol Bul*, **2008**;42(3):429-35.
122. **Kandemir Ö.** Solunumsal patojen virusların IFAT ve multiplex PCR yöntemleri ile tanısı. Yüksek Lisans Tezi, Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi, Afyonkarahisar, **2007**.
123. **Sandora TJ, Smole SC, Lee GM, Chung S, Williams L, McAdam AJ.** Test characteristics of commercial influenza assays for detecting pandemic influenza A (H1N1) in children. *Pediatr Infect Dis J*. **2010**;29(3):261-2.
124. **Ganzenmueller T, Kluba J, Hilfrich B, Puppe W, Verhagen W, Heim A, Schulz T, Henke-Gendo C.** Comparison of the performance of direct fluorescent antibody staining, a point-of-care rapid antigen test and virus isolation with that of RT-PCR for the detection of novel 2009 influenza A (H1N1) virus in respiratory specimens. *J Med Microbiol*, **2010**;59(Pt 6):713-7.
125. **Bakerman P, Balasuriya L, Fried O, Tellez D, Garcia-Filion P, Dalton H.** Direct fluorescent-antibody testing followed by culture for diagnosis of 2009 H1N1 influenza A. *J Clin Microbiol*, **2011**;49(10):3673-4.
126. **Landry ML, Ferguson D.** Cytospin-enhanced immunofluorescence and impact of sample quality on detection of novel swine origin (H1N1) influenza virus. *J Clin Microbiol*, **2010**;48(3):957-9.

127. **Nutter S, Cheung M, Adler-Shohet FC, Krusel K, Vogel K, Meyers H.** Evaluation of indirect fluorescent antibody assays compared to rapid influenza diagnostic tests for the detection of pandemic influenza A (H1N1) pdm09. *PLoS One*, **2012**;7(3):e33097.
128. **Leonardi GP, Mittrache I, Pigal A, Freedman L.** Public hospital-based laboratory experience during an outbreak of pandemic influenza A (H1N1) virus infections. *J Clin Microbiol*, **2010**;48(4):1189-94.
129. **Esposito S, Daleno C, Prunotto G, Scala A, Tagliabue C, Borzani I, Fossali E, Pelucchi C, Principi N.** Impact of viral infections in children with community-acquired pneumonia: results of a study of 17 respiratory viruses. *Influenza Other Respir Viruses*, **2013**;7(1):18-26.
130. **Sentilhes AC, Choumlivong K, Celhay O, Sisouk T, Phonekeo D, Vongphrachanh P, Brey P, Buchy P.** Respiratory virus infections in hospitalized children and adults in Lao PDR. *Influenza Other Respir Viruses*, **2013**;7(6):1070-8.
131. **Tran T, Chien BT, Papadakis G, Druce J, Birch C, Chibo D, An TP, Trang le TK, Trieu NB, Thuy DT, Catton M, Mai TX.** Respiratory virus laboratory pandemic planning and surveillance in central Viet Nam, 2008-2010. *Western Pac Surveill Response J*, **2012**;3(3):49-56.
132. **Zhang G, Hu Y, Wang H, Zhang L, Bao Y, Zhou X.** High incidence of multiple viral infections identified in upper respiratory tract infected children under three years of age in Shanghai, China. *PLoS One*, **2012**; 7(9):e44568.
133. **Kosasih H, Roselinda, Nurhayati, Klimov A, Xiyan X, Lindstrom S, Mahoney F, Beckett C, Burgess TH, Blair PJ, Uyeki TM, Sedyaningsih ER.** Surveillance of influenza in Indonesia, 2003–2007. *Influenza Other Respir Viruses*, **2013**;7(3):312-20.
134. **Guerrier G, Goyet S, Chheng ET, Rammaert B, Borand L, Te V, Try PL, Sareth R, Cavallier P, Mayaud C, Guillard B, Vong S, Buchy P, Tarantola A.** Acute viral lower respiratory tract infections in Cambodian children: clinical and epidemiologic characteristics. *Pediatr Infect Dis J*, **2013**;32(1):e8-13.
135. **Choi SH, Hong SB, Ko GB, Lee Y, Park HJ, Park SY, Moon SM, Cho OH, Park KH, Chong YP, Kim SH, Huh JW, Sung H, Do KH, Lee SO, Kim MN, Jeong JY, Lim CM, Kim YS, Woo JH, Koh Y.** Viral infection in patients with severe pneumonia requiring intensive care unit admission. *Am J Respir Crit Care Med*, **2012**;186(4):325-32.
136. **Sung RY, Chan PK, Tsen T, Li AM, Lam WY, Yeung AC, Nelson EA.** Identification of viral and atypical bacterial pathogens in children hospitalized with acute respiratory infections in Hong Kong by multiplex PCR assays. *J Med Virol*, **2009**;81(1):153-9.
137. **World Health Organization.** Europe influenza surveillance. EuroFlu Weekly Electronic Bulletin. Erişim: (http://www.euroflu.org/cgi-files/bulletin_v2.cgi). Erişim tarihi:10.02.2014.

138. **Korukluoğlu G.** Solunum yolu virüslerinin laboratuvar tanısı. Erişim: (http://www.klimik.org.tr/wp-content/uploads/2012/10/KL%C4%B0M%C4%B0K-28.11.2012_1.pdf). Erişim tarihi:10.02.2014.
139. **Badur S.** Grip Platformu Bülteni. Sayı 4, 2012. Geçen yıl neler yaşadık: 2011-2012 İnfluenza sezonu sürveyans bulguları. Erişim: (<http://www.gripplatformu.com/2012-2013-B%C3%BClten-1.pdf>) Erişim tarihi:10.02.2014.
140. **Korukluoğlu G.** İnfluenza virusu/solunum yolu virusleri ve 2012-2013 sezonu laboratuvar çalışmaları. Erişim: (<http://www.klimik.org.tr/wp-content/uploads/2013/10/G%C3%9CLAY-KORUKLUO%C4%9ELU-30-Ekim-2013-1.pdf>). Erişim tarihi:10.02.2014.
141. **T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu.** Haftalık İnfluenza (Grip) Sürveyans Raporu. 52. Hafta (23 Aralık - 29 Aralık). 3 Ocak 2014. Erişim: (http://www.thsk.saglik.gov.tr/Dosya/bulasici-hastaliklar-db/grip/influenza_Raporu_52_Hafta.pdf). Erişim tarihi:10.02.2014.
142. **T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu.** Haftalık İnfluenza (Grip) Sürveyans Raporu, 49. Hafta (2 Aralık - 8 Aralık). 13 Aralık 2013. Erişim: (http://www.thsk.saglik.gov.tr/Dosya/bulasici-hastaliklar-db/grip/influenza_Raporu_49_Hafta.pdf). Erişim tarihi:10.02.2014.
143. **T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu.** Haftalık influenza (grip) sürveyans raporu, 50. hafta (9 Aralık - 15 Aralık). 20 Aralık 2013. Erişim: (http://www.thsk.saglik.gov.tr/Dosya/bulasici-hastaliklar-db/grip/influenza_Raporu_50_Hafta.pdf). Erişim tarihi:10.02.2014.
144. **T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu.** Haftalık influenza (grip) sürveyans raporu, 51. hafta (16 Aralık - 22 Aralık). 27 Aralık 2013. Erişim: (http://www.thsk.saglik.gov.tr/Dosya/bulasici-hastaliklar-db/grip/influenza_Raporu_51_Hafta.pdf). Erişim tarihi:10.02.2014.
145. **Debye C, Bulkow L, Miernyk K, Chikoyak L, Hummel KB, Hennessy T, Singleton R.** Comparison of nasopharyngeal swabs and nasopharyngeal wash collection methods for respiratory virus detection in hospitalized children using real-time polymerase chain reaction. *J Virol Methods*, 2012;185(1):89-93.

8. ÖZGEÇMİŞ

Adana’da 1979 yılında doğdu. İlköğretim eğitimini Şakirpaşa İlkokulu, ortaöğretimi Necdet Kahraman Ortaokulu ve lise eğitimini Adana Erkek Lisesi’nde tamamladı. Çukurova Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünden 2006 yılında mezun oldu. Ardından 2010 yılında Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programından mezun oldu ve yine aynı yıl Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda Doktora eğitimine başladı.