

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

PEDİATRİK ONKOLOJİ HASTALARINDA İNFLUENZA VİRUS ENFEKSİYONLARI

Deniz ÖZDOĞRU SAĞDIÇ

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Fügen YARKIN**

ADANA-2017

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

PEDİATRİK ONKOLOJİ HASTALARINDA İNFLUENZA VİRUS ENFEKSİYONLARI

Deniz ÖZDOĞRU SAĞDIÇ

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Fügen YARKIN**

**Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Rektörlüğü Araştırma Fonu TDK-2015-3354
numaralı proje olarak desteklenmiştir.**

ADANA-2017

KABUL ve ONAY

Tıbbi Mikrobiyoloji Doktora Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan
“Pediatrik Onkoloji Hastalarında İnfluenza Virus Enfeksiyonları”
adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarihi: 23 / 10 / 2017

TEZ SINAV JÜRİSİ



Prof. Dr. Fügen Yarkin
Çukurova Üniversitesi
Başkan



Prof. Dr. Fatih Köksal
Çukurova Üniversitesi
Üye



Prof. Dr. Gönül Aslan
Mersin Üniversitesi
Üye



Prof. Dr. İbrahim Bayram
Çukurova Üniversitesi
Üye



Prof. Dr. Nizamî Duran
Mustafa Kemal Üniversitesi
Üye

Yukarıdaki Tez, Yönetim Kurulunun / / tarih ve
edilmiştir.

sayılı kararı ile kabul

Prof. Dr. Behice DURGUN
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca tez konumun seçilmesinde ve hazırlanmasında, tüm çalışmalarım bana yol gösteren, engin bilgisi ve tecrübesiyle yardım ve desteğini esirgemeyen, ileriki eğitim ve öğretim hayatım boyunca kişiliği ve çalışma prensibini kendime örnek edineceğim, yanında çalışmaktan onur duyduğum sevgili hocam Prof. Dr. Fügen Yarkın'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Yetişmemde emeği geçen Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Fatih Köksal'a, değerli hocalarım Prof. Dr. Akgün Yaman'a, Prof. Dr. M. Macit İlkit'e, Doç. Dr. Filiz Kibar'a ve Yrd. Doç. Dr. Toğrul Nağıyev'e teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca Çocuk Onkolojisi Bilim Dalı başkanı Prof. Dr. İbrahim Bayram'a tez çalışmama katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Doktora eğitimim boyunca, BİDEB 2211/C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Doktora Burs Programı kapsamında sunulan burs için TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Viroloji laboratuvarında büyük bir keyifle birlikte çalıştığım viroloji ekibi; Buket Şeflek, Nazlı Nida Kaya, Gökhan Öztürk, Mehmet Çimentepe ve Serap Özen'e teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde bana büyük bir özveriyle destek vererek bugünlere gelmemde en büyük rol sahibi olan, evlatları olmaktan gurur duyduğum canımdan çok sevdiğim anneme ve babama, canım kardeşime ve bu uzun süreçte her zaman yanımda olarak desteğini esirgemeyen eşime sonsuz teşekkürler...

Deniz ÖZDOĞRU SAĞDIÇ

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. İnfluenza viruslarının biyolojisi	3
2.2. Antijenik drift ve antijenik shift	6
2.2.1. Antijenik shift	7
2.2.2. Antijenik drift	8
2.3. Mevsimsel ve pandemik influenza	8
2.3.1. H2N2 influenza virus	12
2.3.2. H2N3 influenza virus	13
2.3.3. H3N9 virus	14
2.3.4. H7N7 ve H7N3 virusları	14
2.3.5. H5N1, H7N9 ve H9N2 influenza virusları	14
2.4. Klinik özellikler	17
2.4.1. Hospitalizasyon	18
2.4.2. Komplikasyonlar	19
2.4.3. Kemoterapi üzerindeki etkiler	20
2.5. Risk altındaki popülasyonlar	20
2.6. Onkoloji hastalarında influenza epidemiyolojisi	22
2.6.1. Bulaşma	22
2.6.2. Ciddi influenzaya yönelik risk faktörleri	22
2.7. Replikasyon döngüsü	23
2.7.1. İnfluenza virus girişi	24

2.7.2. Endozomal yolculuk	26
2.7.3. İnfluenza zarf füzyonu	26
2.7.4. Nükleer import	29
2.7.5. Transkripsiyon ve replikasyon	29
2.7.6. Nükleer eksport	31
2.7.7. Post-translasyonel işlem	32
2.7.8. Apoptozis yolu	32
2.7.9. Tomurcuklanma ve serbest kalma	33
2.8. İnfluenza patolojisi	34
2.8.1. İnfluenzada trakeobronşial değişiklikler	34
2.8.2. Trakea ve bronşların silyalı yalancı çok katlı epitel	35
2.8.3. Bronşiollelerin epitel dokusu	35
2.8.4. Diğer histolojik değişiklikler	35
2.8.6. Üst solunum yolu kesitlerinde influenza virus için in situ hibridizasyon veya immünohistokimyasal analiz	36
2.8.7. Epitel onarımı ve rejenerasyonun kanıtı	36
2.8.8. İnfluenza virus pnömonisi	36
2.8.9. Primer influenza virus pnömonisinin histopatolojisi	38
2.8.10. İnter pandemik, mevsimsel influenza olgularında influenza virus pnömonisi	40
2.8.11. Yüksek patojeniteli H5N1 avian influenza enfeksiyonlarında histopatolojik değişiklikler	41
2.8.12. İnfluenza virus enfeksiyonunun deneysel hayvan modelleri	42
2.9. Konak değişimi için gerekli viral adaptasyonlar ve patojenite belirleyici faktörler	44
2.10. İnfluenza virusa karşı immün cevap	46
2.11. İnfluenza virusların laboratuvar tanısı	49
2.11.1. Hücre kültürü yaklaşımlarını kullanarak virus izolasyonu	49
2.11.1.1. Viral kültür	49
2.11.1.2. Shell vial kültür	50
2.11.2. Direkt floresan antikor testi	50
2.11.3. Serolojik testler	51

2.11.3.1. Hemaglutinasyon inhibisyon testi.....	51
2.11.3.2. Virus nötralizasyon testi	52
2.11.3.3. Single radial hemoliz testi.....	52
2.11.3.4. Kompleman fiksasyonu	52
2.11.3.5. Enzim bağlı immünosorbent testi	53
2.11.4. Hızlı influenza tanı testleri.....	53
2.11.5. Çip üstü laboratuvar teknolojisi	55
2.11.6. Nükleik asit tabanlı testler	56
2.11.6.1. Reverse transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu	57
2.11.6.2. Loop-aracılı izotermal amplifikasyon testi	57
2.11.6.3. Basit amplifikasyon temelli test.....	58
2.11.6.4. Nükleik asit sekans bazlı amplifikasyon.....	58
2.11.6.5. Mikroarray tabanlı yaklaşımlar.....	59
2.11.7. Nükleik asit sekans yaklaşımları.....	61
2.11.7.1. Sanger sekanslama	61
2.11.7.2. Yeni nesil sekans	61
2.12. Aşı.....	64
2.13. İnfluenza virus enfeksiyonunun tedavisi	67
2.13.1. İnfluenza virusuna karşı antiviral ilaçlar	69
2.13.1.1. M2 inhibitörleri.....	69
2.13.1.2. NA inhibitörleri.....	69
2.13.2. Diğer lisanslı ilaçlar	71
2.13.2.1. Diğer NA inhibitörleri	71
2.13.2.2. Ribavirin	72
2.13.2.3. Arbidol	72
2.13.3. Alternatif korunma stratejileri	73
2.13.3.1. Primer kemoprofilaksi	73
2.13.3.2. Sekonder kemoprofilaksi	74
2.13.3.3. Bariyer korumaları	75
2.13.3.4. Sosyal mesafeler ve diğer müdahaleler	75
2.13.4. Yeni tedavi yaklaşımları	75
3. GEREÇ ve YÖNTEM	78

3.1. Nazofaringeal sürüntü örneklerinin toplanması.....	78
3.2. Direkt immunfloresan test (DFA) ile antijen tespiti	79
3.2.1. Örneklerin işlenmesi ve preparatların hazırlanması	79
3.2.2. Mikroskopta değerlendirme öncesi yapılan işlemler	79
3.3. İnfluenza A/H1N1, influenza A ve influenza B real-time RT-PCR	80
3.3.1. RNA ekstraksiyonu.....	80
3.3.1.1. Reaktiflerin hazırlanması.....	80
3.3.1.2. RNA ekstraksiyon aşaması	81
3.3.2. Real-time RT-PCR aşaması	81
3.4. İnfluenza A H1N1 ve H3N2 real-time PCR	83
3.4.1. RNA ekstraksiyonu.....	83
3.4.2. cDNA sentezi.....	84
3.4.3. Real-time PCR aşaması	85
4. BULGULAR.....	86
5. TARTIŞMA.....	92
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	107
KAYNAKLAR	109
ÖZGEÇMİŞ	118

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No:

Sayfa No:

Şekil 1. İnfluenza A ve B virus ile enfekte vakaların influenza sezonlarına dağılımı.....	90
Şekil 2. Pediatrik onkoloji ve hematoloji hastalarında tespit edilen influenza virusların aylara göre dağılımı	91



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No:

Sayfa No:

Tablo 1. İnfluenza A/H1N1, influenza A ve influenza B real-time RT-PCR ısı döngüsü.....	82
Tablo 2. İnfluenza A H1N1 ve H3N2 real-time PCR sıcaklık döngüsü.....	85
Tablo 3. Pediatrik onkoloji ve hematoloji hastalarının cinsiyet ve yaş gruplarına göre dağılımı.....	86
Tablo 4. Toplam 134 pediatrik hastanın tanıları.....	87
Tablo 5. İnfluenza virus pozitif hastaların cinsiyet ve yaş gruplarına göre dağılımı.....	88
Tablo 6. İnfluenza virus pozitif hastaların tanıları	88
Tablo 7. İnfluenza virus pozitif ve negatif pediatrik onkoloji ve hematoloji hastalarının klinik belirtileri.....	89
Tablo 8. İnfluenza A ve B virus için real-time PCR testi ve DFA testi sonuçları	91

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ALL	Akut Lenfoblastik Lösemi
AML	Akut Miyeloid Lösemi
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome (Akut Respiratuvar Distres Sendromu)
ASYE	Alt Solunum Yolu Enfeksiyonu
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
cDNA	Complementary DNA (Komplementer DNA)
CRM1	Chromosome region maintenance 1
DFA	Direct Fluorescent Antibody Test (Direkt Floresan Antikor Testi)
DNA	Deoksiribonükleik asit
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FDA	Food and Drug Administration
GISRS	Global Influenza Surveillance and Response System
HA	Hemagglutinin
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HKHT	Hematopoetik Kök Hücre Transplantasyonu
HPAI	Highly Pathogenic Avian Influenza
Ig	Immunoglobulin
ILI	Influenza-like illness
IFN	İnterferon
kDa	Kilodalton
LAMP	Lysosomal-Associated Membrane Protein
LAMP	Loop-Aracılı İzotermal Amplifikasyon
M	Matriks
NA	Nöraminidaz
NASBA	Nükleik Asit Sekans Bazlı Amplifikasyon
NGS	Next-Generation Sequencing (Yeni nesil sekans)
nm	Nanometre

NP	Nükleoprotein
NS-1	Non-structural Protein Type 1 (Yapısal olmayan protein tip 1)
NS-2	Non-structural Protein Type 2 (Yapısal olmayan protein tip 2)
PA	Polimeraz Asidik Protein
PBS	Phosphate Buffered Saline
PB1	Polimeraz Bazik Protein- 1
PB1-F2	Polimeraz Bazik Protein 1- F2
PB2	Polimeraz Bazik Protein- 2
PCR	Polymerase Chain Reaction
PIV	Parainfluenza virus
PI3K	Phosphoinositide 3- kinase
RIDTs	Rapid Influenza Diagnostic Tests (Hızlı influenza tanı testleri)
RNA	Ribonükleik asit
RNP	Ribonükleoprotein
RSV	Respiratory Syncytial Virus
RT-PCR	Reverse Transcriptase PCR
SAMBA	Simple Amplification-based Assay (Basit amplifikasyon temelli test)
TCID₅₀	Tissue Culture Infective Dose 50 (Doku kültürü infeksiyöz doz 50)
ÜSYE	Üst Solunum Yolu Enfeksiyonu
vRNP	Viral Ribonükleoprotein
WHO	World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)

ÖZET

Pediyatrik Onkoloji Hastalarında İnfluenza Virus Enfeksiyonları

İnfluenza virus enfeksiyonu pediyatrik onkoloji hastalarında morbidite ve mortalitenin önemli bir sebebidir.

Bu çalışmanın amacı pediyatrik onkoloji ve hematoloji hastalarında influenza virus enfeksiyonlarının insidansı ve influenza A virus alt tiplerinin tespit edilmesidir. Ocak 2014 ve Eylül 2017 tarihleri arasında solunum yolu enfeksiyonu olan 134 çocuktan floocked eküvyon (Copan Diagnostics, Italy) ile nazofaringeal sürüntü örnekleri alınmıştır. İnfluenza A ve B virus varlığını araştırmak için real-time PCR testi (RealStar Influenza S & T RT-PCR Kit 3.0, Altona Diagnostics, Germany) ve antijen tespiti için direkt floresan antikor testi (Argene SA, France) kullanılmıştır. İnfluenza A virus pozitif örnekler H1N1 ve H3N2 alt tiplerinin tanısı için influenza A H1N1 ve H3N2 Real-TM PCR testi (Sacace, Italy) ile analiz edilmiştir. Real-time RT-PCR ile 134 çocuğun %35'inde (47) influenza A virus ve %6'sında (8) influenza B virus olmak üzere influenza virus %41 (55/134) oranında tespit edilmiştir. İnfluenza A virus pozitif örneklerin 25'i (%18.7) influenza A/H1N1 ve 22'si (%16.4) influenza A/H3N2'dir. İnfluenza A ve B virus için real-time PCR testine göre DFA testinin sensitivitesi sırasıyla %83, %100 ve spesifitesi %97.7 ve %100 bulunmuştur.

Sonuç olarak pediyatrik onkoloji ve hematoloji hastalarında influenza virus enfeksiyonlarının real-time PCR test ile erken tanısı, antiviral tedaviye zamanında başlanmasıyla influenzaya bağlı ciddi komplikasyonları önleyecektir.

Anahtar sözcükler: Alt tiplendirme, direkt floresan antikor test, influenza A virus, influenza B virus, real-time RT-PCR

ABSTRACT

Influenza Virus Infections in Pediatric Oncology Patients

Influenza virus infection is a major cause of morbidity and mortality in pediatric oncology patients.

The aim of this study was to determine the incidence of influenza virus infections and influenza A virus subtypes in pediatric oncology and hematology patients. Between January 2014 and September 2017, nasopharyngeal swab specimens were collected by flocked swabs (Copan Diagnostics, Italy) from 134 children with respiratory tract infection. Real-time PCR test (RealStar Influenza S & T RT-PCR Kit 3.0, Altona Diagnostics, Germany) was used to investigate the presence of influenza A and B virus and direct fluorescent antibody test (Argene SA, France) was performed for antigen detection. Influenza A virus-positive samples were analyzed by influenza A H1N1 and H3N2 Real-TM PCR test (Sacace, Italy) to identify H1N1 and H3N2 subtypes. Of 134 children, influenza virus was found in 41 (55), of which influenza A virus in 35 (47) and influenza B virus in 6 (8) by real-time PCR test. Of influenza A virus positive samples, 25 (18.7%) were influenza A/H1N1 and 22 (16.4%) were influenza A/H3N2. In comparison to real-time PCR test, sensitivity of DFA test for influenza A and influenza B virus was 83%, 100% and specificity was 97.7% and 100%, respectively.

In conclusion, early diagnosis of influenza virus infections in pediatric oncology and hematology patients using real-time PCR test will prevent serious influenza-related complications by starting antiviral treatment on time.

Key Words: Subtyping, direct fluorescent antibody test, influenza A virus, influenza B virus, real-time RT-PCR

1. GİRİŞ

İnfluenza virus, bütün dünyada yaygın olarak görülen bulaşıcı akut solunum yolu hastalığı olan gribin etkenidir. İnfluenza virus hem mevsimsel endemik enfeksiyonlara hem de pandemilere sebep olur. Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization; WHO), tarafından yıllık epidemilerin dünya nüfusunun %5-15'ini etkilediği ve 4-5 milyon ciddi vaka ve 250.000 ila 500.000 ölüme sebep olduğu bildirilmektedir. Yıllık mevsimsel epidemilere ek olarak influenza H1N1 ve H3N2 virusları, 1918'de "İspanyol gribi", 1958'de "Asya gribi", 1968'de "Hong Kong gribi" ve daha yeni olarak 2009 H1N1 pandemisi olmak üzere dört büyük influenza pandemisine sebep olmuştur. Kayıtlardaki en şiddetli salgın olan 1918 yılında dünya genelinde yaklaşık 50 milyon insan ölmüştür^(1,2,3).

Orthomyxoviridae ailesine ait olan influenza viruslar, 11 proteini kodlayan, tek sarmallı, negatif polariteli ribonükleik asit (RNA) genomu içermektedir. Bu aile, internal glikoproteinleri nükleoprotein (NP) ve matriks (M) protein farklılıklarına göre sınıflandırılan dört influenza virus cinsinden (influenza virus A, influenza virus B, influenza virus C ve influenza virus D) oluşmaktadır. İnfluenza A viruslar insanları, kuşları, domuzları, atları ve diğer hayvanları enfekte ederken, influenza B ve C viruslar yalnızca insanlarda bulunmaktadır. İnfluenza A viruslar, viral yüzey glikoproteinleri hemagglutinin (HA) ve nöraminidaza (NA) göre çeşitli alt tiplere ayrılmaktadır. İnfluenza A virusunun potansiyel olarak 144 HA ve NA kombinasyonu oluşturan 18 HA (H1-H18) ve 11 NA (N1-N11) alt tipi vardır. Ördekler, kazlar ve kuğular gibi akuatik kuşlar bu alt tiplerin doğal rezervuarıdır^(3,4).

İnfluenza enfeksiyonu genellikle bir hafta içinde düzelen ateşli solunum yolu hastalığından viral pnömoni ve ensefalit gibi ciddi komplikasyonlara kadar değişen klinik tabloya sebep olabilir. İnfluenza için yüksek riskli gruplar genel olarak bebekler, yaşlılar ve kronik hastalığı olan insanlardır. Kemoterapi gören hematolojik veya solid kanserli hastalarda da influenza ile ilişkili komplikasyonların riski yüksektir⁽⁵⁾.

İnfluenza A ve B tedavisinde başlıca kullanılan antiviral ilaçlar oseltamivir ve zanamivir gibi NA inhibitörleridir. İmmünsüpresif konaklarda oseltamivir, beş gün süreyle olmak üzere günde iki kez 75 mg oral doz verilmektedir⁽⁴⁾.

Mevsimsel influenza enfeksiyonları yıllık olarak görüldüğü için sirkülasyondaki virus suşları yakından izlenmekte ve özellikle tanımlanmış risk popülasyonları için yıllık güncellenmiş aşılama sağlanmaktadır. En sık kullanılan trivalan inaktive altbirim aşısı iki influenza A ve bir influenza B suşu içermektedir. İnfluenza aşısı, tüm transplant alıcıları, nakil adayları, bu hastaların yakınları ve bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarla temas halinde bulunan sağlık çalışanları için önerilmektedir ^(4,6).

İnfluenza enfeksiyonlarının doğru ve erken tanısı hem mevsimsel epidemiler hem de pandemiler sırasında influenza ile ilişkili morbidite ve mortaliteyi azaltmada antiviral tedavinin hızlı başlatılması için kritik önem taşımaktadır. İnsanlarda influenza viruslarının tespiti için çeşitli yaklaşımlar mevcuttur. Bunlar arasında seroloji, hücre kültüründe viral izolasyon, immüno Floresans testler, nükleik asit amplifikasyon testi, ve immünokromatografi tabanlı hızlı tanı testleri yer almaktadır ⁽³⁾.

Bu çalışmanın amacı pediatrik onkoloji ve hematoloji hastalarında influenza virus enfeksiyonlarının insidansı ve influenza A virus alt tiplerinin real-time revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyon testi (reverse transcriptase-polymerase chain reaction; RT-PCR) ve direkt floresan antikor (Direct Fluorescent Antibody Test; DFA) testleri ile tespit edilmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İnfluenza viruslarının biyolojisi

Orthomyxoviridae ailesine ait olan influenza viruslar, zarflı, segmentli genoma sahip, tek sarmallı, negatif polariteli RNA viruslarıdır. Çekirdek proteinlerinin (NP ve M proteinleri) antijenik özellikleriyle ilgili olarak A, B ve C olmak üzere influenza viruslarının üç tipi tanımlanmıştır ⁽⁷⁾.

İnfluenza genomu küçüktür (yaklaşık 13-16 kilobaz) ve her bir RNA parçası, her biri 890 ila 2.341 nükleotidin bir veya iki genini içeren yedi veya sekiz segmentli RNA'dan oluşur. İnfluenza A ve B benzer bir yapıya sahipken influenza C daha farklıdır. İnfluenza A ve B viruslar her biri en az bir protein kodlayan sekiz ayrı gen segmenti içermektedir. İnfluenza C viruslar ise yedi segmente sahiptir. Her influenza RNA segmenti, ribonükleotid-nükleoprotein kompleksleri oluşturmak üzere nükleoproteinler ile ilişkilidir ^(7,8).

Genomun kodladığı en az 11 protein yaklaşık olarak 76-77 kilodaltonluk (kDa) HA, 60 kDa NA, 60 kDa NP, 28 kDa M1, 15 kDa M2, yapısal olmayan protein tip 1 (NS1) 26 kDa, yapısal olmayan protein tip 2 (NS2) (NEP olarak da bilinir: nükleer eksport proteini) 11 kDa, polimeraz asidik protein (PA) 85 kDa, polimeraz bazik protein 1 (PB1) 88 kDa, PB1-F2 80 kDa ve 91 kDa polimeraz bazik protein 2'dir (PB2).

Segment 1-3 üçlü polimeraz kompleksi için (sırasıyla PB1, PB2 ve PA), HA için segment 4, NA için segment 5, NP için segment 6, M proteinleri için segment 7 ve yapısal olmayan proteinler için segment 8 kodlama yapmaktadır. Gen yapıları temelinde segmentler, intronsuz, intron içeren ve "unspliced" ve intron içeren ve "spliced" (intronların çıkarılıp ekzonların birleştirilmesi) olmak üzere üç sınıfa ayrılabilir. Gen ekspresyonunun kinetiğine dayanarak "erken" (segment 1-3, 5 ve "unspliced" segment 8 transkripti) ve "geç" (segment 4, 6, 7 ve "spliced" segment 8) olarak sınıflandırılabilir. Genellikle, yapısal ve fonksiyonel/kinetik sınıflandırmalar uyum sağlamamaktadır.

Ayrıca, örtüşen genlerin ve farklı "splicing" mekanizmalarının varlığı, yakın zamanda keşfedilen ve karakterize edilen PB1-N40, PA-X, PA-N155, PA-N182, M42 ve NS3 gibi daha fazla yardımcı proteinlerin sentezine sebep olabilmektedir. Başka bir yardımcı protein olan NEG8 ORF de öngörülmüştür ^(1,8).

Böylece viral proteom beklenmedik dinamizm ve karmaşıklığı ortaya çıkarmaktadır. Matsuoka ve ark.⁽⁹⁾ Nisan 2012'den itibaren 960 faktör ve 456 reaksiyon içeren FluMap olarak adlandırılan geniş bir influenza etkileşimi haritası tasarlamışlardır.

Pleomorfik olan influenza A virus partikülü 80-120 nanometre (nm) aralığında değişiklik gösterir ve genellikle küresel olmakla birlikte 40-100 nm çap ve 300 nm-20 µm aralığında uzunlukta uzun ince tübüler formlar oluşabilmektedir. Küreselden tübüler biçime geçiş iyi anlaşılamamışsa da M1, M2 ve NP'nin bu süreci belirlemede ve modüle etmede rol oynayabildiği bilinmektedir. Genetik özelliklerin yanı sıra şekil ve kutuplaşma açısından konak hücrenin fenotipinin de viral formu etkilediği görülmektedir. İnfluenza C virusu genellikle filamentöz ve 500 nm uzunluğundayken influenza B yapısal olarak influenza A virusdan ayırt edilemeyen benzer bir şekile sahiptir.

İnfluenza B virus, HA, NA, NB ve M2 olmak üzere dört protein içerirken influenza C virus büyük yüzey glikoproteini (hemaglutinin-esteraz-füzyon protein) ve küçük yüzey glikoproteininden oluşmuştur. Bu yüzey glikoproteinleri sıralı altıgen diziler oluşturmaktadır⁽¹⁾.

Konak aralığı ve patojenite açısından üç virus tipi farklılık göstermektedir. İnfluenza B viruslarının fok balığı ve influenza C viruslarının domuzlardan ve köpeklerden izole edilmiş olmasına rağmen influenza B ve C öncelikli olarak insanlarla sınırlıdır. Bununla birlikte influenza A viruslar kuşlar, domuzlar, atlar, insanlar ve diğer memeliler gibi çok çeşitli sıcakkanlı hayvanları enfekte etmektedir^(2,10).

İnfluenza A viruslar, viriondan çıkıntı yapan HA ve NA yüzey glikoproteinlerinin antijenik karakterizasyonu ile alt bölümlere ayrılmaktadır. Doğada influenza A viruslarının 18 HA ve 11 NA alt tipi bulunmaktadır. HA alt tipleri ayrıca H1, H2, H5, H6, H8, H9, H11, H12, H13, H16, H17 ve H18'i içeren grup 1 ve H3, H4, H7, H10, H14 ve H15'i içeren grup 2 olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Akutik (su) kuşlardaki avian influenza viruslar, influenza A virusunun bilinen tüm alt tipler için doğal rezervuar görevi görür ve muhtemelen insan pandemik influenza suşlarının nihai kaynağıdır. HA'nın on altı ve NA'nın dokuz alt tipi, primer olarak kuşların yüksek vücut sıcaklığında (40°C) barsak yolunda replike olduğu akutik kuşlarda dolaşım göstermekte, α 2,3 sialik asit için hedef hücre reseptör tercihinine sahip ve esas olarak su

aracılığıyla fekal-oral yolla yayılmaktadır. İnfluenza A virusunun yarasalarda iki HA ve NA alt tipi bulunmaktadır; kültürleri yapılmamıştır, ancak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile tespit edilebilirler, inaparan (belirtisiz) hastalıklara sebep olabilirler ve sialik asit reseptörlerine bağlanmamaktadırlar. İnfluenza B viruslar, Victoria ve Yamagata olmak üzere iki köken ile tek bir alt tipe sahiptir ^(2,10,11).

İnfluenza viruslarının isimlendirilmesine ilişkin WHO yönergelerine göre ilk olarak virus tipi (A, B veya C), sonra konak (eğer insan değilse), izolasyon yeri, izolasyon numarası ve izolasyon yılı (eğik çizgilerle ayrılmış) belirlenmektedir. İnfluenza A için, parantez içinde HA (H1-H16) ve NA (N1-9) alt tipleri kaydedilmiştir. Örneğin, 2006-2007 sezonunda Amerika Birleşik Devletleri'nde en son trivalan aşı içerisinde A/Yeni Kaledonya/20/1999 (H1N1)-like, A/Wisconsin/67/2005 (H3N2)-like ve B/Malezya/2506/2004-like suşları bulunmaktadır ⁽²⁾.

Geçtiğimiz yüzyılda influenza A viruslarının (H1N1, H2N2 ve H3N2) sadece üç HA alt tipi insanlarda pandemiye sebep olmuştur. H1N1 türü 1918'deki pandemide etken olarak görülmüştür. H1N1'in soyundan gelenler, yerine H2N2 alt tipi pandemik suşun geçtiği 1957 yılına kadar insanlarda görülmüştür. H2N2 viruslar, 1968 pandemisinin H3N2 virusları ile yer değiştirdiği 1968 yılına kadar dolaşımda olmuştur. İnfluenza A alt tipleri H3N2 ve H1N1, 1977 yılında 1957 öncesi döneme ait H1N1 suşlarının tekrar ortaya çıkmasıyla insanlarda birlikte dolaşıma girmiştir. Bununla birlikte sadece H1N1, H2N2 ve H3N2'nin insanlarda enfeksiyon oluşturabileceği hipotezi hakkında şüpheyi arttıran insandan insana tutarlı bulaş olmadan avian influenza viruslarının nadiren insanlara geçişi (diğer bir deyişle, H5, H6, H7, H9 ve H10) hafif-şiddetli hastalığa sebep olur.

Atlarda yıllarca sirküle olan H7N7 influenza alt tipi (Equine-1), memelilerde stabil soy oluşturan influenza A alt tipine bir örnektir.

Akuatik kuş rezervuar türlerinde patojen olmayan iki HA alt tipi H5 ve H7, evcil kanatlılarda oldukça patojen hale gelme yetenekleri ile benzersizdir. Yüksek patojenitenin tanısıl bir karakteristik özelliği, HA molekülünün bağlayıcı peptidinde çoklu temel aminoasidin edinilmesidir. Elde edilen HA, furin enzim ailesi tarafından ayrıştırılır, enfekte konaklarda sistematik olarak yayılım gösterebilecek virus ile sonuçlanır, hemorajik ve nörolojik semptomlara sebep olur. Avian H5 ve H7 influenza viruslarının yüksek patojenitesi, viral gen segmentlerinin spesifik gruplanmasını

gerektiren poligenik bir özelliktir. H5 ve H7 virusları 1990'lı yıllardan beri insanlar da dahil olmak üzere memelilere defalarca bulaşmıştır. Mevcut durumdaki zorluk, insanlar arasında devamlı olarak bulaşma yeteneğini kazanmadan önce H5N1 ve düşük patojen H7N9 viruslarının salgınlarını kontrol etmektir.

Avian influenza viruslarının akuatik kuş rezervuarından memelilere aktarılması, zoonotik yayılımı destekleyen çok sayıda değişiklik gerektirmektedir. Bunlar, 40°C'den (kuş) 37°C'ye (memeli) düşen virus replikasyonunun optimal sıcaklığını, barsaktan solunuma değişen replikasyon bölgesi ve $\alpha 2,3$ sialik asitten $\alpha 2,6$ sialik aside değişen reseptör spesifitesini içermektedir. Kendi hücrelerinde iki farklı sialik asit reseptörlerine sahip ara konaklar (örneğin, domuz ve evcil kanatlı hayvanlar (bıldırcın ve hindiler)), influenza viruslarının türler arası geçişinde rol oynayabilir ⁽¹⁰⁾.

2.2. Antijenik drift ve antijenik shift

Yüksek sıklıkta antijenik değişikliğe uğrayan influenza viruslar RNA polimeraz komplekslerinin hata okuma ve düzeltme (proofreading) fonksiyonuna sahip olmadığı ve böylece replikasyon sırasında mutasyonların sürekli biriktiği, segmentli, negatif polariteli RNA genomuna sahiptir. Antijenik drift ve antijenik shift olarak adlandırılan bu değişiklikler, “quasispecies” olarak mevcut influenza viruslarıyla sonuçlanan devamlı süreçlerdir. İnfluenza viruslarının genleri yüksek mutasyon oranlarına sahiptir (yılda yaklaşık olarak bölge başına 1×10^{-3} ila 8×10^{-3} mutasyonlar arasında değişmektedir). Yüzey glikoproteinlerinin antijenik kısımlarındaki aminoasitleri değiştiren mutasyonlar, bağışıklıktan kaçmalarına izin vererek viral suşlar için mevcut seçici avantajlar sağlayabilmektedir. HA molekülü, belirli konak hücrelerindeki reseptörlere bağlanarak enfeksiyonu başlatır. HA proteinine karşı antikorlar reseptöre bağlanmayı önler ve aynı suşla yeniden enfeksiyonun önlenmesinde etkilidir. HA ve NA, mutasyonları sınırlayan veya antikor bağlanmasını önleyen antijenik drift veya iki influenza A virusu arasında reassortment yoluyla virusun yeni bir alt tip HA'yı edindiği antijenik shift yoluyla daha önce edinilen immüniteden kaçabilir. Yabani kanatlılarda var olduğu bilinen onaltı HA alt tipi insanlara yeni bir HA kaynağı sağlamaktadır ^(2,4).

2.2.1. Antijenik shift

Genetik yapısı yeniden düzenlenmiş suşlara sebep olan farklı influenza A virus suşlarının genetik bilgilerinin karıştırılmasına izin veren çoklu RNA segmentleri üzerinde viral genetik bilginin özel olarak düzenlenmesi, pandemik salgınlar sırasında artmış patojenite ile immünolojik açıdan naif insanları enfekte etme yeteneği ve belirli aralıklarla büyük ölçüde değişmiş özelliklere sahip virus suşlarının ortaya çıkması ile sonuçlanan antijenik shift olarak adlandırılan süreçtir. Bununla birlikte, iki influenza virus aynı anda bir konağı enfekte ettiğinde genlerin reassortment'ı ile meydana gelebildiği gibi yeni bir HA, NA veya her iki gen segmentinin akuatik kuş rezervuarından günümüzde sirkülasyondaki insan influenza viruslarına girişi ile ortaya çıkmaktadır. Akuatik kuşlarda görülen virus alt tipleri, insanlarda pandemilere sebep olanlar (H1, H2, H3) birinci grup, insanları sporadik olarak enfekte edenler (H5, H7, H9) grup 2 ve kalan alt tipler grup 3 olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır. H6N1 ve H10N8, izole insan enfeksiyonlarına sebep olduğundan, ilave alt tipler muhtemelen grup 2 olarak yeniden sınıflandırılacaktır^(4,6,10,12).

Antijenik shift ile yeni bir alt tipe sahip influenza suşunun insan dolaşımında ortaya çıkması, her iki durumda da daha önce dolaşan postpandemik insan virusunun tanımlanamayan bir avian veya avian benzeri virusun HA'sını aldığı geçmişteki iki influenza pandemisinin (1957 ve 1968) sebebi olmuştur. Her ne kadar bir pandeminin mutlak gerekliliklerinden biri HA'nın değişmesi olsa da, virusun geri kalanının ne ölçüde değişebileceği veya değiştirilmesi gerektiği bilinmemektedir. Dolaşımdaki H1N1 insan influenza virusundan HA, NA ve polimeraz kompleksinin alt birimi (PB1) olmak üzere üç gen ile avian benzeri genler 1957 yılında yer değiştirmiştir. HA ve PB1 genleri 1968'de benzer şekilde değiştirilmiştir. Son zamanlarda, 1918 influenza mağdurlarının akciğer dokularından analiz edilen viral RNA'nın küçük fragmanları için özel virolojik teknikler kullanılarak RT-PCR uygulanması ile 1918 virusunun tam dizi analizi yapılmıştır. İnfluenza 1918 pandemi virusu avian benzeri bir genoma sahiptir ve 1957 ve 1968 viruslarından farklı olarak bunun yerine bütün genom adaptasyonu ile ortaya çıktığı varsayılmaktadır⁽²⁾.

2.2.2. Antijenik drift

Küçük antijenik değişiklikler "antijenik drift" olarak adlandırılır ve reenfeksiyon ile sonuçlanabilen antikor bağlanma bölgelerindeki değişimler gibi yüzey glikoproteinlerinde minör varyasyonlara sebep olur. Antijenik drift, influenza virus ile konağın immun yanıtı arasındaki etkileşim sonucu ortaya çıkar ve bu süreçte adaptif mutasyonları hızla elde edebilme yeteneği ile karakterize edilen influenza A virus, aşamalı olarak insan immun cevabından kaçır^(4,6,10).

HA ve NA yüzey glikoproteinlerinde aminoasit mutasyonunun birinci derecede önemi vardır ve eğer mutasyon, virusa immun kontrolden kaçmasına izin verdiği ve bir uygunluk avantajı sağladığı takdirde bu virus dolaşan suşun yerini alacak yeni bir epidemik suş olarak ortaya çıkma fırsatına sahiptir. HA ve NA yüzey glikoproteinlerine karşı monoklonal antikorların varlığında seçilen kaçır mutantlarının antijenik olarak haritalanması ve dizi analizi, HA'nın küresel başı üzerinde dört antijenik bölgeyi (epitoplar) tanımlamış ve daha fazla çalışma, bu sayıyı beş antijenik bölgeye yükseltmiştir (A-E).

A/Hong Kong/1/1968 (H3N2) virusunun 46 yıl önce ortaya çıkmasından bu yana WHO, aşı kompozisyonunda 29 değişiklik önermiştir. HA moleküler analizi, antijenik drifte sebep olan aminoasitlerin mutasyonunun büyük ölçüde A-E epitoplarıyla sınırlandığını göstermiştir. Antijenik drift için en az iki antijenik bölgede dört aminoasit değişikliğinin gereklidir. H3N2 viruslarındaki antijenik drifte ilişkin güncel analiz, A ve B epitoplarının anahtar olduğunu ve bu bölgelerdeki tekli aminoasit değişikliklerinin 1968'den beri H3N2 alt tipindeki majör antijenik değişiklikleri belirlediğini göstermektedir⁽¹⁰⁾.

2.3. Mevsimsel ve pandemik influenza

Influenza A ve B ölümcül sonucu olan ağır akciğer hasarı ve hafif soğuk algınlığı semptomları gibi değişen şiddette yıllık salgınlara sebep olmaktadır. Pandemiler, klinik ve ekonomik açıdan büyük etki ile immünolojik açıdan naif olmayan insan popülasyonunda son derece hızlı yayılan ve sıklıkla artmış morbiditeye sebep olan yeniden düzenlenmiş (reassortment) insan patojenik influenza A virus suşlarının ortaya çıkmasıyla ilişkili beklenmeyen nadir olaylardır.

İnfluenza virus salgınları genellikle, düşük nem ve sıcaklık ortam koşullarının virus atılımını ve bulaşmasını uzattığı gösterilmiş ılıman bölgelerde soğuk mevsimlerde (Kuzey yarımkürede: Aralık-Nisan; Güney yarımkürede: Haziran-Eylül) görülmektedir. Subtropikal ve tropik bölgelerde, yıl boyunca tekrarlayan enfeksiyonlara izin veren influenza mevsimleri daha az tanımlanmıştır. Dolayısıyla evcil kanatlılara yakın temas gibi diğer sebeplerden dolayı Asya kıtasının yalnızca endemik olmayan insan ve aynı zamanda zoonotik influenza virus tipleri için belirli bir "rezervuar" ı temsil ettiği öne sürülmüştür.

İnfluenza B virus neredeyse sadece insanlarda bulunurken influenza A virus insan popülasyonunda her yıl tekrarlayan epidemik hastalık olarak dolaşmakta ve büyük bir zoonotik rezervuardan ortaya çıkmaktadır ⁽⁶⁾.

Genel olarak mevsimsel influenza A virus her yıl, %10'a kadar yetişkin popülasyonu ve çocukların %20'sini etkilemekte ve ciddi morbidite göstermektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde influenza viruslar her yıl 200.000'den fazla hastaneye yatış ve 30.000-50.000 ölüm ile sonuçlanan mevsimsel epidemilerden sorumludur. Bir kohort araştırması, 2003 ve 2009 yılları arasında Birleşik Devletler'de mevsimsel influenzanın, solunum yetmezliği için yapılan tüm başvuruların %3.8'inden sorumlu olduğunu ve influenza ilişkili akut solunum yetmezliği insidansını yılda 100.000 kişi başına 2.7 olarak hesaplandığını tahmin etmektedir ⁽¹³⁾. Bu durum önemli klinik ve ekonomik yük ile sonuçlanır. Birleşik Devletler için, influenza kaynaklı hastalıklar dolayısıyla sağlık bakımını kapsayan doğrudan tıbbi maliyetlerin yanı sıra iş kaybı sebebiyle ekonomik kayıpların ve azalan üretimin yılda en az 26 milyar dolar tutarında olduğu ileri sürülmüştür ^(3,6).

Yıllık kış salgınlarına ek olarak mevsimsel influenza ile karşılaştırıldığında pandemiler, her 20-30 yılda bir ortaya çıkmış ve sağlıklı genç nüfusu etkileyen daha fazla ciddi semptomlarla ilişkili bulunmuştur. Nüfusun %50 kadarı tek bir pandemik yılda enfekte olabilmekte ve influenzadan kaynaklanan ölümlerin sayısı normalde beklenenin üstünde olabilmektedir. İmmünolojik olarak naif insan popülasyonuna yeni giren pandemik influenza A virus suşları genellikle kanatlı rezervuarlardan köken almıştır ve insanda hastalığa sebep olmasına, insandan insana etkili biçimde geçmesine ve insan solunum yollarını enfekte etmesine olanak sağlayan daha ileri adaptif mutasyonların olduğu domuz gibi bir ara konakta tekrar reassortment'a uğramıştır.

İnfluenza pandemileri küresel sağlık için büyük bir tehdit oluşturmakta ve insan popülasyonu ile birlikte hayvan rezervuarlarında ortaya çıkan suşlar yetkililer tarafından sıkı bir tarama altında tutulmaktadır. WHO, yeni bir salgın riski değerlendirmek için birinci aşamadaki ilk hayvan enfeksiyonundan başlayarak, 6. evrede geniş bir coğrafi bölgeye yayılmış salgınlara kadar altı aşamalı bir pandemi ilerlemesini tanımlamıştır. Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezleri (CDC), suşla ilişkili ekoloji ve epidemiyoloji, insan popülasyonunun konak cevabı ve virus özelliklerine dayalı pandemik olaylara yol açan yeni suşların potansiyelini nitel ve nicel olarak değerlendiren yeni bir influenza risk değerlendirme çerçevesi (influenza risk assessment framework) tarif etmiştir ⁽⁶⁾.

İnfluenza salgın episodları ve virus özelliklerinin yanı sıra bir pandemiden diğerine değişiklik gösteren ilişkili konak yanıtları 19. yüzyılın sonlarından itibaren tanımlanmıştır. Geçtiğimiz 120 yılda 1889, 1918, 1957 ve 1968'de olmak üzere 1700 yılından beri yaklaşık bir düzine influenza A virus pandemisi gerçekleşmiştir. Daha az belgelenmiş olsa bile ilk olarak bilinen pandemi, 1889 "Rus gribi" (H3N8) pandemisidir. En şiddetli olan 1918 H1N1 pandemisini (İspanyol gribi) 1957'de H2N2 salgını (Asya gribi) ve 1968'de H3N2 pandemisi (Hong Kong gribi) ve en son 2009 yılında H1N1 (domuz gribi) pandemisi izlemiştir. İnsanlardan 1957 yılında kaybolan H1N1 virusu 1977'de yeniden ortaya çıkmış ve 2009 yılında 1977 virusu soyları halen sirkülasyondayken H1N1 pandemisi meydana gelmiştir. En iyi bilinen influenza pandemileri, 1918 İspanyol gribi pandemisi ve en yeni pandemi olan 2009 yılında H1N1 virusunun etken oluşu domuz gribi pandemisidir.

Taubenberger ve Morens⁽¹⁴⁾ tarafından "tüm pandemilerin annesi" olarak da adlandırılan kayıtlardaki en ölümcül influenza pandemisi olan 1918 yılındaki pandemi üç ardışık dalga halinde görülmüş ve dünya nüfusunun yaklaşık üçte birini enfekte ederek bir yıl içinde en az 50 milyon kişinin ölümünden sorumlu olmuştur.³⁸ Çoğu toplum %25 ila %40 oranlarında morbidite yaşamış ve vakaların büyük çoğunluğu kendi kendine sınırlı olmuştur. Yaşa spesifik morbidite, enfeksiyonun en yüksek oranda yaşandığı 15 yaşın altındaki çocuklar ile diğer pandemilerdekine benzemektedir. Klinik olarak 1918 pandemisi genellikle diğer yılların influenzası ile aynı semptomları ve gidişatı sunmuştur ve ciddi komplikasyonların büyük oranda solunum yolları ile sınırlı kaldığı diğer pandemilere patolojik olarak benzerdir.

Bununla birlikte 1918'deki pandemi, birkaç önemli klinik ve epidemiyolojik özellikler açısından diğer pandemilerden farklılık göstermiştir. Klinik seyir genellikle kendiliğinden sınırlandırıcı olmasına rağmen olguların önemli bir kısmında ciddi pnömonik komplikasyonlar gelişmiştir. Sonuç olarak Birleşik Devletler'deki vaka ölüm oranı, mevcut oranın birkaç katından daha yüksek bir oranda ortalama %2.5 olmuştur. Buna ek olarak 1918 pandemisi sırasında mortalite, olağandışı bir şekilde genç yaş grubunda yoğunlaşmıştır. Yaygın olarak araştırılmış olsa da 1918 pandemisi, özellikle 20 ila 40 yaş arasındaki popülasyonda yüksek ölüm oranı ile ilişkili olan hızlı yayılımdan sorumlu virusun özellikleri büyük ölçüde belirsizliğini korumaktadır. Ancak, farelerde yapılan çalışmalar İspanyol suşunun özellikle makrofaj ve nötrofil alımında düşük patojenik viruslar gibi daha büyük bir immun yanıt oluşturduğunu göstermiştir. İnfluenza ilişkili ölümlerin %99'dan fazlasını 1918 yılında 65 yaşın altındaki insanlar oluşturmuştur. Buna karşılık, 1957 ve 1968 pandemilerinde 65 yaş altı insanlarda influenza sebebiyle aşırı ölümler sırasıyla sadece %36 ve %48 oranlarında görülmüştür.

Bununla birlikte, gözlemlenen patolojik değişikliklerin spektrumu, pandemiden pandemiye veya interpandemik yıllara göre çok az farklılık göstermektedir. Daha az şiddetli pandemiler ve mevsimsel influenza enfeksiyonlarında görülen vakaların 1918 influenza vakalarından ayrımı, ciddi ve ölümcül vakalarda gözlemlenen patolojinin spektrumu değil ölüm oranının önemli ölçüde daha yüksek olması (sadece 1918 pandemisi) ve sıradışı yaş dağılımı olan ölümlerdir. Daha önce sağlıklı olan genç yetişkinler 1918 yılında ölümcül influenza enfeksiyonuna yenik düşerken yaşlılarda beklenen ölüm oranları daha düşük gözlenmiştir. Geçmişteki iki pandemi ve özellikle interpandemik mevsimsel influenza vakalarında ölümcül sonuçlar, altta yatan kronik hastalıkları olan veya aşırı uç yaşta bulunan insanlarda ortaya çıkma eğiliminde olmuştur^(2,6).

Pandemik H1N1 influenza virusu (H1N1pdm09) 2009 yılında ortaya çıkmış ve Meksika'da domuzlardan insanlara yayılmıştır. "Yeni influenza A (H1N1)" veya "pandemik 2009 H1N1 gribi" olarak isimlendirilen 2009 "domuz gribi" 18.500 laboratuvarında tanısı doğrulanmış vaka ile sonuçlanmış ve bir model çalışmasında, 2009 H1N1 virusunun toplamda 200.000'den fazla influenza ilişkili solunum yetmezliğine bağlı ölüme ve kardiyovasküler yetmezlikten dolayı 80.000 ölüme sebep olduğu değerlendirilmesinde bulunulmuştur. Önemli olarak bu ölümcül vakaların %80'den

fazlası genç nüfusu etkilemiştir (<65 yaş). Pandemik 1918 virusunun aksine 2009 suşu, yüksek bulaşma oranı ve patojeniteye katkıda bulunan, erken doğal (innate) konak immun cevabı baskılayabilir gibi görünmektedir.

Salgın sırasında öğrenilenler, influenzanın öngörülemezliği ve ciddiyeti açısından devam eden zorluklarla başetme konusunda değerli bilgiler sağlamıştır. H1N1 İspanyol pandemisinin soyları hala mevsimsel influenzaya sebep olurken, H1N1'in pandemik potansiyel ile ortaya çıkışı daha önce görülmemiş bir olaydır. Bu, insanlarda H1, H2 ve H3 alt tiplerinin geri dönüşümünü ve H2N2 influenza viruslarının devam eden risk değerlendirmesi ihtiyacını yeniden vurgulamaya olanak vermiştir.

Enfeksiyonların şiddeti 2009 H1N1 pandemisinin öngörülemez bir diğer yanı olmuştur. İspanyol influenza H1N1 virusunun (1918) HA'sına antijenik ve yapısal benzerlik üzerine ilk raporlar ve hastaneye yatan gençlerin yüzdesi (%6.5) ciddi pandemi olasılığını yükseltmiştir. Genç ve immünolojik olarak naif kişilerde, gebe kadınlarda ve obez insanlarda şiddetli olmakla birlikte, küresel popülasyonda düşünüldüğünde 2009 H1N1 pandemisi dünya genelinde yaklaşık 100.000 ölümle nispeten hafif sonuçlanmıştır ⁽¹⁰⁾.

2.3.1. H2N2 influenza virus

H2N2 influenza virusu, 1957 yılında yaklaşık 1.5 milyon tahmini küresel mortaliteye sahip Asya pandemisine sebep olmuştur. Virus, on yıl boyunca dolaşımda kalmış ve sonra 1968'de insanlarda görülmemiştir. Bununla birlikte, influenza virusunun H2N2 alt tipi dünyada akuatik kuşlarda dolaşımını sürdürmekte ve potansiyel pandemi tehdidi oluşturmaktadır, çünkü H1, H2 ve H3 alt tiplerinin geri kazanımı için öncelik vardır ve dünya nüfusunun çoğunluğu H2N2 alt tipine karşı immünolojik olarak naiftir ⁽¹⁵⁾.

Amerika ve Avrupa'daki akuatik kuşların sürveyansı, H2N2 influenza viruslarının nispeten seyrek olarak görüldüğünü ortaya koymuştur. Son on yılda Kanada'da Alberta'daki göç eden ördeklerden veya Delaware Körfezi'ndeki sahil kuşlarından ve martılardan gelen 1011 influenza izolatında H2N2 influenza virus tespit edilmemiştir. Bununla birlikte evcil kümes hayvanlarında sürveyans, 2004 yılında Pensilvanya'da canlı kümes hayvanı pazarlarındaki tavuklardan ve 1994-1997 yılları arasında New York ve New Jersey'de canlı kümes hayvanı pazarında Afrika tavuğunda

ve tavuklarda düşük patojen H2N2 influenza sirkülasyonunun devam ettiğini tespit etmiştir. Avrupa ve Asya'da yabancı akuatik kuşlarda sürveyans, GenBank'da rapor edilen 10 influenza H2N2 virus ile geçtiğimiz on yılda H2N2 sporadik izolasyonları bildirmiştir.

H2N2 influenza virusları ile insan enfeksiyonları riskini belirlemek için, son 60 yıldaki 22 avian H2N2 influenza virusu, fare ve dağ gelinciklerinde ve insan ve domuz doku kültüründe replike olma potansiyeli açısından analiz edilmiştir. Avian H2N2 viruslar, düşük genetik ve antijenik evrim oranına sahiptir ve 1957 pandemisi zamanında dolaşan izolatlarla benzer kalmıştır. Birçok izolat farelerde replike olmuş ve insan bronşiyal epitel hücrelerini değişime uğratmıştır, ancak replikasyon domuz trakea eksplantlarında düşük bulunmuş veya saptanamamıştır. Birçok izolat dağ gelinciklerinde replike olmuş ve doğrudan temas halindeki kafes arkadaşlarına üç virus bulaşmıştır. HA ve PB2 proteinlerinde memeli adaptasyon markerları tüm izolatlarda görülmemiş ve viruslar, avian benzeri α 2,3 bağlantılı sialik asit reseptörleri için tercih göstermiştir. Çoğu izolat, prototip A/Singapur/1/1957 (H2N2) virusuna antijenik olarak benzer kalmış ve 1957 pandemik aşı adayı tarafından kontrol edilebilecekleri düşünülmüştür. Test edilen H2N2 viruslarının hepsi anti-influenza ilaçlarına (NA inhibitörleri ve adamantanlar) duyarlı olmuştur. Pandemik 1957 H2N2 virus gibi en yüksek riskli H2N2 influenza virusu (mesela A/duck/Hong Kong/319/1979 (H2N2)), Avrasya kuşlarının soyundan gelmiştir. Akuatik kuşlarda seyrek olarak izole edilmesine rağmen mevcut durumda izole edilmiş avian H2N2 virusları, özellikle Avrasya virusları olmak üzere küresel sürveyans ve risk değerlendirmesinin devamını gerektirmektedir ^(10,11).

2.3.2. H2N3 influenza virus

Son on yılda H2N3, Amerika ve Avrupa'daki göç eden akuatik kuşlardaki en yaygın H2 influenza alt tipi olmuştur. Amerika Birleşik Devletleri'nde 2006 yılında H2N3, kuş türlerinden domuzlara yayılmış ve solunum yolu hastalığının ortaya çıkmasına sebep olmuştur. H2 glikoproteininin L226 kalıntısına sahip olan virus, reseptör bağlanmasında memeli benzeri özelliklere ve fareler ve dağ gelinciklerinde adaptasyon olmadan replikasyon kabiliyetine sahiptir. Şaşırtıcı bir şekilde H2N3 virus, domuzda replike olmamış ve o zamandan beri bu türlerden kaybolmuştur ⁽¹⁰⁾.

2.3.3. H3N9 virus

Yaklaşık olarak %40 mortalite oranlarına sahip ve çoklu organ yetmezliği ile ciddi pnömoniye sebep olan, kanatlılardan insana bulaşan H3N9, 2013 yılından bu yana 560'dan fazla vakada tespit edilmiştir ⁽⁶⁾.

2.3.4. H7N7 ve H7N3 virusları

Yüksek patojeniteli avian influenza (Highly pathogenic avian influenza; HPAI) H7N7 virus, Hollanda'da 2003 yılında kümes hayvanlarında salgına sebep olmuş ve bölgesel olarak yayılmıştır. Salgın sınırlanmadan önce kümes hayvanları ile çalışan en az 86 kişi ve kontakt kuran üç kişi enfekte olmuş ve influenza benzeri hastalığın (influenza like illness; ILI) eşlik ettiği veya etmediği konjonktivit görülmüştür. Kümes hayvanlarıyla doğrudan temas edenlerin arasında bir ölüm tespit edilmiştir. Benzer şekilde, iki kişide 2004 yılında Kanada'da H7N3 HPAI salgını sırasında influenza konjonktiviti gelişmiştir ^(2,16).

2.3.5. H5N1, H7N9 ve H9N2 influenza virusları

Avian influenza açısından insanlarda ciddi hastalığa sebep olduğu tespit edilmiş ve insan sağlığına yönelik en büyük tehdit, yerli çiftliklerde yaygın olarak bulunan influenza A H5N1 ve H7N9'dur. H5N1 virus 1997'de, H7N9 virus 2013'de olmak üzere H5N1 ve H7N9 virusları 1990'lı yılların sonundan beri evcil kümes hayvanlarında ortaya çıkmıştır.

Çin'de ortaya çıkan ve insanlara yüksek mortalite ile sporadik olarak geçen yeni H5N1 ve H7N9 influenza virusları arasında pek çok benzerlik ve bazı farklılıklar vardır. Her iki virus, H9N2 influenza viruslarından altı gen segmenti ile üçlü reassortantlardır. H7N9 kuşlarda H5N1'den daha az patojeniktir, ancak insan adaptasyonunun işaretlerini göstermektedir, çünkü insan için avian influenza reseptörlerine kıyasla daha iyi affiniteye sahiptir. H5N1 kümes hayvanları (tavuk ve bıldırcın) arasında oldukça patojen olmasına karşın, H7N9 tavuklarda inaparan (belirtisiz) enfeksiyonlara sebep olmaktadır. H7N9, H5N1'e kıyasla insanlarda daha fazla bulaşıcıdır, ancak ikincisi (>60%), ilkinden (~30%) daha yüksek mortaliteye sahiptir. Her ikisi de, özellikle akut respiratuvar distres sendromu (ARDS) ve çoklu organ yetmezliği olmak üzere benzer belirtilere sebep olmaktadır ^(11,15).

Her iki virusun sporadik olarak insanlara bulaşma ve yüksek mortaliteye sebep olma özelliği vardır. H5N1, 386 ölümle 650 vakada ve H7N9, 71 ölümle 259 vakada 2014 yılının başında görülmüştür. Tayland'da 2003 yılı sonunda gerçekleşen ilk kanatlı hayvan salgınına takiben, bugüne kadar çocuklarda (<15 yaş) genel olarak artmış morbidite ve %50'den fazla ölüm oranları ile 15'den fazla ülkede 850'den fazla H5N1 ile enfekte insan vakası bildirilmiştir. Yeniden ortaya 2003 yılında çıktıktan sonra devam etmekte olan HPAI H5N1 salgını insanlarda yayılım gösteren enfeksiyonlar oluşturmaya devam etmiş ve bu virusun insanlara adaptasyonunun bir pandemi ile sonuçlanabileceğine dair endişelere sebep olmuştur. Nisan 2007'den itibaren, insan H5N1 enfeksiyonunun 291 doğrulanmış vakası belgelenmiştir ve bunların 172'si ölümcül olup (64) %59'luk bir ölüm oranına sahiptir.

Birçok insanın canlı kümes hayvanı pazarında bu virüslara maruz kalmasına rağmen, H5N1 virüsleri ile ilgili serolojik araştırmalara göre kanıtlandığı gibi nispeten az sayıda kişi virus ile enfekte olmuştur. Yüksek mortalite, interferon-induced transmembrane protein 3'te bozukluk bulunan kişilerde sitokin fırtınasıyla ilişkilendirilmiştir. Yüksek patojen H5N1 influenza virüsü 17 yıldan fazla bir süredir dolaşımdadır ve Çin, Vietnam, Endonezya ve Mısır da dahil olmak üzere birden fazla ülkede endemik hale gelmiştir. Bugüne kadar insanlar arasında yayılımı nadir olan H7N9 veya H5N1 "kuş gribi" virüsleri insanlarda yalnızca düşük replikatif potansiyele sahiptir, ancak insandan insana geçişte oldukça etkili olma adaptasyonları durumuna karşı endişe duyulmakta ve buna bağlı olarak yakından izlenmektedirler. İnfluenza enfeksiyonunun dağ gelinciği modeli kullanılarak, üç ayrı laboratuvarında yapılan işlev kazanma çalışmaları, HA'da üç kadar az aminoasitin mutasyonunun indirekt aerosol damlaları ile memelilere bulaşabilen virüsler üretebildiğini göstermiştir. Bu virüslerin hata sonucu ortama salınması veya bioterörizm için bu bilgilerin kötü niyetli kullanımı ile ilgili tartışmalara rağmen bu çalışmalar, memelilere bulaşan H5N1 virüsünün doğada ortaya çıkabileceğini ortaya koymuştur. Epidemiyolojik bilgi kısıtlı olmasına rağmen H5N1'in insandan insana bulaşması genellikle aile üyelerini içeren bazı durumlarda öne sürülmüştür. Bunun, özellikle yakın veya uzun temas ile enfeksiyon riskini veya virus aktarılabilirliğini etkileyen ortak, fakat tanımlanamayan konak faktörleri ile ilişkili enfeksiyonu temsil edip etmediği bilinmemektedir.

H5N1 ve H7N9 influenza viruslarının oluşumundaki ortak payda öncü bir virus, H5N1 veya H7N9 ile H9N2 influenza virus arasındaki reassortment'tır. Son virus, H5N1 veya H7N9 influenza viruslarının yüzey glikoproteinlerine ve H9N2 viruslarının altı internal genine sahiptir. İnsanlarda düşük veya yüksek patojen H5 influenza virusu 1997 yılından önce tespit edilmemiş, ancak H7 influenza virusları Hollanda'da 89 kişide enfeksiyona ve bir ölüm dahil insanlarda az sayıda konjonktivit vakasına ve nadiren solunum yolu enfeksiyonlarına sebep olmuştur. H9N2 ile reassortment, hem H5N1 hem de H7N9 viuslarıyla insan enfeksiyonlarında belirgin bir artışa yol açmıştır bu sebeple H9N2, enfeksiyonun "etkinleştiricisi" olarak düşünölebilir. İnternal gen segmentlerini H5N1 ve H7N9'a veren H9N2 influenza viruslarının soyları ilk olarak 1997'de Asya'daki tavuklarda tespit edilmiştir. H9N2 viruslar, çoklu soylara ve alt soylara dönuşmuştür ve Avrasya'daki çoğu ölkede tavuk ve bıldırcınlarda endemiktir. Evcil kümes hayvanlarında, H9N2 viruslar öncelikli olarak üst solunum yollarında çoğalır ve kuşlar bakteriyel, paraziter veya diğer viral ajanlarla birlikte koenfekte olmadıkça inaparan (belirtisiz) enfeksiyonlara sebep olur. Koenfeksiyon, yumurta üretiminde azalma ve solunum yolu hastalığı ile sonuçlanabilmektedir. H9N2 viruslar, insan-benzeri reseptörlere (α 2,6 sialik asit) bağlanır ve sporadik olarak insanlarda ve domuzlarda hafif enfeksiyonlarda etken olur^(11,15,16).

H5N1 viruslarının ortaya çıkmasından bu yana, köken olarak H9N2 tarafından sağlanan internal gen segmentlerinin yer değiştirmesi ile birçok genotip gelişmiştir. Bu sebeple, H9N2'nin ilk etkinleştirici olarak varsayılmasına rağmen daha fazla reassortment meydana gelebilmektedir. H7N9 influenza virusunun şubat 2013'te ortaya çıkışı, H9N2'den altı internal gen segmentine sahip üçlü reassortant olarak görölmüştür. Çin'de 2013 sonlarında H9N2'den gelen internal gen segmentlerine sahip H10N8 influenza virusu ile ölümcöl insan enfeksiyonu raporu H9N2'nin etkinleştirici bir virus olduğu fikrini desteklemiştir. H9N2'nin bu etkinleştirme yeteneği için moleküler temelin belirlenmesi ve H9N2 influenza viruslarının risk değerlendirmesi ve süurveyans çalışmalarının yapılması gerekir.

Yeni H5N1 ve H7N9 influenza virusları ile ilgili zorluklar tarımsal veya toplum sağlığı perspektifine bağlı olarak farklılık göstermektedir. Yeni H7N9 reassortant virus, kümes hayvanları veya domuz endüstrisi için sınırlı tehdit oluşturur veya hiç oluşurmaz ve belirgin hastalık belirtilerinin bulunmaması insanlara bulaş konusunda uyarı vermez,

bu sebeple H7N9 H5N1'e göre daha sinsidir. H5N1 virusları aşılammamış kümes hayvanlarında oldukça patojeniktir ve %100'e kadar mortaliteye sebep olabilmektedir, dolayısıyla bu yüksek mortalite potansiyel insan enfeksiyonu için bir uyarı sistemi oluşturduğundan hem veteriner hem de halk sağlığı çalışanları için büyük bir endişe kaynağıdır. Aşılammamış kümes hayvanlarında H5N1 virus, hastalık belirtileri olmadan atılabilmekte ve bu da kontrol stratejileri konusunda bir çıkmaz oluşturmaktadır. Canlı kümes hayvanı pazarları influenza için, reassortment ve insanlara bulaşmada rol almaktadır. Hong Kong'da canlı kümes hayvanı pazarlarının 1997'de kapatılması bu tür pazarların önemini ortaya koymuştur: Hong Kong'daki ilk H5N1 salgınında altı kişinin ölümü ile sonuçlanan 18 insan vakası görülmüş ve epidemiyolojik eğri keskin bir şekilde artmıştır. Canlı kümes hayvanı pazarlarının kapanmasından sonra, insan vaka sayısı sıfıra düşmüş ve ilk H5N1 reassortant'ı eradike edilmiştir. Kuzeydoğu Çin'deki canlı kümes hayvanı pazarlarının 2013'te kapatılması yaz aylarında insan vakalarının durmasına katkıda bulunmuştur. Kümes hayvanı pazarlarının yeniden açılması ve daha serin hava, Çin'in güney eyaletlerine yayılma ile insan H7N9 vakalarının giderek artmasına sebep olmuştur. H7N9'un ikinci dalgası sırasında enfekte olmuş insan sayısı, 2014 yılının başından itibaren ilk dalgadaki sayıyı aşmıştır ⁽¹⁰⁾.

2.4. Klinik özellikler

İnfluenza, üst solunum yolu ağacı ve trakeanın inflamasyonu, halsizlik, yorgunluk, baş ağrısı, öksürük, burun akıntısı ve ani, yüksek ateş başlangıcı ile kendini gösteren akut solunum yolu hastalığıdır. Çoğu durumda pnömonik tutulum klinik olarak belirgin değildir. Klinik olarak, viral replikasyonun artışı ile korelasyon gösteren, 24 ila 48 saat inkübasyon süresinden sonra semptomların akut başlangıcı ortaya çıkabilir. Akut semptomlar ve ateş sıklıkla 7-10 gün devam etmektedir. Halsizlik ve yorgunluk haftalarca sürebilmektedir.

İnfluenza A replikasyonu, nazofarenkse inokülasyondan yaklaşık 48 saat sonra pik yapmakta ve yaklaşık olarak altı gün sonra dökülen virus ile yavaşça azalmaktadır. Virus, hem üst hem de alt solunum yollarında çoğalmaktadır. Viral antijen, enfekte kişilerin hücrelerinde ve sekresyonlarında birkaç gün boyunca görülebilmektedir. Kanserli çocuklar için influenza enfeksiyonu sağlıklı çocuklarda olan sürece göre iki kat daha uzun sürebilmektedir. Buna ek olarak viral atılım 6 haftaya kadar

görülebilmektedir. Virus atılımı, 2009 pandemik influenza virus ile enfekte olmuş Kanada'lı çocuklarda medyan 46 gün boyunca devam etmiştir ^(2,5).

İnfluenza A ve B viruslar ILI'nın en yaygın etkenidir, ancak aynı zamanda influenza C viruslar, parainfluenza virus (PIV), respiratory syncytial virus (RSV) ve *Mycoplasma pneumoniae* dahil olmak üzere diğer patojenler de ILI'ya sebep olmaktadır. İnfluenza epidemisinin zirvesinde ILI'lı hastalardaki izolatların yaklaşık üçte biri influenza A için pozitif bulunmuştur.

İnfluenza virus, respiratuvar damlacıkların iletimiyle insan popülasyonuna yayılım göstermekte ve genellikle kış salgınlarında veya epidemilerde (ılıman iklimlerde) enfeksiyon oluşturmaktadır. İnfluenza ile her yaştan insanlar etkilenmekte, ancak prevalans okul çağındaki çocuklarda en yüksek olup hastalık şiddeti bebekler, yaşlılar ve altta yatan hastalığı olanlarda en fazladır. Mevsimsel influenza A virus özellikle akciğer veya kalp rahatsızlığı gibi altta yatan kronik hastalıklara sahip veya immun yetmezliği olan popülasyonları hedef almaktadır. Avustralya'da 2009 influenza sezonu sırasında 14 yoğun bakım ünitesinde yapılan kohort çalışmaları, eş zamanlı hastalığı olmayan daha sağlıklı genç nüfusta enfeksiyonların baskın olduğunu göstermiştir. RSV gibi başka solunum yolu viruslarıyla birlikte koenfeksiyon, özellikle immün yetmezlikli hastalarda hastalığın ciddiyetini arttırmaktadır ⁽¹⁷⁾.

2.4.1. Hospitalizasyon

Kanser tedavisi gören çocuklarda viral solunum yolu enfeksiyonları daha sık görülmekte ve sağlıklı çocuklara göre daha ciddi olmaktadır. Rutin yıllık influenza aşılarının uygulanmasından önce yapılan çalışmalar, kanserli çocukların sağlıklı çocuklara kıyasla benzer ortamlarda influenza ile enfeksiyona daha fazla duyarlı olduklarını ortaya koymuştur.

Kanser tedavisi gören çocukların influenza ile karşılaştığında sağlıklı çocuklara oranla hospitalizasyon olasılıkları daha yüksektir. Bu çocukların üçte ikisi öncelikle ateş görülmesi ile hastaneye yatırılmaktadır. Hospitalizasyon ortalama 2 ila 7 gün sürmektedir. Çoğu hasta, hastalık süresince ateşlidir ve ateş 1-2 hafta sürebilir.

Yoğun bakıma başvuru, influenza ile enfekte kanserli çocukların %10 kadarında görülmekte ve ölüm %5'e kadar yükselmektedir ⁽⁵⁾.

2.4.2. Komplikasyonlar

Kanserli çocuklarda influenza, sık hospitalizasyonun yanı sıra önemli klinik morbiditeye sebep olmaktadır. Solunum yetmezliği, pnömoni ve solunum desteği ihtiyacı da dahil olmak üzere ciddi solunum yolu komplikasyonları hastaneye yatırılan bu çocukların %10-20'sinde görülmektedir. Hipoksi ve bronkodilatör ihtiyacı gibi daha az şiddetli solunum yolu komplikasyonları da yaygındır. Akut hastalık hafifledikten sonra az sayıda çocukta uzun oksijen tedavisi uygulaması gerekmektedir⁽¹⁶⁾.

Sıklıkla kolonize bakterilerle birlikte koenfeksiyon, hastalığın gidişatını daha da ağırlaştırmaktadır. İnfluenza enfeksiyonunun komplikasyonu olarak bakteriyemi bu çocukların yaklaşık altıda birinde görülmektedir. Sekonder bakteriyel enfeksiyonlar, pnömoni veya otitis media gibi klinik enfeksiyonlar şeklinde de ortaya çıkabilmektedir. *Pseudomonas spp.*, *Enterobacter spp.*, *Streptococcus spp* ve koagülaz-negatif stafilokoklar gibi patojenler tanımlanmıştır. *Streptococcus pneumoniae* ve *Staphylococcus aureus*'lu koenfeksiyonlar en yaygın olanıdır ve pandemi sırasında yüksek oranda görülerek pnömoni ile ilişkili ölümlerde artışa sebep olmuştur. İspanyol grip dalgası sırasında hayatını kaybeden 68 askerin otopsisinde çoğu vakada akciğerde bakteriyel pnömoni bulguları gözlenmiştir. İnfluenza ile 2009 pandemisinde enfekte olmuş çocukların nötroopenik oldukları zaman pnömoni gelişme olasılığının daha yüksek olduğu raporlanmıştır. İnfluenza enfeksiyonunun az görülen komplikasyonları arasında mantar pnömonileri (örn., *Aspergillus* pnömonisi), diğer invaziv fungal enfeksiyonlar ve hemofagositik lenfositik lenfositosis bulunmektedir⁽¹⁸⁾.

Krup (laringotrakeit) küçük çocuklarda ciddi bir komplikasyon olabilmektedir. Kronik pulmoner veya kardiyak hastalığı veya diabetes mellitus olan insanlarda influenza A viruslarından kaynaklı hemorajik bronşit, pnömoni (primer viral veya sekonder bakteriyel) ve ölüm dahil ciddi komplikasyonlar gelişme riski yüksektir. Hemorajik bronşit ve pnömoni saatler içinde gelişebilmektedir. Fulminan ölümcül influenza pnömonisi zaman zaman oluşmakta ve dispne, siyanoz, hemoptizi, pulmoner ödem ve ölüm semptomların başlangıcından 48 saat sonra gibi kısa sürede ortaya çıkabilmektedir⁽²⁾.

Pandemik ve daha az oranda mevsimsel influenza A virusun özellikle çocuklarda kusma veya ishal ile gastrointestinal hastalığa sebep olduğu açıklanmıştır. İnfluenza enfeksiyonunun ciddi vakaları virusun hem $\alpha 2,6$ - hem de $\alpha 2,3$ -sialik asidin

bulunduğu alveollere yayılmasını içermektedir. Alveolar enfeksiyon, hiyalin membranlar oluşumu, yaygın bronşiyal ve alveolar epitel hücre apoptozisi, lökositlerin kitlesel infiltrasyonu, fibrin birikimi, intra-alveolar hemorajik ödem birikimi ile histolojik olarak diğeri ARDS formlarına benzerlik gösteren yaygın diffüz alveolar hasara sebep olur. Bu hastalar, dispne, takipne, hipoksi ve diffüz bilateral pnömoninin radyolojik bulguları ve ileride olası ölümcül sonuçları olan ARDS gibi progresif solunum yetmezliği ile kendini göstermektedir ⁽⁶⁾.

2.4.3. Kemoterapi üzerindeki etkiler

Kanserli çocuklarda influenzaya bağı hastalık, kemoterapi veya diğeri kansere spesifik tedavide hastaların %20-80'inde önemli gecikmelere sebep olmuştur. En uzun tedavi gecikmesinin 43 gün olduğu 2009 pandemik influenza enfeksiyonu olan çocuk popülasyonunda, çocukların %55'inde ortalama 3 haftalık gecikmeler yaşanmıştır. Diğeri ortalama 3 hafta veya daha fazla süre ile tedavi kesintileri bildirmişlerdir. İnfluenza sebebiyle meydana gelen tedavi kesilmelerinin etkisi spesifik olarak bilinmemekte bununla birlikte ortaya çıkan kanıtlar, tam bakım kemoterapisi almayan akut lenfoblastik lösemili (ALL) çocuklarda relaps oranlarının daha yüksek olduğunu düşündürmektedir. Başta yetişkinlerde olmak üzere diğeri maligniteler üzerine yapılan çalışmalar kesilmelerin zararlı olduğunu, ancak tedavi gecikmeleriyle ilgili spesifik sonuçların çoğu malignite türleri için tanımlanmadığını belirtmektedir ⁽⁵⁾.

2.5. Risk altındaki popülasyonlar

İnfluenza, özellikle immun yanıtları değımiş insanları hedef almakta ve genellikle W biçimi eğrileri gösteren hem 1918 hem de 2009 pandemileri haricinde, U-şekilli mortalite eğrisiyle ilişkilendirilmektedir. Mevsimsel influenza enfeksiyonlarında 2 yaşından küçük çocuklarda ve 65 yaşından büyük yaşlılarda yüksek ölüm oranları bulunurken genç yetişkinlerin pandemiler sırasında yüksek mortalite oranlarına sahip oldukları görülmüştür ve bu durum yaşlıların önceden var olan bağıışıklık sebebiyle bir dereceye kadar korunabileceğı anlamına gelmektedir. Ciddi influenzaya bağı komplikasyonların gelişmesi olasılığını arttıran ek risk faktörleri veya hastalıkların, yaş, kronik solunum, böbrek hastalığı, hematolojik, nörolojik veya kardiyovasküler hastalık, diyabet, obezite, immünsupresyon/eksiklik ve gebelik/doğum sonrası dönemi

kapsadığını hospitalize 2009 influenza hastası üzerine yapılan birçok klinik çalışma göstermiştir. Hastaneye yatırılan 70.000 2009 influenza hastası üzerinde yapılan global analiz, çocukların (<15 yaş) hastaneye kabul edilme riskinin daha yüksek olduğunu, buna karşılık yaşlı erişkinlerin (>50 yaş) daha yüksek mortalite oranlarına sahip olduğunu göstermektedir. Buna ek olarak, morbid obezite, yoğun bakım ünitesinde yatış ve ölümcül sonuç riski ile ilişkili görünmektedir. İmmüsupresif kişiler daha ciddi hastalığa yakalanır ve bu kişilerde ilaç direnci mutasyonları gelişmesi daha olasıdır. Özellikle 2009 pandemi vakaları üzerine çeşitli klinik çalışmalar ve WHO veya CDC önerileri gebeliği influenza için komorbidite faktörü olarak tanımlamakta ve bu risk popülasyonunun genel aşılmasını tavsiye etmektedir. Gebe kadınlar influenza ile enfeksiyona daha yatkındır, kötü gebelik sonuçları ile ilişkili daha ciddi bir hastalık geliştirebilirler, yoğun bakıma kabul edilme riskleri yüksektir ve artan mortalite oranına sahiptirler. Bu yatkınlık için biyolojik sebepler henüz tanımlanmamıştır, ancak gebelikle bağlantılı olarak özellikle antiviral yanıtlar olmak üzere immün cevaplarda değişiklikler söz konusudur ve fetusla ilişkili komplikasyonlar muhtemelen anneye ait ateşe bağlıdır. Maternal korumanın yanı sıra aşılama da yenidoğan ve bebekleri korumaktadır, Amerika Birleşik Devletleri'nde ve Avrupa Birliği'nde 6 aylıkken aşı yapılmasının önerildiği başka bir risk popülasyonu, çoğunlukla maruz kalma riski artmış bebekler ile sınırlandırılmıştır ⁽⁶⁾.

Transplantasyon veya onkoloji hastaları hakkında spesifik bir veri bulunmamasına rağmen, immüsupresif hastalar ağır hastalık riski altındadır. Bununla birlikte, daha fazla bilgi elde edildiğinde, ciddi hastalık veya ölüm riski faktörleri daha net tanımlanacaktır. Transplantasyon programlarındaki etki, kısmen virusun virülansına ve kritik hastaları yönetmek için gerekli olan kaynak miktarına bağlıdır ⁽⁴⁾.

Kişiselleştirilmiş tedavilerin geliştirilmesine ilişkin olarak, son çalışmalar, konağın genetik yatkınlığını ve influenza viruslarına duyarlılık arasındaki bağlantıyı vurgulamıştır. Albright ve ark.⁽¹⁹⁾ Utah'daki ölümcül influenza vakalarında kalıtsal bir pay gözlemlemişlerdir. İnterferon (IFN) bağlı proteinler ve sitokinlerin, viruslara karşı konak savunması için önem taşıdığı bilinmesinden dolayı, genom düzeyinde ilişkilendirme çalışmaları (GWAS, genome-wide association studies) spesifik polimorfizmler ile influenza yatkınlığı arasındaki ilişkiye odaklanmıştır. IFN-induced transmembran protein 3, H1N1 ve H7N9'a karşı konağın savunmasında açıkça önemli

rol oynamaktadır, ancak tek nükleotid polimorfizmi rs12252 ile influenza duyarlılığı arasındaki ilişki tartışmalara konu olmaya devam etmektedir. Son zamanlarda, interferon regülatör faktör 7 (IRF7) eksikliği ciddi bir influenza enfeksiyon vakasıyla ilişkilendirilmiştir. IL1A ve IL1B genlerinde (interlökin 1- α ve - β için kodlama), TMPRSS2 proteazını kodlayan genlerde (transmembran proteaz, serin 2, enfeksiyon sırasında viral HA ayrışmasına aracılık eden) veya galektin-1'deki mutasyonlar ayrıca konak H1N1 veya H7N9 yatkınlığına etki edebilmektedir.

2.6. Onkoloji hastalarında influenza epidemiyolojisi

2.6.1. Bulaşma

Korunma, influenza kontrolü için yapılan tüm çabaların temel taşıdır ve enfeksiyon kaynağının anlaşılmasında kritik önem taşımaktadır. İnfluenza, sağlık kurumlarında kolaylıkla bulaşabilmektedir. Pediatrik onkoloji birimlerinde meydana gelen salgınlara araştırılmasında, enfekte ziyaretçiler ve sağlık çalışanları ortak enfeksiyon kaynağı olarak tespit edilmiştir. Bu gözlemler, sağlık görevlilerinin evrensel influenza aşılmasının ve hastalık izninin uygun kullanımının önemini vurgulamaktadır. Birçok rapor, aynı zamanda pediatrik onkoloji birimlerinde influenza salgınlara yayılımında çocukların yaptığı grup etkinliklerinin oynadığı rolü de açıklamıştır. Hastalar için koruma sağlanması karmaşıktır, çünkü enfekte olmuş bireylerin tanımlanması güç olabilmekte ve asemptomatik kişilerden bulaşma meydana gelebilmektedir. İnfluenzaya ait olağan inkübasyon süresi 1 ila 4 gün arasında değişmektedir. Virus, tipik olarak semptomların başlangıcından 1 gün önce solunum sekresyonlarında atılmakta ve küçük çocuklarda 10 veya daha fazla gün boyunca atılmaya devam edebilmektedir. İmmünkompromize hastalarda viral dökülme süresi hastanelerde devamlı bulaşmaya izin verecek şekilde daha da uzun olabilmektedir ^(5,20).

2.6.2. Ciddi influenzaya yönelik risk faktörleri

Nötropeni değil, ancak lenfopeni, influenza tanısı ile hastaneye yatırılan kanserli çocuklarda yaygın olarak saptanmıştır. Laboratuvarında teyit edilmiş influenza ve malignite gösteren 27 hasta üzerinde yapılan bir analiz, kronik steroid kullanımı ve oseltamivirin gecikmeli başlatılmasının üst solunum yolu enfeksiyonu (ÜSYE) ile

karşılaştırıldığında influenza ile düşük ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Ek risk faktörleri, son dönemde uygulanan kemoterapi ve düşük mutlak lenfosit sayısıdır (genellikle <500 hücre/ μ L). Yetişkin onkoloji hastalarında yapılan çalışmalar, influenza A ve hematolojik malignitelerin, ağır enfeksiyon için bağımsız risk faktörleri olduğunu göstermiştir⁽²¹⁾.

Malignitesi olan 2009 pandemik influenza ile enfekte çocukların birkaç vaka serisi, bu suş ile enfekte olduğunda maligniteli çocukların %20'sinde ciddi hastalık geliştiğini bildirmiştir. Elbahlawan ve ark.⁽²²⁾ pandemik influenza ile hospitalize edilen 28 hastanın 5'inde akut solunum yetmezliği geliştiğini raporlamışlardır. İnfluenza suşunun eşsiz epidemiyolojisi sebebiyle bu bulguların diğer influenza suşlarının dolaştığı yıllara göre genellemesini yapmak zordur. Aşılama etkili olmakla birlikte, aşılama hastalarda ciddi hastalığın görülmesi immünolojik açıdan en savunmasız hastaların aşılarla optimal cevap vermeyebileceğini düşündürmektedir⁽⁵⁾.

2.7. Replikasyon döngüsü

İnfluenza virusun replikasyon döngüsü, virionun hedef hücrelere tutunması ve reseptöre bağlanma (virus adsorpsiyonu), klattrin aracılı endositoz, kaveola bağımlı endositoz, klattrin-kaveola-bağımsız endositoz ve makropinositoz yoluyla hücresel bölgelere internalizasyon, endozomlar/kaveozom/makropinozom/lizozomlar yoluyla perinükleer bölmeye endozomal yolculuk, viral ve endozomal/organel membranların pH'a bağlı füzyonu, kapsidin soyulması, nükleer import, transkripsiyon ve replikasyon, nükleer eksport, protein sentezi, post-translasyonel işlem ve yolculuk, yeni virusların montajı ve paketlenme, tomurcuklanma, serbest bırakılma basamaklarından oluşan karmaşık ve oldukça dinamik bir biyolojik süreçtir.

İnfluenza virus tarafından enfekte olan hücreler, alveolar ve bronşiyal epitel doku hücreleri, alveolar makrofajlar, akciğer epitelyal doku hücreleri ve özellikle tip II pnömositler, plazmositoid dendritik hücreler ve doğal öldürücü hücrelerdir.

İnfluenza virus, tutulmasını ve daha sonra elimine edilmesini önlemek için Endoplazmik retikulum stresini, kaspaz yolunu etkinleştirebilmekte veya akciğer müsinleri gibi salgılanan molekülleri çok iyi biçimde ayarlayabilmektedir. Ayrıca konak faktörleri alarak kötüye kullanılmaktadır^(1,9).

2.7.1. İnfluenza virus girişı

İnsanlarda enfeksiyon esnasında meydana gelen ilk önemli olay, influenza virionlarının apikal hücre yüzeyine tutunması olan virusun adsorpsiyonudur. Nitekim, influenza virusunun hedef hücrelere girişı viral genomların hücre dışı virionlardan hücre çekirdeğindeki transkripsiyon/replikasyon alanlarına gönderildiğı önemli bir süreçtir. Bu aşamada, yüzey glikoprotein HA sayesinde, virus (-2,3) veya (-2,6) bağı sialik asit reseptörleri ile etkileşime girmektedir. Bu reseptörlerin fizikokimyasal konformasyonu, virusun doğal rezervuarı olan insan, fok balığı, kuş, domuz, at gibi diğ er hayvan türlerinde aynı değildir. İnsan reseptörlerinin büyük çoğunluğu üst solunum yolunda bulunur, ancak çoğu, solunum yolunun derinlerinde bulunan kuşlara özgü reseptörlere de sahiptir ^(7,23).

HA, yaklaşık 13.5 nm uzunluğunda, homotrimerik integral tip 1 membran silindir benzeri glikoproteindir. HA monomerler, hidrofobik sinyal dizisi içeren öncüler (HA0) olarak sentezlenmektedir. Sentezlendikten sonra glikozile edilir ve disülfid köprüsü ile bağlanan 50 kDa HA1 ve 27 kDa HA2 olmak üzere iki küçük alt birime bölünmektedir. Her bir altbirim sialik aside bağlama bölgelerini içeren küresel baş olan HA1 (reseptör bağlanma cebi olarak da bilinen reseptör bağlanma alanları) ile örtülü ve HA2 tarafından membranın bağı olduğu uzun, merkezi bir α -heliks ile karakterize edilmektedir. Ayrışma yerine yakın HA2'nin apolar alanı, "füzyon peptidi" veya HAfp23 olarak bilinir, çünkü oldukça korunmuş N-terminal 23 rezidülerinin alanı olarak nitelendirilmektedir. HAfp23, negatif eğriliğı başlatmak için temel olan, sıkıca paketlenmiş iki helezondan oluşan helikal saç tokası yapısına sahiptir (HA'nın "füzogenik konformasyonu").

En az on sekiz HA alt tipi vardır. Bu tipler ayrıca iki gruba ayrılmıştır: grup 1 H1, H2, H5, H6, H8, H9, H11, H12, H13, H16, H17 ve H18'i (su kuşlarından, son iki tanesi son zamanlarda Guatemala ve Peru'da yarasalardan izole edilmiştir), grup 2 ise H3, H4, H7, H10, H14 ve H15'i kapsamaktadır. Bununla birlikte yeni bir deney, virusun yüzeyinde sialik asit içeren glikoproteinlerin ve glikolipidlerin tamamen tükendiğı hücrelere girebileceğini kanıtlamıştır. Bu durum alternatif giriş yolları olduğunu düşündürmektedir. Nitekim H17 ve H18 sialik aside bağlanmaz ve reseptörleri halen bilinmemektedir.

Giriş esasen reseptör aracılı endositozdur ancak makropinositoz olarak isimlendirilen alternatif yol yakın zamanda keşfedilmiştir.

Klatrin aracılı endositoz, virionun benimsediği en yaygın yoldur. Klatrin üçlü iskelet yapısı, çok yüzlü yapının omurgasını teşkil eden üç ağır zincirden ve üçlü iskelet yapının montajını/demontajını çok iyi bir biçimde ayarlayan üç hafif zincirden oluşmaktadır. AP-2, epsin-1, epsin-15 gibi adaptör proteinler kargo reseptörlerinde bulunan özel internalizasyon sinyallerini tanır ve klatrin kaplı çukurların oluşumunda yer almaktadır ⁽²⁴⁾.

Kaveole, integral membran iskelesi yapısı olarak kaveolin ve yüksek düzeyde kolesterol ve glikosfingolipidden oluşan membranın küçük şişe benzeri görünümünde içeri doğru katlanması ile meydana gelir. Geriye kalan giriş yollarının araştırılması daha az yapılmıştır. Klatrin kaveole bağımsız endositozda Ras-fosfoinositid 3-kinaz (PI3K) sinyal yolu önemli rol oynayabilmektedir.

İnaktif PI3K kompleksi (PI3K p110-p85 heterodimer), kompleksin moleküler olarak yeniden düzenlenmesine sebep olan, p85'in SH2 (Src Homoloji 2) bölgelerinin reseptör ile ilişkili proteinlerde bulunan fosfotirozin kalıntılarıyla bağlandığı yer olan plazma membranına hareket eder. Böylece p110 enzimatik olarak aktif olur ve PtdIns(4,5)P₂'den (fosfatidilinositol-(4,5)-bisfosfat) PtdIns(3,4,5)P₃ (fosfatidilinositol-(3,4,5)-trisfosfat) gibi intraselüler ikinci haberciyi çağırabilir/üretebilir. Daha sonra, pleckstrin homolojisi alanlarına sahip çeşitli efektör proteinleri Akt, mTOR (Rapamisin Memeli Hedefi), Protein Kinaz C, Fosfataz ve tensin homoloğu yollarının aktive edilmesi gibi farklı sinyal basamakları dizisine aracılık eder ⁽¹⁾.

Makropinositoz, Epidermal Büyüme Faktörü veya Sinir Büyüme Faktörü gibi hücre büyüme faktörleri tarafından aktive edilebilir veya forbol esterlerle indüklenebilmektedir. Makropinositoz, plazma membranını kapsamlı şekilde yeniden düzenlediği ve Na⁺/H⁺ değiştirici aktivitesi gibi enerji mekanizmalarını belirttiği için Rac1-, PAK1- (p21-aktive kinaz tip 1), kolesterol ve aktine bağlıdır. Ayrıca ebolavirus, arenavirus, adenovirus, human papillomavirus, Human Immunodeficiency Virus (HIV), *Escherichia coli*, *Trypanosoma cruzi*, vaccinia virus, African Swine Fever virus, RSV ve Hepatit C virus gibi patojenler, diğerleri arasında ek giriş yolları olarak makropinositozu kullanır.

Bu farklı yollar (klatrin aracılı endositoz, kaveola bağımlı endositoz, non-klatrin nonkaveole endositoz ve makropinositoz) farklı internalizasyon verimleri ile sonuçlanmakta ve influenza suşlarının farklı virülans ve patojenite dereceleri ile ilişkili olabilmektedir ^(7,9,23).

2.7.2. Endozomal yolculuk

İnfluenza virus solunum yolu hücresi yüzeyine bağlandıktan sonra birden fazla mekanizma yoluyla hücrenin içine penetre olabilmektedir ve sonuç virionların endozomal bölme içinde internalize olmasıdır. Önceki rotalara göre virionlar, klatrin kaplı çukurlar ve klatrin kaplı veziküller içine veya kaveozomlar/makropinozomlara paketlenir. Daha sonra bunlar erken endozomlara ve geç endozomlara yönlendirilir.

Endozomal yolculuk genellikle influenza virus alımını izlemektedir. Virionlar, Rab-5/Vps4 ve Rab-7/LAMP (lizozomal ilişkili membran proteini) pozitif endozomlara alınmaktadır. Rab-5/Vps4 ve Rab-7, sırasıyla erken endozomlar ve geç endozomlar için yolculuk ve füzyon işlemlerinden sorumlu olan Rab guanozin trifosfatazlardır ⁽²³⁾.

LAMP1 (CD107a olarak da bilinir), LAMP2 ve LAMP3 (DC-LAMP, TSC403 veya CD208) olmak üzere LAMP'ler, şu anda bilinen 3 izoform ile endozomal olgunlaşmayla ilgili bir dizi proteindir. Diğer taraftan, LAMP3 ekspresyonunun konağın influenzaya verdiği yanıtı öngördüğü bulunmuştur.

Cullin-3 (Cul3), Cullin-RING-ligaz ailesine aittir. Bric-a-brac, Tramtrack, Broad-complex-Cul3-Rbx1 ubiquitin E3 ligaz kompleksinde bir iskele (scaffolding) proteini olarak işlev görür ve geç endozom olgunlaşmasında ve endositik kargo trafiğinin düzenlenmesinde rol alır.

Endozomal yolculuk, aktine bağımlı olan evre I, dinein ve mikrotübüle bağımlı olan evre II ve mikrotübüle bağımlı olan evre III olmak üzere üç aşamalı çok yönlü, karmaşık bir süreçtir ⁽¹⁾.

2.7.3. İnfluenza zarf füzyonu

Virusun endozomdan çıkması ve ribonükleoprotein (RNP) sitoplazmaya bırakılması için zarf, endozom zarfıyla kaynaşmalıdır. Virusun yaşam döngüsünün bu kısmı endozomun lümeninin asitlik derecesinin yaklaşık pH 5 değerine düşmesini gerektirir. Bu süreçte, sadece iyon kanallarına etki etmeyen dolayısıyla virusun iç

kısının asitleştirilmesine izin veren aynı zamanda viral zarfın eğilmesinde değişikliğe sebep olan konformasyonunu değiştiren M2, önemli rol oynamaktadır. Bu durum, M1 proteininin RNP'den ayrılması ve onun füzyon peptidini ortaya çıkarabilecek HA'nın konformasyonunda dramatik bir değişim olmak üzere iki önemli olaya yol açmaktadır. Bu peptid, viral zarf ve endozom membranının füzyonuna ve RNP'nin sitoplazmaya bırakılmasına izin verebilmektedir. HA'nın ayrışması, bir proteazik enzimatik eylem yoluyla meydana gelmektedir. HA'nın bölünmesine sebep olabilen proteazlar, insan vücudunda yaygın olarak bulunur ve HA'nın kesilmesinde her birinin oynadığı rol tam olarak bilinmemektedir. Bununla birlikte proteazların, tripsin benzeri enzimler veya furin benzeri serin enzimler olmak üzere iki ana sınıfa ait olduğu bilinmektedir. Bu enzimler, inflamasyon varlığında özellikle solunum sistemindeki hücreler tarafından üretilmektedir (proinflamatuvar sitokinler/kemokinler, nötrofiller, vb.)⁽⁹⁾.

RNP'nin sitozol içine salınması aynı zamanda, konağın agrezomunda işlem mekanizmaları (dinein, dynactin ve miyozin II'den oluşur) tarafından da etkinleştirilir. Bu süreçte başka moleküller ve yollar da yer alabilmektedir.

M2 sadece basit bir iyon kanalı değildir. Aslında, proton geçirme, iletkenlik ve asitleştirme mekanizması, virusun her bir farklı basamağı ve aktivitesinde çok önemli olduğu için viral yaşam döngüsünün tamamında çok yönlü bir rol oynamaktadır. Endositozdan sonra, düşük endozomal pH (5-6 aralığında), HA aracılı füzyon öncesinde M2 kanalını harekete geçirir ve M1 proteininin viral RNP'lerden (viral ribonükleoprotein; vRNP) ayrılmasını destekler ve böylece RNP'lerin çekirdeğe girmesini kolaylaştırır. M2, genomun açılmasında ve viral soyulma sırasında viral RNA'nın bırakılmasında temel teşkil etmektedir. Ayrıca M2, viral olgunlaşma ve montaj, replikasyon ve enfeksiyon sırasında viral RNA'nın paketlenmesini ve virionun kesilmesini ve tomurcuklanmasını kolaylaştırır: trans-Golgi ağı membranında hücre yüzeyine transport sırasında M2 proton sızıntı kanalı görevi görür ve konak hücrenin Golgi aparatının pH'ını düzenleyip viral iç pH ile pH'ını dengeleyerek *de novo* (yeni) sentezlenmiş HA'nın aktivasyonunu önler. pH eğer bu şekilde yükseltilmemişse düşük pH, HA'nın konformasyonel olarak yeniden düzenlenmesine sebep olur ki bu HA'nın intraselüler ayrışması yeni yapılan influenza viruslarını inaktive eder. M2, NS1 ve HA gibi diğer proteinlerle birlikte enfekte olmuş hücrelerin apoptozunun ayarlanmasında rol oynayabilmekte ve böylece viral replikasyona katkıda bulunabilmektedir⁽¹⁾.

NS1, mRNA ekleme ve translasyonu, hücre yaşamı ve bağışıklık savunması gibi çeşitli biyolojik görevlerde bulunmaktadır. Özellikle, tip I IFN aracılı yanıt söz konusu olduğunda, viral RNA-sensör RIG-I (Retinoik asit ile indüklenebilir gen I) tarafından ortaya çıkan tip I IFN cevabı için önemli bir kofaktör olan PACT/PRKRA (interferon ile indüklenen protein kinaz protein aktivatörü/ Protein kinaz, interferon ile uyarılabilir çift sarmallı RNA'ya bağımlı aktivatör; Protein activator of the interferon-induced protein kinase / Protein kinase, interferon-inducible double stranded RNA dependent activator) ile etkileşime girer. Böylece, PACT/RIG-I aracılı tip I IFN aktivasyonunu bloke eder. Ayrıca aktifleşmesi viral proteinlerin translasyonunu ve sentezini ve ayrıca TRIM25'i (üç parçalı motif içeren protein 25; tripartite motif-containing protein 25) inhibe eden latent protein kinaz R'yi (Protein Kinaz R, aynı zamanda Protein kinaz RNA ile aktive edilmiş veya interferon ile indüklenmiş, çift sarmallı RNA ile aktifleştirilmiş protein kinaz veya ökaryotik translasyon başlatma faktörü 2-alfa kinaz 2-EIF2AK2 olarak da bilinir) bağlar. Son zamanlarda, interleukin-6 reseptörü, MHC sınıf I HLA-B, kathepsin B, ubiquitin ve RNA üzerinde etkili adenosin deaminaz gibi bir dizi konak protein ile etkileşime girdiği gösterilmiştir.

M2 iyon kanalı aktivitesi ile ilgili olarak bu mekanizmanın kalbi, iç transmembran kalıntılarının HxxxW motifidir. HxxxW motifinde, Histidin 37'nin pH sensörü gibi davrandığı varsayılmakta ve pH değeri düşük olduğunda imidazolik halkanın protonlanması elektrostatik itme sebebiyle transmembran paketlemesini dengesiz hale getirmektedir. Primer geçit görevi gören Triptofan 41, döner, Aspartik asit 44'ten ("kanal kilidi") açılır ve artık por eksenine paralel olarak proton akışı sağlar. Buna karşılık Valine 27, sekonder kapı ("Valine 27 valve" olarak adlandırılır) olarak görev yapar; Liang ve ark. ⁽²⁵⁾ tarafından gerçekleştirilen çok ölçekli simülasyon ile önemi son günlerde doğrulanmıştır. Histidin 37 tetrad'ın tam rolüne dayanarak, Histidin 37'nin iki proton yükülü formunun proton akışı sırasında değişmediği "shutter" modeli ve Histidin 37'nin proton durumunun aşırı proton transferi sırasında değişikliklere uğradığı "shuttle" modeli olmak üzere iki model önerilmiştir. Bununla birlikte, protonların oldukça seçici transportunun kesin mekanizması bilinmemektedir.

Asitleşme, PI3K kaskadının viral aktivasyonu ile arttırılmaktadır.

2.7.4. Nükleer import

Replikasyonda sonraki olay, RNP'nin çekirdeğe aktarılmasıdır. RNP'nin sitoplazmaya girişi, mikrotübüllerin, ara filamentlerin veya aktin filamentlerin müdahalesi olmadan, nükleer por kompleksinden geçerek difüzyon mekanizması vasıtasıyla son derece hızlı bir şekilde gerçekleşmektedir. Nükleer por kompleksinin bazı önemli bileşenleri, nükleoporinler Nup37, Nup43, Nup45, Nup50, Nup54, Nup58, Nup62, Nup75, Nup88, Nup93, Nup98, Nup107, Nup133, Nup153, Nup160, Nup214, NuTF2 (Nükleer Transport Faktör 2) ve Nup358/RanBP2'dir.

Nup37, Nup88, Nup96, Nup107, Nup133 ve Nup160, Nup107 alt kompleksine, NupL1 (Nup45/Nup58), Nup54 ve Nup62, Nup62 alt kompleksine aittir. Diğer bileşenler Magoh, ALADIN, Transloke promotör bölge, ekzon bağlantı kompleksi, NLP1/CG1 (Nükleoporin benzeri Protein tip 1), Seh1, Rae1/Gle2 ve POM121'dir (nükleer zarf por membran proteini tip 121).

RNP'ler nükleer membrana ulaştığında nükleer import, nükleoprotein alfa-importin daha sonra da importin- β ile bağlanması sağlanmaktadır. Aynı anda importinler, PA, PB1 ve PB2 ile etkileşim içinde olmalıdır ve bu durum RNP'nin aynı importinlerle etkileşimini etkilemektedir. Özellikle, PB1 ve PA alt birimleri Ran-BP5 veya karyofen beta3 (importin beta3 veya importin 5 olarak da bilinir) tarafından, alt birim PB2 ise importin alfa-3 veya importin alfa-7 tarafından importe olmaktadır. NP'ler importin alfa-1 ile importe olmaktadır. Nükleer importa katılan diğer moleküller Hsp70 ve Hsp90'dır. İmportinler çekirdekte RNP'den kopar. Açık olmaması veya mekanizmanın moleküler düzeyde bilinmesine rağmen RNP'nin ayrılması, importinlerden ayrıldıktan sonra gerçekleşmelidir. Böylece, RNP'nin nükleoplazmada yayılmasından sonra transkripsiyon ve replikasyon başlatılabilir ⁽¹⁾.

2.7.5. Transkripsiyon ve replikasyon

Viral nükleik asidin transkripsiyonu ve replikasyonu tam olarak anlaşılamamıştır. Bununla birlikte olaylar koordine edilmiş ve farklı RNA, NP ve RNA bağımlı RNA polimeraz aktivitelerini içermektedir. Genomik segmentlerden (sRNA), trimerik polimeraz ünitesi ve NP'den oluşan paket, influenza virusunun temel replikasyon birimidir (vRNP). Böylece nükleoplazmada, vRNP'nin replikasyon

döngüsünün ilk turunu başlatması, yani genomik bilgilerini mRNA'lara kopyalaması gerekmektedir. Ardından, sitoplazmada mRNA eksportu meydana gelmektedir.

İnfluenza polimeraz, heterotrimerik ~250 kD komplekstir. Viral yaşam döngüsünde merkezi rol oynar ve hem viral replikasyon hem de transkripsiyon için RNA sentezinden direkt olarak sorumludur. Ayrıca DnaJA1/Hsp40 gibi konak faktörleri toplamaktadır.

PA altbirimi, mini kromozom koruma kompleksi (mini-chromosome maintenance complex; MCM. Deoksiribonükleik asit (DNA) helikazı olduğu varsayılır.) ve hCLE/CGI-99 gibi konak faktörlerle etkileşime girmektedir. PB2 altbirimi konak RNA başlığını (7-metilguanosa trifosfat) bağlamak ve konak pre-mRNA'lardan keşif yakalamak (cap snatching) için PA'nın endonükleaz aktivitesini desteklemektedir. Diğer taraftan PB2, ökaryotik histon asetiltransferazlarda bulunan asetil-CoA ile etkileşime girmektedir⁽²³⁾.

Viral mRNA sentezi, vRNP yapısının bir parçası olan ve viral RNA promotöre bağlanan bir *cis*-acting viral RNA polimeraz ile başlatılır. Bununla birlikte, mRNA'lar genetik mesajı verimli bir şekilde aktaramaz; "keşif" yapısı taşımaları gerekmektedir. Spesifik olarak, virus hücrenin pre-mRNA'sını kullanmalıdır ve bu amaçla PB2, PA ve hücresel Polimeraz II aracılı koordine bir işlem gereklidir. Kısaca PB2, endonükleaz mekanizma yoluyla hücresel Pol II ve PA ile mRNA'lara bağlanır ve ribozomlarda translasyona uğrayabilen keşifli mRNA'lar üretir.

Önerilen bir modele göre, *trans*-acting polimeraz aktivitesi viral RNA replikasyonu için gereklidir⁽²⁶⁾. Viral RNA'nın negatif polaritesi sebebiyle mRNA görevi görecektir pozitif RNA sentezlenmelidir. Viral RNA replikasyonu daha sonra, RNP paketlerinde polimerazdan farklı olabilen *trans*-acting RNA polimeraz ile gerçekleştirilebilmektedir. Örneğin NP'ler gibi *trans*-acting polimerazı tetikleyen proteinler ile ilgili çeşitli hipotezler formüle edilmiştir. Bu varsayım, NP yokluğunda viral çoğalmayı gösteren diğer çalışmalarla ters düşse de yeni sentezlenen NP'lerin varlığı viral RNA bölümlerinin uzunluğunu stabilize etmekte önemli görünmektedir. Ayrıca diğer çalışmalar NS2'nin viral RNA sentezini düzenleyebileceğini önermektedir. Yeni sentezlenmiş NP'lerin ve polimerazların dışardan alınması, NP'nin negatif polariteli viral RNA ile bir araya getirilmesi için de çok önemlidir. Bu olay tam olarak anlaşılamamıştır ve Nükleer Lokalizasyon Sinyalleri, PA, PB1, PB2, NP ve importinler

arasındaki koordineli etkileşimi gerektirmektedir. Buna ek olarak son araştırmalarda gösterildiği gibi NP, polimeraz altbirimleri ile etkileşerek vRNP'nin toplanmasında önemli rol oynamakta ve vRNP'nin nükleer ve sitoplazmik transportunda yer almaktadır. Spesifik olarak NP, viral RNA segmentleri ve ayrıca polimeraz trimerleri ile etkileşime giren oligomerik halka yapılar şeklindedir. Viral RNA, kompleksin bir ucunda RNA polimeraz kompleksi ile etkileşimde iken diğer ucunda ise RNA loop bölgesi bulunur^(7,23).

Enfeksiyonun devamı için, sitoplazmada sentezlenen proteinler (örneğin, M1 proteini ve NP) ve nükleusta çoğaltılmış viral RNA arasında koordine edilmiş iki yönlü akış gereklidir. Bu şekilde, vRNA, NP, M1, PA, PB1, PB2 ve yapısal olmayan proteinlerle dolu olan RNP çekirdekte yeniden oluşturabilmektedir. Transkripsiyon fabrikası, tüm moleküler anatomisi bilinmemekle birlikte, SFPQ/PSF (splicing factor proline-glutamine rich) gibi bileşenlerden oluşmaktadır. Bağlanma mekanizmaları, influenza proteomunun dinamizmini ve karmaşıklığını arttırmak için çok önemlidir. Spesifik olarak RED-SMU1 spliceosomal kompleksi PB1 ve PB2 ile etkileşime girer ve NS1'in eklenmesinden sorumludur. Ekzon bağlantı kompleksi, SR (SRp40, SRp55 ve pre-mRNA Splicing Factor type 2/ Alternative Splicing Factor-SF2/ASF gibi serin/arginin-rich proteinler), NS1-BP ve heterojen nükleer ribonükleoproteinler K (heterogeneous nuclear ribonucleoproteins K; hnRNP K) spliceosomal kompleksin diğer bileşenleridir.

Transkripsiyon ve replikasyon, NS1 yoluyla PI3K kaskadının aktivasyonu ile arttırılmaktadır.

2.7.6. Nükleer eksport

NS1 ve NS2 gibi nükleer porlardan kolaylıkla geçebilen küçük proteinlerin birden fazla mekanizma yoluyla RNP kompleksleri sitoplazmaya eksport edilebilmektedir. Eksport makineleri, E1B/AP5, Rae1/mRNP41, NXF1-TAP (Nükleer RNA eksport faktörü tip 1), CBC (nuclear cap-binding complex, özellikle 80 kDa altbirim), REF/Aly, TREX, P15-INXT, YB-1 (Y-box-binding protein tip 1), CRM1/XPO1 (exportin tip 1), Rcc1 (kromozom yoğunlaşma tip 1 regülatörü), CHD3 (chromodomain helikaz DNA-bağlayıcı protein tip 3), RMB15B, RanBP3, DDX19B,

ATP'ye bağımlı RNA helikaz ve Hsc70'in (heat shock cognate protein 70) arasında bulunduğu birkaç bileşenden oluşan bir fabrikadır.

Kısaca, NXF1'e bağlı ve CRM1'e (chromosome region maintenance 1) bağlı olmak üzere iki ana eksport yolu tarif edilebilir. RNP'ler CRM1 vasıtasıyla eksport edilirken HA, NA, NXF1 tarafından taşınmaktadır.

CRM1 yolu diğerleri arasında bulunan Nup88, Nup214, Rcc1, Ran-BP3, CHD3, Hsc70, NS2'yi içermektedir ⁽¹⁾.

2.7.7. Post-translasyonel işlem

Translasyondan sonra proteinler değiştirildikleri Golgi ağına taşınmaktadır. HA ve NA'nın glikozilasyonu, HA ve M2'nin palmitolasyon/S akilasyonu, NS1'in fosforilasyonu ve SUMO-1/2/3 (Small Ubiquitin-like Modifier type 1/2/3) ile M1, NS1, NP, PB1 ve NS2'nin SUMOylasyonu (SUMOylation) gibi modifikasyonlar işlevsel olarak aktif viral proteinlerin üretiminde gerekli adımlardır. Bu görevler, Siklin Bağımlı Kinazlar ve hücre dışı sinyalle düzenlenmiş kinazlar gibi kinazlar tarafından gerçekleştirilmektedir.

Proteinler, geriye doğru COPI ve Rab8 tarafından *trans*-Golgi aygıtından *cis*-Golgi ve endoplazmik retikuluma nakledilir.

Protein katlanmasının kalitesi ve posttranslasyonel işlemin doğruluğu, malektin, kalneksin, kalretikulin ve ERp57 gibi proteinler tarafından kontrol edilmektedir ⁽¹⁾.

2.7.8. Apoptozis yolu

Kaspaz 3'ün aktivasyonu yoluyla doğal hücre ölümü (apoptoz) mekanizmasının aktivasyonu ile sonuçlanan RNP'lerin eksportu enfeksiyon ilerledikçe tercih edilmektedir. Nükleer membranı değiştirerek kaspaz 3'ün aktivasyonu, geçirgenliği nükleer por boyunca arttırmaktadır. Aslında, kaspaz sinyal yolları influenza virusunun aktivasyonu, replikasyonu, çoğalması ve patojenitesi açısından önemli bir rol oynar ve bu sebeple influenza semptomlarının şiddeti ve klinik yüküyle ilişkilidir. Virus, apoptoz indüksiyonunun düzenlenmesi ve kontrolü süreçlerinde yer alan konak hücresel proteinlerini çok iyi ayarlar ve modüle eder.

Çekirdekten serbest bırakılan RNP birimleri, özellikle mikrotübüllerin düzenlenmesi için merkez bölgesinde ve daha sonra geri dönüşüm endozomları alanında

perinükleer sitoplazmada yoğunlaşmıştır. Geri dönüşüm endozomları ile etkileşim, RNP'lerin mikrotübül ağıyla daha iyi etkileşime girmesine dolayısıyla kendilerini yönlendirmeye ve hücre zarına doğru yolculuk etmesine izin vermektedir. RNP'lerin eksportu, iyi senkronize edilmiş zamanlamayı gerektiren karmaşık bir mekanizma olup viral çoğalmanın geç evrelerinde hücrenin apikal yüzeyinde RNP'lerin birikmesi ile sonuçlanmaktadır ^(1,9).

Viral replikasyonun geç evrelerinde, muhtemelen mitojen-aktif protein kinazın aktive edilmesiyle hücre membranı üzerinde HA moleküllerinin birikimi hala bilinmeyen bir mekanizma yoluyla hücrenin apikal yüzeyine yönlendirilmiş RNP'lerin eksportunu arttırmaktadır.

RNP'nin her bir birimi viral genomun sekiz bölümünden yalnızca birini içerdiğinden, farklı bölümlerin doğru bir şekilde birleştirilmesi önemlidir. Viral RNA'ların kendileri "hiyerarşik montaj" sinyal mekanizması aracılığıyla bu süreçte aracılık etmektedir.

2.7.9. Tomurcuklanma ve serbest kalma

Enfeksiyon ilerledikçe apikal membran, uzatılmış HA, NA ve M1 ve M2 proteinlerinin yoğunlaştığı membran bölgelerinde RNP kompleksinin etrafında virusun tomurcuklanmasını başlatan viral proteinler bakımından zenginleşmektedir. Viral proteinler daha sonra plazma zarına iletilir ve toplanır. Burada, Rab11a ve HIV Rev bağlayıcı protein önemli bir rol oynamaktadır. HA, tomurcuklanma sürecini başlatabilir ancak tamamlamayabilir. Bu durum, NA, M1 ve M2 proteinlerinin aracılığını gerektirmektedir. Hücre zarında pozitif kurvatur oluşumu sırasında, uygun şekilde bir araya getirilmiş RNP birimleri viral tomurcuğun distal kısmına doğru hareket eder, böylece viral zarf tarafından uygun şekilde sarılabildiklerini göz önünde bulundurmak da önemlidir. Tomurcuklanma süreci ilerledikçe, virionu hücreye tutan bir sap oluşur. Viral zarf, daha sonra kendini hücre zarından ayırmalıdır. M2 proteini bu süreç için çok önemlidir. Sferik virionların ayrılabilmesi için hücre membranı pozitif kurvatur oluşturma yeteneğine sahiptir. Bununla birlikte, virus henüz özgür değildir; HA moleküllerinin membran yüzeyinin sialik asit birimleri ile bağlanmasıyla hücrelere bağlanmaktadır. Bu sebeple, NA molekülleri viral tomurcuklanmayı gerçekleştirmek için sialik asidi hücre yüzeyinden ayırmalıdır ⁽²⁴⁾.

İnfluenza virus sialidaz enzimatik mekanizması, enzim kataliz işleminin özellikle karmaşık olduğunu ve dört adımdan oluştuğunu gösteren Taylor ⁽²⁷⁾ tarafından incelenmiştir. İlk adımda “sialoside” sialidaza bağlandığında α -siyaloside, sandalye konformasyonundan psödo-kayık (pseudoboat) konformasyonuna dönüştürülür. Sonraki adım, oksokarbokatyon ara maddesi olan “sialosyl” katyona öncülük eder. α -anomer olarak Neu5Ac'nin oluşumu üçüncü adımdır. Mutarotasyon ve ardından termodinamik olarak stabil olan β -Neu5Ac'nin salınması dördüncü adımı oluşturmaktadır. Son olarak, bu adımlar sialik asit hidrolizine sebep olur.

Günümüzde NA'nın 11 izoformu bilinmektedir; NA10 ve NA11 son zamanlarda yarasalardan izole edilmiş ve sialik asidi parçalayamamıştır. Kesin rolü ve mekanizması hala bilinmemektedir.

NA, temel diziye dayalı olarak grup 1 (N1, N4, N5 ve N8) ve grup 2 (N2, N3, N6, N7 ve N9) olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Grup 1 NA'lar 150-kavite (150-döngünün 147-151 aminoasitleri tarafından oluşturulur), aktif katalitik bölgenin yakınında bulunan bir cebe sahipken, grup 2 NA'lar bu boşluğa sahip değildir.

2.8. İnfluenza patolojisi

Doğal veya deneysel olarak enfekte olmuş insanların hem üst hem de alt solunum yollarından izole edilen influenza virus, solunum yolu boyunca epitel hücrelerinde çoğalmaktadır. Histolojik değişiklikler nonspesifik olduğundan tek başına histolojik analiz spesifik bir tanı koymak için yetersizdir ve tanı tipik olarak, viral izolasyon, hızlı tanı testleri (RT-PCR dahil), serolojik çalışmalar veya in situ hibridizasyon veya immünohistokimyasal tekniklerle doğrulanan biyopsi veya otopsi dokusu kesiti gibi destekleyici tanı testlerini gerektirmektedir. Ölümcül olmayan influenza enfeksiyonları baskın olarak üst solunum yolları ve trakeayı kapsamakta ölümcül vakalar ise genellikle pnömoni bulgusu göstermektedir ⁽²⁾.

2.8.1. İnfluenzada trakeobronşial değişiklikler

İnfluenzanın 1918 pandemisi sırasında ve sonrasında yapılan çok sayıda otopsi çalışmasında özellikle şiddetli trakeit gibi değişiklikler bildirilmiştir. Otopside, ölümcül interpandemik ve pandemik influenzada solunum yolunda sekonder bakteriyel enfeksiyonlarının neredeyse sürekli birlikte bulunması resmi karmaşıktırmakta ve

gözlemlenen değişiklikleri yalnızca influenza virus enfeksiyonuna bağlamak zorlaşmaktadır.

Akut evrede trakea ve bronşların yalancı çok katlı silindirik epitelyumunun çok odaklı yıkımı ve dökülmesi karakteristiktir. Genellikle epitelin sadece bazal tabakası kalır. Ödem ve submukoz tıkanıklık genellikle işaretlidir. Bu değişiklikler 1918 influenza sonrasında birkaç seçkin patolog tarafından özenle tarif edilmiştir ^(2,16).

2.8.2. Trakea ve bronşların silyalı yalancı çok katlı epiteli

Başlangıçta büzülme ve vakuolizasyonu içeren sitonekroz ve ardından bu hücrelerin lümen boşluğuna dökülmesi dahil üst solunum yolunun epitelinde influenza virusunun sebep olduğu erken yapısal değişiklikler değişkenlik göstermektedir. Nekrotik hücreler makrofajlar tarafından fagositoza uğrayabilmektedir. Epitel üzerindeki bu yapısal değişiklikler genellikle düzensiz dağılmakta ve patolojik bölgeler histolojik olarak normal görünen alanlar ile bitişik bulunmaktadır. Enfeksiyonun erken evrelerinde belirgin bir özellik, infiltratta nötrofil bulunmamasıdır ancak epitel hücresi nekrozu oluştuğunda bu hücreler içeri göç etmektedir. Daha sonraki safhalar bronş duvarlarında mononükleer inflamatuvar hücre infiltratlarını göstermektedir ^(2,16).

2.8.3. Bronşiollerin epitel dokusu

İnfluenzanın 1919 pandemisinde ilk vakalarda bronşiollerin epitelyal bölgeleri eritemli olup ince kanlı köpük veya sıvı ile dolmuştur. Daha sonraki vakalarda epitel nekrotiktir. Bronşolar epitelin basit yapısı sebebiyle bu hücrelerin inceltilmesi ve düzleşmesi daha büyük solunum yollarına kıyasla daha belirgin olabilmektedir. Epitelyal tabakanın tamamen kaybedilmesi (hem silyalı hem de goblet hücreleri) görülebilmektedir ve genellikle bu bölgelerde hiyalin membran oluşumu ile ilişkilidir. Bronşolar lümende nötrofilik eksüda bulunabilmektedir. İnterstisyum, konjesyon, ödem ve inflamatuvar infiltrat gösterebilmektedir. Hava yolları ödem, fibrin ve çeşitli sayıda nötrofiller ile dolabilmektedir ^(2,16).

2.8.4. Diğer histolojik değişiklikler

Üst solunum yolu epitelindeki influenza enfeksiyonu aynı zamanda vasküler konjesyon, hiperemi, ödem, tunika propria ve submukozanın inflamatuvar hücre

infiltrasyonu ile de ilişkilidir. Sekonder bakteriyel enfeksiyon bulgusu yokluğunda kılcal damarlardan virusla enfekte olmuş bölgelere nüfuz eden nötrofillerin infiltrasyonu gözlenebilir, bununla birlikte nötrofilik infiltrasyon hiçbir zaman büyük değildir. Epitel tabakasında birçok nötrofil varlığı rastlantısal veya sekonder bakteri enfeksiyonu olduğunu kuvvetli bir şekilde göstermektedir. Lenfositler, histiyositler ve plazma hücrelerinin mononükleer hücre inflamatuvar infiltratı, influenza ile enfekte olmuş hava yollarının tunika propriası ve submukozasında sıklıkla bulunmaktadır ^(2,16).

2.8.6. Üst solunum yolu kesitlerinde influenza virus için in situ hibridizasyon veya immünohistokimyasal analiz

Trakeobronşiyal epitel hücrelerinde influenza virus varlığı 1950 ve 1960'larda yapılan çalışmalar ve yeni çalışmalarda sürekli olarak gösterilmiştir. Değişken ve multifokal histopatoloji gibi boyama genellikle odak noktasıdır. Hem nekrotik hem de histolojik olarak normal görünen hücreler ve ayrıca mononükleer inflamatuvar hücreler de pozitif boyanabilmektedir ⁽²⁾.

2.8.7. Epitel onarımı ve rejenerasyonun kanıtı

Yenilenen solunum yolu epitelinde mitotik aktivite fokal olarak görülebilmektedir. Yapılan çalışmalardan ve 1918'deki pandemilerden muhtemelen influenza enfeksiyonunda epitel rejenerasyonun yaklaşık 5 gün sonra başladığı anlaşılmaktadır. Kronik etkiler skuamöz metaplazi ve interstisyel fibroz içermektedir ^(2,16).

2.8.8. İnfluenza virus pnömonisi

İnfluenza otopsi çalışmalarının klasik histopatolojik incelemeleri, kapiller ve küçük damar trombozları, interstisyel ödem ve inflamatuvar infiltratlar, alveollerde ve alveolar kanallarda hiyalin membran oluşumu, değişen derecelerde akut intraalveoler ödem ve/veya hemoraji ve nekrotizan bronşit ve bronşiolite ek olarak diffüz alveolar hasar olarak adlandırılan şiddetli influenza pnömonisinin karakteristik değişikliklerini açıklığa kavuşturmuştur. Daha sonraki aşamalar, diffüz alveolar hasar, fibroz, epitel yenilenmesi ve skuamöz metaplazi düzenlenmesini göstermektedir. Sekonder veya rastlantısal bakteriyel pnömoniler sıklıkla ortaya çıkmakta ve patolojik tabloyu

karmaşık hale getirmektedir. Bu gibi durumlarda nötrofillerin alveolar bölgelere kitlesel olarak infiltrasyonu gözlenir ve alveolar hemoraji ve ödem primer influenza virus pnömonisine göre daha az belirgindir.

İnfluenza pnömonisinin erken patolojik tanımlamaları, ödematöz, hemorajik bronkopnömoninin bütün patolojik resmini tasvir eden 1889 pandemisinde yapılmıştır. İnfluenza pnömonisi hastalarında sık sık köpüklü, kanlı veya açık hemorajik balgam görülmektedir.

Önde gelen patoloğlar tarafından 1918 influenza pandemisi sırasında yapılan geniş çaplı otopsi çalışmalarında ilk olarak influenza virus pnömonisi ile ilişkili değişikliklerin spektrumu tanımlanmıştır. Daha önce hiç olmadığı kadarıyla influenza pnömonisine ilişkin birçok patolojik çalışma açıklanmıştır. Çoğu fokal bakteriyel pnömoni ile birlikte görülen ödematöz, hemorajik bronkopnömoni, 1918'de pandemi sırasında birçok doktor ve patoloğ tarafından 1889 yılındaki pandemi sonrası bildirilen bulgularla uyumlu olarak rapor edilmiştir.

İnfluenza virusunun ilk izolasyonu 1933 yılına kadar yapılmasa da, birçok patoloğ uzun zamandır altta yatan bir primer influenza pnömonisinin sekonder bakteriyel pnömonilerden ayrı olarak tarif edilebileceğinden şüphelenmiştir. Birçok patoloğ 1918'de, *Bacillus* (şimdiki *Haemophilus*) *influenza*'nın (Pfeiffer's basillus) bir dizi seri otopside sadece az sayıda vakada görülmesi sebebiyle influenzanın etken ajan olduğu hipotezini reddetmiştir.

İnfluenza enfeksiyonu hakkında bir dizi mükemmel otopsi çalışması 1957 pandemisi sırasında ve sonrasında rapor edilmiştir. İnterpandemik influenza olgularının çoğunda daha uzun süreç ve sekonder bakteriyel pnömoniler görülmüştür.

Yapılan araştırmalarda 1968'deki pandemi sırasında ölümcül influenza pnömonisi vakalarında gözlenen patolojik değişiklikler bildirilmiştir. Genel vaka mortalitesi 1968 pandemisinde 1957 pandemisine kıyasla düşük olsa da, aynı patoloji spektrumu gözlenmiştir. Hem 1957 hem de 1968 pandemisinde, altta yatan kronik hastalığı olmayan, daha önce sağlıklı kişiler ölümcül influenza pnömonilerine yenik düşmüşlerdir ^(2,16).

2.8.9. Primer influenza virus pnömonisinin histopatolojisi

Alveolar epitel, bronş ve bronşiollerin epitel örtüsü kadar influenza enfeksiyonunun hedefidir. Erken influenza virus pnömonisinde kapiler tromboz, alveolar duvarda fokal nekroz ve hiyalin membranlar gelişimi olmak üzere üç karakteristik alveoler değişiklik görülür. Alveolar epitelyumun erken lezyonlarının, enfeksiyon ile gelişen hiperemik, kısmen hemorajik ödematöz pnömoni sebebiyle tespit edilmesi genellikle zordur. Alveolleri kaplayan hücreler aynı zamanda nekrotik değişikliklere ve dökülmeye maruz kalmaktadır. İmmünfloresan çalışmalar, 1957 pandemi vakalarında alveolar epitel hücrelerinde influenza replikasyonunu belgelemiştir.

Dejeneratif değişiklikler, sitoplazmik vakuolizasyon ve nükleer piknozdur. Alveollerin lüminal boşluklarında, alveol kanallarında ve bronşiyollerde, fagosit olmuş hücrel enkaz gösteren makrofajlarla birlikte çok sayıda deskuamatif hücre gözlenebilmektedir. İnfluenza virus pnömonisinde belli bir aşamada alveoler hücreler kısmen veya tamamen yok olmaktadır. Geç evreler, yenilenen alveoler epitelin (tip II alveoler hiperplazi) varlığını göstermektedir ⁽²⁾.

Sitolojik değişiklikler, üst hava kanallarındaki kirpikli hücrelerde görülen sitolojik değişikliklere benzemektedir. Etkilenen bölgelerde alveolar makrofajlar bazen çok sayıda bulunmakta ve mitotik aktivite gösterebilmektedir. Dejenere, deskuamatif alveolleri kaplayan epitel hücreler, lökositler ve bazen eritrositlerin fagositozunu gösterebilirler. Bazıları dejenere değişiklikleri göstermekte ve öncelikle influenza virus ile enfekte olabilmektedir (in situ hibridizasyon çalışmaları ile desteklenir).

Belirgin kapiler konjesyonun sebep olduğu alveolar duvarda hiperemi influenza virus pnömonisinde sürekli olarak görülmektedir. Alveoler septa, alveolar kapiler yatağın genişlemesi ile belirgin şekilde kalınlaşmaktadır. Bu dilatasyon, etkilenen alanların diffüz kırmızı renginden sorumludur. Hiperemik alveoler septanın lökosit infiltrasyonu, influenza virus pnömonisinin erken evrelerinde her zaman görülmektedir. Lökositler ağırlıklı olarak nötrofiller ve bazen de eozinofillerdir. Septal nekroz gösteren alanlar haricinde infiltrasyon yoğun değildir. Hiperemik alveolar septada lökositik infiltrasyon görülmediğinde, influenza pnömonisi tanısından şüphelenilmelidir. İnfluenza virus pnömonisinin sonraki aşamalarında mononükleer lökositlerin, çoğunlukla lenfositlerin ve plazma hücrelerinin interstisyel infiltratları da

görülmektedir. Kapiler yatak içinde yatan megakaryositler de yaygın şekilde gözlenmektedir ⁽¹⁶⁾.

Alveolar duvarın nekrozu, kılcal trombozun bir sonucu olabilmektedir. Nekrotik alanların kapsamı ve sayısı değişiklik göstermektedir. Nekrotik bölgeler, lökositik infiltratlar, fibrinin eksudasyonu ve alveolleri kaplayan hücrelerin kaybolması ile ilişkilidir. Piknotik çekirdeği olan endotel hücre nekrozu görülebilmektedir. Alveolar bölgelerde hemoraji genellikle, plazma eksudasyonu ve fibrin iplikçikleri ile ilişkili olarak nekrotik alanların yakınında gözlenmektedir. Alveolar duvarların nekroz alanlarına bitişik alveol hava boşlukları genellikle deskuamatif alveolar hücrelerin birikimini içermektedir.

Hiyalin membranlar ilk önce solunum bronşiollerinde ve alveolar kanallarda görülmekte, daha sonra alveol duvarlarında gelişmektedir. Daha sonraki aşamalarda (genellikle yaklaşık bir haftalık bir klinik seyri izledikten sonra) hiyalin membranlar, alveol hava boşluklarında fibrin ağı içine birleşerek kaba şeritler veya ince şeritler halinde ortaya çıkabilmektedir. Alveol içindeki hiyalin membranların ağ yapısının bu resmi, tam gelişmiş influenza virus pnömonisinde karakteristik bir bulgudur. Bronşiyol ve küçük bronşlardaki küçük epitelyal defektleri kapsayan hiyalin membranlar da gözlenebilmektedir.

İntravalveoler ödem ve hemoraji, influenza virus pnömonisinin önemli özelliklerinden biridir. Genel olarak varlığı, alveol duvarının nekrozu ile ilişkilidir. Çok miktarda ödem 1918'de birçok vakada ortaya çıkmış, 1957 yılındaki pandemik materyalde daha az belirgindir. Alveolar kanalların genişlemesi, 1918'de birçok araştırmacı tarafından tarif edilen ölümcül influenza virus pnömonisinin akut evresinde ortak bir özelliktir. İntravalveolar hemoraji her zaman değil ancak genellikle alveol duvarının nekroz alanlarıyla ilişkilidir. Hemoraji bazen geniş olabilmekte ve küçük veya büyük hemorajik bölgeler olarak kesilen bir bölgede ve ayrıca plevra altında görülebilmektedir. Büyük hemorajik bölgeler bazen sekonder bakteriyel pnömonilerin bir sonucu olabilmektedir.

Antibiyotikler tarafından başarılı bir şekilde engellenmedikçe influenza pnömonisinin geç evreleri, hemorajiye sebep olabilen sekonder bakteriyel pnömoni ile neredeyse her zaman komplike olmaktadır.

İnfluenza virus pnömonisinin sonraki aşamalarının bir diğer histolojik özelliği onarım ve fibrozisin kanıtıdır. Alveollerin ve bronş ağacının belirgin mitozlarla epitel tabakasının yenilenmesi sıklıkla görülmektedir. Skuamöz metaplazi sıktır ve alveolleri kaplayan hücrelerin yenilenmesi sıklıkla tip II pnömoni hiperplazisini göstermektedir. Alveolar duvarların interstisyel fibrozisi de yaygındır. Geç evrelerde makrofajlar tarafından eritrosit fagositozu da gözlenmektedir. İnfluenza virus pnömonisinin değişen spektrumunda, akciğerin farklı alanları çoğunlukla enfeksiyonun farklı evreleri ile uyumlu histolojik lezyonlar göstermektedir. Daha sonraki aşamalar, organize pnömoni bulguları olsun olmasın, interstisyel fibroz ve bronşiolitis obliterans dahil tipik organizasyon ve fibroz değişikliklerini de gösterebilmektedir ^(2,16).

2.8.10. İnterpandemik, mevsimsel influenza olgularında influenza virus pnömonisi

Ölümcül primer influenza virus pnömonisinin özellikleri de dahil olmak üzere 1918, 1957 ve 1968 pandemi vakalarında görülen patolojik değişikliklerin spektrumunun ölümcül interpandemik influenza vakalarında da gözlemlendiği unutulmamalıdır.

Guarner ve ark.⁽²⁸⁾ hem histopatoloji hem de immünohistokimyasal test ve in situ hibridizasyon yöntemleri kullanarak sekiz ölümcül influenza vakası bildirmişlerdir. Trakeobronşit grubu ve alveolit grubu olmak üzere olgular baskın histopatoloji temelinde iki gruba ayrılmıştır. Trakeobronşit grubu kesitler, intakt ve nekrotik bronşiyal epitel hücrelerinde influenza virus için fokal pozitif immünohistokimyasal veya in situ hibridizasyon boyamanın yanı sıra bronş lümeninde değişik derecelerde epitel deskuamasyonu ve nekrotik çökelti göstermiştir. Bu vakaların üçünde nekrotizan bronşit tespit edilmiştir. Bol miktarda mononükleer inflamatuvar infiltrat bulunan alveolit ikinci grupta gözlenmiştir. İntraalveolar hemoraji bir olguda bildirilmiştir. Bu grupta viral antijen veya nükleik asit bulunamamıştır.

Bir başka çalışmada, Guarner ve ark.⁽²⁹⁾ 2003-2004 influenza mevsiminde meydana gelen 47 pediatrik ölümden otopsi materyalini incelemişlerdir. Diğer çalışmalarda olduğu gibi, trakea ve bronşlarda görülen değişiklikler vakaların %90'ında submukozal konjesyon ve %73'ünde mononükleer submukozal inflamatuvar infiltrat olmuştur. Olguların %50'sinde bronşiyal epitelin nekrozu ve submukozal hemoraji

bulunmuştur. Alt solunum yolunda, %66'sı mononükleer interstisyel inflamasyon ve hiyalin zar oluşumu, %50'si ise intraalveolar hemoraji bulgusu göstermiştir. Vakaların %50'sinde nötrofilik, bakteriyel bronkopnömoni de gözlenmiştir. İnfluenza viral antijenleri için immünohistokimyasal test, olguların %57'sinde pozitif bulunmuştur. Pozitif boyanma bronşiyal epitel hücrelerinde, trakea, bronş ve bronşiyollerin submukozal mukus bezleri ve alveol lümenindeki tekli hücrelerde (alveolleri kaplayan hücreleri değil dökülmüş bronşiyal epitel hücrelerini temsil ettiği düşünülmektedir) gözlenmiştir. En iyi immünohistokimyasal boyama, üç günden daha kısa sürede kaybedilen hastalarda görülmüştür. Vakaların %50'sinde araştırmacıların hipersitokinemi ile ilişkili olabileceğini düşündüğü hemofagositoz gözlenmiştir. Hemofagositoz hem 1918 hem de 1957 pandemisinde bildirilmiştir ⁽²⁾.

Özellikle alveoler epitel hücresi deskuamasyonu ve diffüz alveol hasarı gösteren vakalarda olmak üzere alveoler epitel hücrelerinde influenza virus antijenlerinin veya nükleik asitlerin bulunmaması ilginçtir, ancak bu durumun vakaların süreci ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

2.8.11. Yüksek patojeniteli H5N1 avian influenza enfeksiyonlarında histopatolojik değişiklikler

İnsan H5N1 influenza viral enfeksiyonunun 200 ölüm ile 328 belgelenen vakası 2003 yılından günümüze kadar bildirilmiştir. To ve ark.⁽³⁰⁾ 1997 yılında Hong Kong'da ilk H5N1 insan salgını sonucu ölen altı kişiden ikisinin otopsi bulguları hakkında bilgi vermişlerdir. Her ikisinde de çoklu organ yetmezliğine bağlı ölümler ile bir aydan uzun süreli klinik seyir gözlenmiştir. Solunum yolu bulguları, yaygın hemoraji, interstisyel fibroz ile diffüz alveolar hasar ve kistik olarak genişleyen hava boşluklarından oluşmaktadır. İnterstisyel lenfoplazmasitik infiltrat ve dağılmış histiyositlerde reaktif hemofagositik aktivite bir olguda görülmüştür. Her iki olgu da sekonder bakteriyel pnömoni bulgusu göstermemiştir. Bununla birlikte her ikisinde de reaktif hipersitokinemi ile tetiklendiği ileri sürülen hematopoietik organlarda reaktif hemofagositik sendrom görülmüştür.

Uiprasertkul ve ark.⁽³¹⁾ akut solunum sıkıntısı gelişen ve 17 gün sonra hayatını kaybeden altı yaşındaki bir erkek çocuğun ölümcül vakasından otopsi çalışması yapmışlardır. Bu olguda solunum yolu, diffüz alveolar hasarın proliferatif fazını,

interstisyel pnömoniye, fokal hemorajiyi ve bronşioliti göstermiştir. Reaktif hiperplazili alveolar pnömositler belirgin sitopatik değişiklikler olmaksızın görülmüştür. Morfolojik olarak aspergillus türüne benzeyen bir mantarla birlikte sekonder enfeksiyon belirtilmiştir. Hemofagositoz gözlenmemiştir. H5N1 için yapılan immünohistokimyasal analizde, alveolar epitel hücrelerinde pozitif boyanma tespit edilmiştir. Sürfaktana karşı antikorlarla çift boyama, bunların tip II pnömositler olduğunu göstermiştir. İlginç olarak, immünohistokimyasal boyalar trakea epitelyumunda negatif görülmüştür. Replikatif H5N1 RNA için RT-PCR, sadece akciğer dokusunda değil aynı zamanda kalın barsaklarda da pozitif bulunmuştur. Plazma ve diğer organlarda RT-PCR sonucu negatif tespit edilmiştir.

H5N1 enfeksiyonlarının yakın zamanda yapılan çalışmasında mevsimsel, endemik influenza enfeksiyonu olan kontrol hastalarına göre periferik kanda daha yüksek sitokin ve kemokin düzeyleri ve ölümcül H5N1 enfeksiyonlarında en yüksek seviyede olduğu gösterilmiştir. H5N1 vakaları aynı zamanda yüksek faringeal virus titreleri ile karakterize olmuş ve bir vakada solunum yolları dışında sınırlı replikasyon olasılığı olduğunu düşündüren bir durum olarak rektumda H5N1 virusu tespit edilmiştir. Bu çalışmada solunum yolu sitokin ve kemokin düzeyleri ölçülmemiş ve kan sitokin sonuçları ile 1918 ve 1957 yıllarındaki gibi geçmişteki pandemik virus enfeksiyonlarında gözlenenler arasında karşılaştırma mümkün olmamıştır ⁽³²⁾.

2.8.12. İnfluenza virus enfeksiyonunun deneysel hayvan modelleri

Shope^(33,34) ilk kez influenza A virusunu 1930 yılında domuzlardan izole etmiş ve 1933 yılında insan influenza A viruslarının izolasyonundan sonra dağ gelincikleri, insan influenza için mükemmel bir laboratuvar modeli olarak tanımlanmıştır. Shope^(33,35,36), araştırmasında trakeobronşiyal hava yollarının silialı epitelinin deskuamasyonu ve peribronşiyal mononükleer hücre inflamatuvar infiltrasyonları olarak adlandırılan insan influenza virus enfeksiyonunda olanlar ile uyumlu değişiklikleri tanımlayarak domuz, dağ gelincikleri ve farelerin solunum yollarındaki histopatolojik değişiklikleri bildirmiştir. Enfekte olmuş domuz ve dağ gelinciklerinin akciğerlerinde alveoler septada çoğunlukla belirgin hiperemi, kılcak konjesyon, mononükleer ve nötrofilik inflamatuvar hücre infiltrasyonları, alveolar epitel hücrelerinin nekrozu ve deskuamasyonu, interstisyel ve intraalveoler ödem görülmüştür. Fareler, insan ve

domuz influenza viruslarına duyarlılık göstermiş, ancak enfeksiyonu başka farelere bulaştıramamıştır. Bunun aksine Shope^(33,35), hem dağ gelinciklerinin hem de domuzların, virusu temas ettiği hayvanlara bulaştırabildiğini göstermiştir. İnfluenza A viruslarıyla enfekte edilmiş bu deneysel hayvan modelleri ve insanlar, alveolar epitelin viral dejenerasyonu, hiperemi ve konjesyon, septal inflamatuvar infiltratları, hava boşluklarında nekrotik hücre parçacıkları ile makrofajların görünümü, intraalveolar ödem ve hemoraji dahil birçok histolojik özelliği paylaşmasına rağmen insan vakaları ek olarak hiyalin membranlar ve kılcak tromboz oluşumu göstermektedir.

İnfluenza virus enfeksiyonu için insan olmayan primatların kullanımı yakın zamanda yeniden değerlendirilmiştir. Son zamanlarda, Baskin ve ark.⁽³⁷⁾ günümüze ait bir insan H1N1 influenza virusu ile enfekte olmuş Güney domuz kuyruklu şebeği (*M. nemestrina*) patolojisini bildirmişler, Baas ve ark.⁽³⁸⁾ ise bu hayvanlarda konak gen ekspresyon profillerini analiz etmişlerdir. İntraalveolar ödem ve interstisyel inflamatuvar hücre infiltrasyonları olan insan influenza virus pnömonisi ile uyumlu histopatolojik bulgular ve alveolar epitel hiperplazisi dahil değişiklikleri 7. günde gözlemlemişlerdir.

Fareler ve dağ gelincikleri de dahil olmak üzere deneysel hayvan modellerinde HPAI H5N1 virusları çok sayıda araştırmada incelenmiştir. Her iki hayvandaki çalışmalar, bronkopnömoni, bronşiyal ve bronşiyoler epitel hücrelerinin deskuamasyonu, diffüz alveolar interstisyel inflamasyon, intraalveolar ödem ve alveolar pnömonsit hiperplazisi ile benzer bir patolojik spektrum sergilemiştir. Viral antijenlerin dağılımı için immünohistokimyasal analiz, bronşiyal epitel hücrelerinde, alveolar pnömonsitlerde ve alveolar makrofajlarda pozitif boyanma göstermektedir. Her iki sistemde de viral ensefalit gözlenmiştir. Kuiken ve ark.⁽³⁹⁾ 1997 H5N1 virusu ile sinomolgus maymunlarının patolojisi üzerine çalışmışlardır. Maymunlardaki histopatolojik değişiklikler, bronşiyalar ve alveolar epitelyumda yaygın deskuamasyonu, interstisyel inflamasyon ve ödemi, intraalveolar ödemi ve çok sayıdaki nötrofil ve makrofajlarla karıştırılmış hemorajiyi kapsamaktadır. Bir hayvanda diffüz alveolar hiyalin membran oluşumu tespit edilmiştir. Hafif üst solunum yolu değişiklikleri gözlenmiş, ancak fokal epitelyal deskuamasyon, ülserasyon ve inflamasyon göstermiştir.

Reverse genetik teknikler kullanarak 1918 influenza virusun açık okuma çerçevelerini içeren enfeksiyöz viruslar üretmek, fare ve sinomolgus maymun modellerini kullanarak deneysel hayvan enfeksiyonlarını incelemek, 1918 influenza

hastalarının otopsi dokularından 1918 influenza virus genomunun sekansı için projenin tamamlanması ile birlikte mümkün olmuştur. Her iki hayvanda da 1918 influenza virusu yüksek titrelerde çoğalmıştır. Farelerde 1918 virusu ile enfeksiyon, nötrofillerin ve makrofajların infiltratları ile belirgin bir alveolitli nekrotizan bronşit ve bronşiyolite sebep olmaktadır. Alveolar ödem de gözlenmiştir. Sistemik enfeksiyon bulgusu bulunmamıştır. Gen ekspresyon dizi analizi, enfeksiyondan bir gün sonra preinflamatuvar ve hücre ölüm yollarının belirgin bir şekilde aktive olduğunu göstermiştir. Maymunlarda yeniden oluşturulmuş 1918 influenza virusuyla enfeksiyon, ölümcül ARDS geliştirmiştir. Bu olguda gen ekspresyonu analizi, doğuştan gelen immun yanıtın düzensizliğini göstermiş ve bu yanıt koruma için yetersiz kalmıştır ⁽²⁾.

2.9. Konak değişimi için gerekli viral adaptasyonlar ve patojenite belirleyici faktörler

Kuşlardan insana direk geçiş yoluyla veya domuzlarda olası başka bir adaptasyon süreci yoluyla yeni bir konak olarak başarılı bir şekilde insanlara uyum sağlamak için influenza A virusların verimli replikasyon ve türler arası geçişi sağlamaları gerekmektedir. İnfluenza A virusun gastrointestinal epitel hücrelerinde çoğaldığı kuşların aksine insanlarda ve domuzlarda influenza A virusun primer hedef hücreleri solunum yollarının epitelidir. Sonuç olarak, insan konağına başarılı bir şekilde adaptasyon viral replikasyon mekanizmalarında mutasyon gerektirmektedir ⁽⁴⁰⁾.

Virionun üst veya alt solunum yolunda veya alveoler epitel hücrede eksprese edilen sialik asitlere viral yüzey protein HA yoluyla bağlandığı insan konağında influenza A virus replikasyonunun ilk adımı hücreye bağlanmasıdır. Kuş epitelyumu α 2,3-bağlantılı sialik asidi büyük ölçüde eksprese ederken, α 2,6-bağlı sialik asit insan trakeasında baskındır. Bağlanmadan sonra, virionlar endozomal yola girer. Daha sonra, viral ve endozomal membranın HA ile indüklenen füzyonu, viral RNA, polimeraz kompleksi (viral proteinler PA, PB1 ve PB2) ve viral nükleoproteinden oluşan vRNP'nin M1 proteinden ayrılması izlenmektedir. İlginç olarak, kuş ve memeli influenza A virusları bu HA aracılı membran füzyonu için farklı pH optimumu gösterir ve HA proteinindeki (aminoasitler N104D ve T115I) ilgili mutasyonlar, viral genetik bilgiyi konak hücrenin içine yeterli düzeyde salma kapasitesiyle ilişkilendirilmiştir. Bir sonraki adım vRNP'nin sitozolden çekirdeğe doğru yolculuk yapmasıdır. Bu yer değiştirmeye

memeli sisteminde hücresel importin- α 7 ve kuşlarda importin- α 3 aracılık etmektedir ve importin izoformlarının kullanımındaki değişim hem NP hem de PB2'ye bağlıdır. Çekirdek içinde negatif polariteli viral RNA'nın haberci RNA'ya transkripsiyonu hücresel translasyon mekanizması ile yeni viral proteinlerin yanı sıra pozitif polariteli RNA ve yüksek miktarda yeni transkribe edilmiş negatif polariteli viral RNA meydana getirmektedir. Bu noktada avian polimeraz, kuşların gastrointestinal sisteminde olduğu gibi 41°C sıcaklığa adapte olmuşken, insan suşlarında PB2 geninde 627 pozisyonundaki mutasyonların, insan akciğerinde bulunan daha düşük sıcaklıklara karşı toleransa katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Virus montajı, yeni oluşan virionların tomurcuklanması, ayrılması ve serbest bırakılması ile sonuçlanan viral proteinlerin ve yeni oluşan RNP'lerin lipid raft alanlarında (lipid raft domains) toplandığı apikal hücre zarı üzerinde gerçekleşmektedir ^(41,42).

Özellikle pandemi hazırlığı açısından önemli görev, virus varyantlarının artmış patojenite ile ortaya çıkışını değerlendirmektir. İnfluenza A virus varyantları, gelişmiş replikasyon özellikleri veya bağışıklıktan kaçış yolları göstermektedir. Replikasyon verimliliğini arttıran birçok mutasyon polimeraz kompleksinde bulunabilmektedir ⁽⁴³⁾. En önemlisi, replikasyon hızının artması ve 1918, 1957 ve 1968 pandemik influenza A virusda daha yüksek patojenite yaratmak için NP ile etkileşimini stabilize etmeyi öneren PB2 geninde E627K'nin yerini almasıdır. Dolaşımdaki H7N9 izolatlarında ve H5N1 varyantlarının %32'sinde bulunmaktadır. Etkili viral yayılımı önemli katkıda bulunan, konak doğal immun cevabının sınırlandırılmasında önemli rol oynayan, viral yapısal olmayan NS1 protein, doğal sistem tarafından viral RNA'nın tanınmasını önler ve böylece influenza ile enfekte epitel hücreleri tarafından antiviral tip I IFN üretimini bloke eder. Buna ek olarak NS1, protein kinaz R'nin aşağı akış sinyalizasyonunu inhibe eder, IFN reseptörünü azaltarak düzenler ve hücresel mRNA'nın işlenmesi kısıtlamalarını ortadan kaldırır. Azalmış veya eksik NS1 aktivitesine sahip viruslar, patojenite bakımından büyük ölçüde tehlikeye düşer. İnfluenza virus patojenitesinin bir diğer önemli belirleyicisi viral HA'dır. HPAI, mevsimsel insan influenza A virus ve düşük patojenik kuş gribi suşlarının aksine, daha fazla sayıda çeşitli proteazlarla HA ayrışmasını teşvik eden HA ayrışma bölgesinde “multibasic” bir aminoasit motifi taşımaktadır. HPAI kaynaklı hastalık, insanlarda artan hastalık şiddeti ve yüksek mortalite ile ilişkilidir. Buna ek olarak, popülasyona yeni eklenen influenza suşlarının

genelde HA'nın globüler ana etki alanında sadece bir veya iki N-bağlı glikozilasyon bölgesi bulunurken veya hiç bulunmazken, mevsimlik suşlar antijenik epitoplarını maskelemek için daha fazla alana sahiptir. Son 40 yılda H3N2, patojenite azalmasına paralel olarak glikozilasyon alanlarının sayısını arttırmıştır ⁽⁶⁾.

2.10. İnfluenza virusa karşı immun cevap

İnfluenza A virus enfeksiyonuna yenik düşen hastalarda, akciğer otopsileri hemen hemen daima diffüz alveol hasarı gösterir, ancak viral RNA hastaların yalnızca bir alt grubunda mevcuttur. Hayvanlarda influenza A virus enfeksiyonu ile ilgili yayınlanmış araştırmalardan elde edilen bu sonuçlar ve bulgular, influenza A virus enfeksiyonuna bağlı mortalitenin, kontrolsüz viral yayılımdan çok abartılı bir immun yanıtın kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. Bağışıklık hücrelerinin birkaç alt grubunun, hasar veren konak yanıtlarına katkıda bulunduğu belirlenmiş ve terapötik müdahale için yeni hedefler sağlayan temel moleküler mekanizmaların bazıları kısa süre önce tanımlanmıştır.

İnfluenza A virusların birincil hedef hücreleri, çeşitli model tanıma reseptörleri tarafından patojen/tehlike ile ilişkili moleküler kalıpların (pathogen-/danger-associated molecular patterns; PAMP/DAMP) tanımlanmasının üzerine bir anti-enflamatuar tepki başlatan epitel hücreleridir. Viral kepsiz 5'-trifosforillenmiş RNA, RIG-I (retinoik asit ile indüklenebilir gen-I) ile etkileşime girerek mitokondriye bağlı antiviral sinyal proteini, TRIM25 (üç parçalı motif içeren protein 25) ve IPS-1 (interferon- β -promotör uyarıcısı-1) ile sonradan ortaya çıkan etkileşime sebep olur, tip I ve III IFN'lerin IRF-3 ve IRF-7'ye (interferon düzenleyici faktör) bağımlı transkripsiyon ve translasyonunu indükler. Ayrıca, viral kalıpların protein kinaz R tarafından tanınması, NF- κ B (aktive edilmiş B hücrelerinin "kappa-hafif zincir arttırıcı" nükleer faktörü) translokasyonunu çekirdeğe ve proinflamatuar, proapoptotik ve antiviral gen kümelerinin transkripsiyonel aktivasyonunu aktive eder. İnfluenza A virus enfeksiyonunu algılayan diğer reseptörler arasında NLRP3 (NOD benzeri reseptör ailesi pyrin domaini içeren 3) inflamazom ve endozomal toll-like reseptörler (TLR3 ve TLR7) yer alır. Son kanıtlar, viral enfeksiyon sırasında high-mobility group box 1 (HMGB1), S100A9 veya pürin metabolitleri gibi DAMP'lerin influenza hastalığının progresyonunda önemli rol oynadığını düşündürmektedir ⁽⁴⁴⁾.

Epitel hücrelerine benzer şekilde akciğer yerleşimli makrofajlar ilk savunma hattını temsil eder ve viral kalıp tanımayı takiben bir immün cevap başlatır. Viral partiküllerin yanı sıra enfekte apoptotik hücreleri fagosite eder ve tip I IFN'lerin, başka sitokinlerin ve kemokinlerin önemli bir kaynağını temsil etmektedirler. Böylece yerleşik alveolar makrofajların, influenza virus enfeksiyonundan sonra viral yayılımı, morbiditeyi ve mortaliteyi sınırlamada çok önemli olduğu defalarca gösterilmiştir. Aynı zamanda, bağışıklık ile ilişkili patolojilere sebep olabilecek CD8⁺ T hücrelerinin uyarılmasıyla doğal immün yanıtlarının yanı sıra adaptif bağışıklığı başlatırlar. Örneğin, toll-like reseptör 4'e bağlı bir şekilde influenza A virus enfeksiyonunda üretilen okside fosfolipidlerin makrofajların sitokin üretimini güçlendirdiği ve influenza A virus kaynaklı akciğer hasarının progresyonunda önemli derecede yer aldığı bildirilmiştir.

Nötrofiller, alveollere influenza A virus enfeksiyonu sonrası erken dönemde büyük ölçüde alınır ve influenza A virus enfeksiyonunda kararsız bir rol oynadığı bulunmuştur. Diğer taraftan, influenza hastalığının erken döneminde nötrofillerin azalması, kontrolsüz viral yayılım ve hafif hastalığın ciddi hastalığa progresyonu ile ilişkili bulunmuştur. Bununla birlikte, yüksek patojenik H1N1 ve H5N1 enfeksiyonlarında bulunan fazla nötrofilik stok, akciğer hasarına büyük ölçüde katkıda bulunmaktadır. Ayrıca, çeşitli sinyal moleküllerinin nötrofilik salınması, başka sitokinler de dahil olmak üzere ekstraselüler proteazlar, özellikle influenza A virus enfeksiyonunda zararlı olduğu kanıtlanmış histon bileşenleri nötrofilik ekstraselüler tuzaklar ve reaktif oksijen türleri akciğer hasarına önemli ölçüde sebep olur. Nötrofilik süperoksit dismutaz ve NADPH oksidazın yanı sıra miyeloperoksidazın da alveoler epitel bariyer bütünlüğünü önemli derecede etkilediği bildirilmiştir. Sonuç olarak, influenza A virus enfeksiyonu sırasında CXCL2 veya CXCL10 ile yönlendirilen nötrofil alımının kaldırılması, klinik öncesi modellerde sonlanımı geliştirmektedir ⁽⁶⁾.

Enfekte akciğerde proinflamatuvar ortamın oluşturulmasını takiben dolaşımdaki kan monositleri alveolar lümene yönlendirilir ve monosit türevi alveolar makrofajlar ve dendritik hücrelere farklılaşır. Öncekiler, yerleşik alveolar makrofajların aksine doğrudan influenza kaynaklı hasar şiddetinin artmasıyla doğrudan bağlantılıdır. Proapoptotik mediatörlerin yanı sıra büyük miktarda proinflamatuvar salınımını sağlarlar. Bunların arasında, özellikle tip I IFN ile indüklenen TRAIL'nin (TNF'ye bağlı apoptozu indükleyen ligand) reseptörü olan DR5 (death receptor 5) yoluyla alveoler

epitel hücre apoptozunun indüklenmesi ile kollateral akciğer hasarını indüklediği ve sürdürdüğü gösterilmiştir. Hem monosit türevi alveolar makrofajların alınmasının engellenmesi hem de TRAIL sinyalleşmesinin kaldırılmasının influenza kaynaklı akciğer hasarını azalttığı bulunmuştur ve yeni kanıtlar farelerde influenza A virus kaynaklı akciğer hasarından sonra ödem çözülümünün inhibisyonunda TRAIL'nin rolü olduğunu ortaya koymaktadır ⁽⁴⁵⁾.

Dendritik hücreler solunum yolunda ve alveolar epitelde bulunur ve dendritik hücreleri alveoler lümene kadar uzatır, böylece doğrudan enfekte olabilmekte veya ölen hücrelerden antijen alımı yoluyla viral enfeksiyonu algılayabilmektedir. Özellikle CD103+ dendritik hücreler alt grubunun, granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF) gibi aktive sitokinlere ve aynı zamanda NLRP3 inflamasyon sitokinleri, interlökin-1 ve interlökin-18'e yanıt olarak drene olan lenf düğümlerine göç eden ana alt grup olduğu bildirilmiştir. Ardından aktive edilen dendritik hücreler, saf CD4+ ve CD8+ T hücrelerine çapraz antijen sunabilmekte ve böylece adaptif immun yanıt başlatabilmektedir. İlginç bir şekilde, insan olmayan primatlarda şiddetli H5N1 enfeksiyonunda dendritik hücre sayıları fazlasıyla artmaktadır ve dendritik hücrelerin NLRP3 inflamazom bağımlı araçları interlökin-1 β , interlökin-1 α ve interlökin-18'i salgıladığı gösterilmiştir. Solunum yolu influenza A virus enfeksiyonuna T hücre aracılı uyarlanabilir immunité son derece karmaşıktır ve epitelyal hücreler, dendritik hücreler ve nötrofillerden türetilen çoklu sinyal olaylarından etkilenmektedir. Aktive edilmiş CD8+ T hücreleri, enfekte epitel hücrelerini sunan influenza A virus antijenini parçalayabilen sitotoksik efektör haline gelir ve tümör nekroz faktörü- α (TNF α) ve TRAIL'nin üretilmesiyle hücre apoptozunun indüksiyonuna katkıda bulunur. Sitotoksik granüllerin salınması ile enfekte olmuş epitelyal hücrelerin spesifik olarak uzaklaştırılması aktif olarak virus temizlemesine katılsa da, aktive edilmiş T hücresi tarafından salınan TNF α , CCL3 ve CCL5 gibi proinflamatuvar sitokinlerin spesifik olmayan aktivitesi ayrıca enfekte olmamış epitelyal hücreleri etkileyebilmekte ve böylece akciğer inflamasyonunu ve yaralanmasını artırabilmektedir ^(44,45).

Ayrıca, akciğer endotel hücreleri influenza virus enfeksiyonundan etkilenmekte ve fare influenza modellerinde epitel hasar üzerinde etkisi olabilmektedir. E-selektin, P-selektin, hücre içi adezyon molekülü-1, vasküler hücre adezyon molekülü-1, CXCL9 ve CXCL10 gibi adezyon molekülleri ve kemokinlerin ekspresyonu ile monosit ve

lökositlerin akciğerde intravazasyonu ve ekstrasvazasyonuna aracılık etmekle kalmaz, aynı zamanda interlökin-6 ve TNF α gibi inflamatuvar mediatörleri serbest bırakır ve influenza A virus enfeksiyonu sırasında proinflamatuvar ortamı daha da teşvik eder. Aksine, endotelial hücreler, anjiyotensin dönüştürme için önemli bir kaynaktır ve anjiyotensin 2'yi indirgeyen enzim 2 (ACE2) ve influenza A virus enfeksiyonundan sonra artmış serum ACE2 düzeyleri epitelyal hücrelerin korunması ve insan H5N1 ve H7N9 enfeksiyonlarının iyileşmesiyle korelasyon gösterir. Enflamatuvar viral akciğer hasarını düzenleyen bir diğer önemli endotel sinyal olayı sfingozin 1 fosfat yoludur. Endotel kaynaklı sfingozin-1-fosfat 1'in bloke edilmesi, influenza bağlı akciğer hasarında düşük mortalite oranları ile korelasyon gösteren azalmış sitokin ve kemokin düzeyleri ile sonuçlanmaktadır.

2.11. İnfluenza virusların laboratuvar tanısı

2.11.1. Hücre kültürü yaklaşımlarını kullanarak virus izolasyonu

2.11.1.1. Viral kültür

İnfluenza viruslarının, klinik örneklerde, memeli hücrelerinde veya embriyonlu yumurtada üretilerek tanısı en geleneksel yöntemdir. Viral kültür yaklaşımı 1940'larda tanıtılmış ve viral enfeksiyonların tanısı için altın standartlardan biri olarak kabul edilmiştir. Bu yaklaşım, hücre dizilerinin veya embriyolu yumurtaların enfekte örnekler ile inokülasyonunu, sitopatik etkinin gelişimini izlemek için 7-10 gün boyunca çoğaltılmasını ve immünfloresan mikroskop, spesifik antikor boyama veya eritrositler kullanılarak hemadsorbsiyon ile influenza virus enfeksiyonunun tespitini içermektedir. Bu yöntem ile yapılan influenza virus izolasyonu genellikle Madin Darby Canine Kidney hücreleri (MDCK), A549, mink akciğer epitelyal hücre dizisi (Mv1Lu), rhesus maymun böbrek hücreleri (LLC MK2) ve Buffalo yeşil maymun böbrek hücreleri (BGMK) gibi bazı hücre dizilerinde veya rhesus maymun böbrek hücreleri (RhMK) veya Afrika yeşil maymun böbreği hücreleri (AGMK) gibi primer hücre kültürlerinde gerçekleştirilmektedir. Bazı laboratuvarlarda virus kültürü, nükleik asit amplifikasyon testi ile paralel olarak kullanılmaktadır ^(3,46).

2.11.1.2. Shell vial kültür

Shell vial kültür, influenza virus enfeksiyonlarının klinik tanısı için 1990'ların başından beri kullanılmakta olan hızlı viral kültür yöntemidir. Bu yöntem, küçük bir şişeye (vial) yerleştirilen “shell” üzerindeki memeli hücrelerinde virusların çoğaltılmasını, ardından influenza virusa özgü floresan monoklonal antikorlarla boyamayı içermektedir. Viral tespitin 24-48 saat içinde mümkün olduğu Shell vial kültür yöntemi geleneksel viral izolasyon yöntemine kıyasla nispeten basit ve daha duyarlıdır. R-mix hücreleri (mink akciğer hücreleri ve insan adenokarsinom hücrelerinin karışımı) kullanılan modifiye Shell vial kültür yöntemi, yaklaşık 1.4 gün dönüş süresi ile Shell vial kültür yöntemine kıyasla daha yüksek sensitivite göstermiştir⁽³⁾.

2.11.2. Direkt floresan antikor testi

DFA testi, influenza virus enfeksiyonlarının tanısında rutin olarak kullanılan antijen temelli bir testtir. Nazofarengeal sürüntü veya nazofaringeal aspiratlardan elde edilmiş solunum yolu epitel hücrelerinin floresan işaretli influenza virusuna spesifik antikorlarla direkt boyanmasını ve bunu takiben floresan mikroskop altında incelenmesini içeren bu yöntem 1960'lı yılların başından beri kullanılmaktadır. Test prosedürünün sadeliği ve kısa sürede sonuç vermesi sebebiyle influenza tanısı için DFA testleri yaygın bir şekilde kullanılmıştır. Şu anda piyasada Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration; FDA) onaylı iki DFA testi bulunmaktadır. Bunlar Diagnostic Hybrids (Athens, OH, ABD) için lisanslı D3 FastPoint L-DFA testi ve Intracel Corporation'a (Issaquah, WA, ABD) lisanslı Bartels Viral Solunum Yolu Tarama ve İdentifikasyon Seti'dir. Bu testler esas olarak influenza A ve B viruslarının saptanması içindir. Bununla birlikte, influenza A viruslarının alt tiplerini yapmak için kullanışlı değildir. Mevsimsel influenza virusları için DFA testleri, geleneksel viral izolasyon prosedürlerine kıyasla %60-80 arasında değişen sensitivite sergilemiştir. DFA testleri 2009 H1N1 pandemisi sırasında, RT-PCR tabanlı yöntemlerle karşılaştırıldığında, %38 ila %93 aralığında değişen sensitivite göstermiştir. DFA, virus izolasyonu ve RT-PCR ile hasta başı test (Point of Care; POC) de dahil olmak üzere birden fazla testin performansını karşılaştıran, 526 solunum örneğinde 2009 pandemik H1N1 influenza virus tespiti için yapılan bir çalışma, test sensitivitelerinin

DFA için %38.7, virus izolasyonu için %45.7 ve QuickVue POC testi için %18.2 olduğunu bildirmiştir ⁽⁴⁷⁾. Mevsimsel influenza, 2009 pandemik H1N1 influenza virus ve diğer solunum yolu virusları tespiti için DFA ile iki hızlı influenza tanı testi (RIDT) BinaxNOW Influenza A&B testi (BinaxNOW) ve 3M Rapid Detection Flu A+B testi (3MA+B), R-Mix kültürü ve Luminex xTAG Solunum Yolu Virus Paneli performansını karşılaştıran bir başka çalışmada sensitivite oranları DFA için %46.7, BinaxNOW için %17.8, R-Mix kültürü için %94.5, Solunum Yolu Virus Paneli için %97.8'dir ⁽⁴⁸⁾. Başka bir çalışmada dört testin (DFA, kromatografik influenza A ve B virus immunoassay ve shell vial kültür) performansı değerlendirilmiş ve virus izolasyon yöntemiyle karşılaştırıldığında, DFA için %80, hızlı testler için %70.3 ve shell vial kültür için %98.6 sensitivite oranları tespit edilmiştir ⁽⁴⁹⁾. Birkaç grup tarafından influenza tanısında DFA'nın sensitivitesini arttırmak için modifiye edilmiş sitospin ile güçlendirilmiş DFA kullanılmıştır. Bu yaklaşım, yetersiz smearleri azaltmak ve test sensitivitesi ve spesifitesini arttırmak amacıyla hücre morfolojisini iyileştirmek için bir sitospin protokolü uygulamaktadır. Klinik örneklerde influenza A virusunun tespiti için sitospin DFA testi, hücre kültürüne kıyasla %92.5 (49/53) oranında sensitivite göstermiştir. Tüm dünyada DFA testleri ile klinik tanı laboratuvarında daha hassas ve daha az zahmetli moleküler yaklaşımlar yer değiştirilmektedir.

2.11.3. Serolojik testler

İnfluenza virusuna spesifik antikor yanıtlarını tespit etmek için en sık kullanılan serolojik yöntemler hemaglutinasyon inhibisyon testi, mikronötralizasyon veya virus nötralizasyon testi, single radial hemoliz, kompleman fiksasyon testi, enzim bağlı immünosorbent testi (ELISA) ve Western blot testleridir.

2.11.3.1. Hemaglutinasyon inhibisyon testi

Hemaglutinasyon inhibisyon testi, insanlarda ve diğer hayvan modellerinde doğal enfeksiyon ve aşılamaı takiben serumda influenza virus HA'ya spesifik antikorların varlığını belirlemek için en sık kullanılan yöntemdir. Bu test, HA'ya spesifik antikorların, tavuk, hindi, insan, at veya kobaylardan elde edilen eritrositlere influenza virusunun (yaklaşık olarak dört hemaglutinasyon ünitesi) bağlanmasını önleme, inhibe etme özelliğine dayanmaktadır. Tam hemaglutinasyonu önleyen en

yüksek serum dilüsyonu, serumun hemaglutinasyon inhibisyon testi titresi olarak adlandırılmaktadır. Bu test basit ve ucuz olmasına rağmen avian influenza A viruslarının, özellikle H5N1 alt tipinin tanımlanmasında sensitivitenin zayıf olduğu ve virus tespiti için kullanılabilirliğini sınırladığı gösterilmiştir ^(3,46).

2.11.3.2. Virus nötralizasyon testi

Virus nötralizasyon testi, doğal enfeksiyon veya aşılamaı takiben virusa özgü antikorların indüksiyonunu ölçmek için kullanılan bir başka tekniktir ve mevsimsel veya avian influenza A virus suşlarının antikor titrelerinin tespiti için rutin olarak kullanılmaktadır. Bu yaklaşım virusa özgü antikorların virusu nötralize etme kabiliyetine dayanmakta ve böylece hücrelerin viral enfeksiyonunu önlemektedir. Virus enfeksiyonunun tamamen bloke edildiği en yüksek serum dilüsyonunun karşılığı virusun nötralizasyon titresi olarak düşünülür. Virus nötralizasyon testi hemaglutinasyon inhibisyon testine kıyasla daha duyarlı olmakla birlikte, sertifikalı BSL2+ ve BSL3 laboratuvarlarında bulaşıcı virusların kullanılması gereği sebebiyle rutin tanı uygulamaları için kullanımları sınırlandırılmıştır ^(3,46).

2.11.3.3. Single radial hemoliz testi

Single radial hemoliz testi, doğal enfeksiyon veya aşılamaı takiben antikorların indüksiyonunu belirlemek için yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Antijen-antikor kompleksleri tarafından indüklenen kompleman aracılı hemolizi ölçmek için kullanılmaktadır. Single radial hemoliz yönteminin hemaglutinasyon inhibisyon testinden daha duyarlı olduğu düşünülür ve bu test nonspesifik inhibitörleri inaktive etmek için serumun ön işleme tabi tutulmasını gerektirmez ⁽³⁾.

2.11.3.4. Kompleman fiksasyonu

Bu yöntem, aşılama veya enfeksiyonu takiben influenza virus internal proteinleri NP ve M'ye karşı antikor yanıtlarını ölçmek için kullanılan immün difüzyona dayalı bir yaklaşımdır. Düşük sensitivite sebebiyle, kompleman fiksasyon yerine hemaglutinasyon inhibisyon, virus nötralizasyon ve EIA testleri kullanılmaktadır ⁽³⁾.

2.11.3.5. Enzim bağılı immünosorbent testi

ELISA, solid mikrotitrasyon plate veya kağıt strip formatında mevcuttur. Hızlı testler kağıt ELISA formatına dayanmaktadır. ELISA, ilk olarak 1990'ların başında hastalık teşhisi için kullanılmış ve sürekli olarak yüksek sensitivite ve spesifite göstermiştir. Çeşitli bakteriyel ve viral enfeksiyonların tanısı için birçok FDA onaylı ELISA mevcuttur. ELISA bir süre kullanılmış olmakla birlikte, nükleik asit esaslı testlere kıyasla daha düşük sensitiviteye sahip olması sebebiyle kullanımında bir büyük kısıtlama olmuştur ⁽³⁾.

2.11.4. Hızlı influenza tanı testleri

Hızlı influenza tanı testleri (rapid influenza diagnostic tests; RIDTs), hasta başı test (Point of Care) gibi influenza virus enfeksiyonlarının hızlı tanısı için geliştirilen antijen esaslı testlerdir. Bu testler, viral nükleoproteini hedefleyen monoklonal antikorlar ve enzim immünoassay veya immünokromatografik (lateral flow) teknikleri kullanmaktadır. Dipstick, kaset veya kart formatlarında mevcut RIDTs, sonuçların renk değişimine veya diğer optik sinyallere göre görsel olarak gözlemlenmesi ile 30 dakikadan daha az bir sürede tamamlanabilmektedir. RIDTs, uygulamalarında basitlik ve test sonuçları elde etme hızı sebebiyle influenza enfeksiyonlarının tespitinde yaygın olarak kullanılmaktadır ^(3,50).

Günümüzde piyasada birçok FDA onaylı RIDT bulunmaktadır. Bu testlerin çoğu, influenza A ve B viruslarını tespit edebilir veya ayırt edebilir, sadece influenza A viruslarını veya influenza A ve B viruslarının her ikisini de (ancak influenza A ve B'yi ayırt edemez) tespit edebilmektedir. Bununla birlikte, RIDTs farklı influenza A alt tiplerini ayırt edememektedir. RIDTs performansı, popülasyonda dolaşımdaki influenza viruslarının prevalansına bağlıdır. Pık influenza aktivitesi sırasında pozitif prediktif değerler yüksektir ve bu sebeple yanlış pozitifliklerin olması muhtemel gözükmemektedir. Bununla birlikte, düşük influenza prevalansı sırasında negatif prediktif değerler yüksek ve pozitif prediktif değerler düşüktür. RIDTs genelde mevsimsel influenza virus enfeksiyonlarının saptanması için yüksek spesifite (%95-99) göstermiştir. Mevsimsel influenza enfeksiyonlarının tanısı için RIDTs, standart RT-PCR tabanlı testler ile karşılaştırıldığında %10 ile %70 arasında değişen sensitivite ve %90'a varan spesifite ile değişken test performansı sergilemiştir. RIDTs performansının, muhtemelen daha

yüksek viral yüklerden ve yetişkinlere kıyasla çocuklarda daha uzun süreli viral atılımdan dolayı yetişkinlere oranla çocuklarda daha iyi (yaklaşık %13 daha yüksek) olduğu gösterilmiştir. Ticari 26 RIDTs içeren 159 çalışmanın meta-analizi, influenza enfeksiyonlarının (hem mevsimsel hem de 2009 pandemik H1N1 ifluenza virus enfeksiyonları) tanısı için RT-PCR testlerine kıyasla %62.3 oranında bir sensitivite göstermiştir ⁽⁵¹⁾.

RIDTs'nin 2009 H1N1 pandemisi sırasında, RT-PCR'ye dayalı testler ile karşılaştırıldığında %10-70 arasında değişen sensitivite oranlarına sahip olduğu gözlenmiştir. Bir çalışmada BinaxNOW hızlı antijen tabanlı yöntem (Inverness Medical, Köln, Almanya) kullanılarak Bonn, Almanya'da 144 PCR pozitif klinik örnek test edildiğinde %11.1'lik bir sensitivite oranı bulunmuştur ⁽⁵²⁾. Pandemi sırasında, New York'tan gelen büyük bir araştırma, RIDTs BinaxNOW Influenza A&B testi (BinaxNOW), Rapid Detection Flu A+B test (3MA+B) kullanarak R-Mix kültürü ile karşılaştırıldığında %9.6 ve %40 sensitivite bildirmiştir ^(53,54). Pandemiler sırasında RIDTs'nin düşük sensitivitesi, örneğin kötü kalitesine ve laboratuvar çalışanlarının deneyimsizliğine bağlanabilmektedir. Pandemi 2009 H1N1 ifluenza virusunun tespiti için üç farklı RIDT (BinaxNOW Influenza A&B, Directigen EZ Flu A+B ve QuickVue Influenza A+B) performansını değerlendiren bir CDC çalışması RT-PCR tabanlı teste kıyasla, BinaxNOW Influenza A&B için %40, Directigen EZ Flu A+B için %49 ve QuickVue Influenza A+B için %69 sensitivite oranlarını bildirmiştir ⁽⁵⁵⁾. Yanlış negatif sonuç oranının yüksek olması sebebiyle CDC, doktorlara negatif RIDT sonuçlarına rağmen antiviral tedaviyi bırakmamalarını önermiştir. Başka bir çalışmada QuickVue Influenza RIDT testi (Quidel, San Diego, CA, ABD) bir PCR testine kıyasla %51 sensitivite göstermiştir ⁽⁵⁶⁾. RIDT QuickVue Influenza testi ile RT-PCR tabanlı bir yöntemin karşılaştırıldığı başka bir çalışmada %84 spesifite ve %66 sensitivite oranları bildirilmiştir ⁽⁵⁷⁾. Bu çalışmada pozitif ve negatif prediktif değerler sırasıyla %84 ve %64'tür. RIDTs ve hücre kültürü yaklaşımlarını multipleks solunum yolu viral testi (Luminex xTAG) ile karşılaştıran bir çalışmada, Binax NOW Influenza A+B (Inverness, Scarborough, ME) ve 3M Rapid Detection Flu A+B (3M Medical Diagnostics, St. Paul, MN, ABD) için kombine test sensitivitesinin %17.8 olduğu tespit edilmiştir ⁽⁵⁸⁾. Diğer bir çalışmada 970 küçük çocuğa ait nazofaringeal aspirat incelenmiş ve viral izolasyon yöntemiyle karşılaştırıldığında RIDT, QuickVue Influenza

A+B ICT testi (Quidel Corp., San Diego, CA, ABD) %84.1 sensitivite oranı vermiştir (59).

Avian influenza A viruslarının tespitinde RIDTs, RT-PCR'ye dayalı yaklaşımlara kıyasla daha düşük sensitivite göstermiştir. FDA geçtiğimiz günlerde H5N1 tespiti için Arbor Vita Corporation (Sunnyvale, CA, ABD) tarafından geliştirilen AV Aventure A/H5N1 Flu RIDT'yi onaylamıştır. Bu test, boğaz sürüntülerinden NS1 proteini tespit etmek için monoklonal antikorların kombinasyonunu ve rekombinant proteinleri içeren PDZ (Post sinaptik yoğunluk proteini, PSD95), Drosophila disk büyük tümör baskılayıcı (Drosophila disc large tumor suppressor; Dlg1), Zonula occludens-1 protein (zo-1) alanını kullanmakta ve 45 dakika içinde tamamlanabilmektedir. RIDTs değişken sensitivite göstermiş olmasına rağmen, sonuçları elde etme hızı, test prosedüründe basitlik ve maliyet sebebiyle dünyadaki çoğu klinik viroloji laboratuvarında hala tercih edilen test olmaya devam etmektedir.

2.11.5. Çip üstü laboratuvar teknolojisi

Çok yönlü ve güçlü bir teknoloji olan çip üstü laboratuvar (lab-on-a-chip), yeni nesil hasta başı (Point of Care) influenza testleri geliştirmek için yeni bir yol sağlamaktadır. Çip üstü laboratuvar teknolojisi, kimyasal ve biyolojik uygulamalara odaklanarak, mikroeletromekanik sistem teknolojisinden kaynaklanmaktadır. Bu yöntem yüksek reaksiyon verimliliği, düşük reaktif/enerji tüketimi, düşük atık üretimi ve küçük uygulama alanı gibi birçok avantaja sahiptir. Çip üstü laboratuvar teknolojisi, birden fazla patojeni hedefleyen testleri geliştirmek için kullanılmıştır. İnfluenza testleri ile ilgili olarak Ferguson ve ark.⁽⁶⁰⁾ H1N1 virusunun genetik analizi için tek kullanımlık bir mikroakışkan çip bildirmişlerdir. Bhattacharyya ve Klapperich⁽⁶¹⁾, influenza A H1N1 virusuyla enfekte memeli hücrelerinden viral RNA'yı izole etmek için bir plastik mikroakışkan katı faz ekstraksiyon aygıtı hazırlamışlardır. Cao⁽⁶²⁾ yakın bir raporda üç saatten daha kısa bir sürede klinik örneklerden doğrudan influenza A RNA'sını ekstrakte ve amplifiye edebilen RT-PCR yöntemini ve katı faz ekstraksiyon aşamasının entegre edildiği tek kullanımlık mikroçip tarif etmişlerdir. Domuz kaynaklı influenza virusunun hızlı amplifikasyonu ve tespiti için sürekli akışlı bir mikroakışkan RT-PCR çipi ve tek kullanımlık “disposable electrical printed” çip kullanılmıştır. RT-PCR çip yöntemini kullanarak, sinyaller “disposable electrical printed” çip ile tespit edilmekte ve analiz 15

dakika içinde tamamlanabilmektedir. Küçük tasarımı hepsi bir arada real-time RT-PCR cihazı, 2.5 saat içerisinde otomatik numune hazırlama ve tanı koyma imkanı sağlamak üzere geliştirilmiştir. Mevsimsel influenza A H1N1 tiplemesi ve alt tiplemesi bu sistem kullanılarak gösterilmiştir. İnfluenzanın hasta başı test (Point of Care) ile teşhisi için taşınabilir, kullanıcı dostu bir başka mikroçip nükleik asit esaslı test sistemi, laboratuvarda tezgahüstü kullanıma uyumlu RT-PCR cihazına yakın sensitivite ile rapor edilmiştir. Swine influenza virus tespit etmek için lazer kaynaklı floresan dedektörü ile birleştirilmiş mikroçip elektroforetik immünoassay geliştirilmiştir. Bu sistem, viral partiküllerin hızlı ve eşzamanlı olarak konsantrasyonunu ve bağlanmamış antikordan virus-antikor komplekslerinin daha fazla ayrılmasını sağlamaktadır. Bu influenza testleri çip üstü laboratuvar teknolojisi kullanılarak gerçekleştirilebilmekte ve mikroçip influenza testleri etkileyici sonuçlar vermektedir. Bununla birlikte, yeni çip üstü laboratuvar teknolojisini gerçek hasta başı test (Point of Care) ayarlarına uyarlamak için daha fazla sistem iyileştirmesi ve test doğrulamasında daha fazla çaba gerekmektedir⁽³⁾.

2.11.6. Nükleik asit tabanlı testler

PCR tekniğinin 1983 yılında Kary Mullis tarafından geliştirilmesi bulaşıcı hastalıkların tanısı alanında devrim yaratmıştır. Nükleik asit tabanlı testler, PCR yöntemini temel almakta ve viral antijenler veya antikorlar yerine virus spesifik DNA veya RNA dizileri/genetik materyali tespit etmektedir. Bu testler, antijen esaslı serolojik testlere kıyasla çok daha duyarlıdır ve klinik örneklerde virusları çok daha erken tespit edebilmektedir. İnsanlarda influenza enfeksiyonlarının tespiti için çeşitli nükleik asit tabanlı testler mevcuttur. Bu yöntemler RT-PCR, ligaz zincir reaksiyonu, sekans temelli testler, (pyrosekans, yeni nesil sekans (next generation sequencing; NGS) dahil), DNA mikroarray tabanlı testler, nükleik asit sekans bazlı amplifikasyon (nucleic acid sequencing-based amplification; NASBA), Loop aracılı izotermal DNA amplifikasyon (loop-mediated isothermal amplification-based assay; LAMP), basit amplifikasyon temelli test (simple amplification-based assay; SAMBA), transkripsiyon aracılı amplifikasyon, dizi yer değiştirme amplifikasyonu gibi testlerdir. Antijen esaslı testlere kıyasla daha yüksek sensitivite ve spesifite gösteren bu testlerin çoğunun tamamlanması 2-4 saat sürmektedir. Günümüzde influenza tanısı için 21 FDA lisanslı nükleik asit tabanlı test mevcuttur⁽³⁾.

2.11.6.1. Reverse transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu

RT-PCR, influenza viruslarının tanımlanması için dünyadaki çoğu tanı laboratuvarında kullanılan en geleneksel ve güçlü nükleik asit tabanlı test yaklaşımıdır. İnfluenza tanısı için altın standart kabul edilen RT-PCR, klinik örneklerden viral RNA ekstraksiyonu, reverse transkriptaz enzimi kullanarak viral RNA'nın tek sarmallı komplementer DNA'ya (complementary DNA; cDNA) reverse transkripsiyonu ve işaretli PCR ürünlerinin floresan tespitine bağlı PCR ürününün amplifikasyonu olmak üzere üç önemli adım içermektedir ⁽⁴⁶⁾.

2.11.6.2. Loop-aracılı izotermal amplifikasyon testi

LAMP, influenza virus, HIV, monkeypox virus, newcastle hastalığı virusları, adenovirus, rhinovirus, şiddetli akut solunum yolu sendromu (severe acute respiratory syndrome; SARS) coronavirus gibi bazı virusların saptanması için değerlendirilen DNA loop aracılı izotermal nükleik asit amplifikasyon yaklaşımıdır. Bu yöntem, “high strand displacement” aktivitesine sahip yeni bir DNA polimerazı (veya RNA örnekleri için reverse transkriptaz) ve viral cDNA üzerinde altı farklı bölgeyi tanımak için özel olarak tasarlanmış iki primer seti kullanmaktadır. Hedef genin spesifik amplifikasyonu, SYBR green ilave edildikten sonra renk değişikliğinin izlenmesi ile veya reaksiyon sonunda çözeltide serbest bırakılan magnezyum pirofosfat yan ürününün fotometrik olarak tespit edilmesiyle gerçekleşmektedir. LAMP'ye dayalı yaklaşımlar, klinik örneklerden influenza virus tespiti için RT-PCR tabanlı testlerle kıyaslanabilir sensitivite ile başarıyla uygulanmıştır. Poon ve ark.⁽⁶³⁾ LAMP yaklaşımını kullanarak klinik örneklerden H1N1 ve H3N2 alt tiplerinden mevsimsel influenza A viruslarının saptanması için %100 test sensitivitesi bildirmiştir. Testin analitik sensitivitesi her reaksiyon için 10 kopyadır. Ayrıca, 2009 H1N1 pandemisi sırasında, real-time reverse transkripsiyon LAMP-esaslı test (RT-LAMP), RT-PCR esaslı bir test ile karşılaştırıldığında pandemik virus için %100 spesifite ile %97.8 sensitivite oranları sergilemiştir ⁽⁶⁴⁾. LAMP'ye dayalı testler, RT-PCR esaslı testlerle kıyaslanabilir veya daha yüksek sensitivite ile H5N1, H7N7 ve H7N9 alt tiplerinden yüksek derecede patojen olan avian influenza A viruslarının tespiti için başarıyla değerlendirilmiştir. Parida ve ark.⁽⁶⁵⁾ 2009 pandemik H1N1 virusunun klinik tespiti için HA kodlayan geni hedefleyen bir RT-LAMP analizi geliştirmişlerdir.

ILI olan hastalardan alınan 239 akut faz boğaz sürüntü örneği ile yapılan bir çalışmada RT-LAMP testi WHO onaylı bir RT-PCR testinden daha iyi sonuç vermiştir. WHO onaylı, 0.1 TCID₅₀/mL'lik (tissue culture infective dose 50; doku kültürü infektif doz 50) analitik sensitiviteye sahip RT-PCR yöntemine kıyasla 10 kat daha yüksek sensitivite göstermiştir ⁽³⁾.

2.11.6.3. Basit amplifikasyon temelli test

SAMBA, son zamanlarda HIV ve influenza viruslarının tespiti için geliştirilmiş dipstick izotermal nükleik asit amplifikasyon yaklaşımıdır. Bu yöntem, viral RNA ekstraksiyonu, izotermal DNA polimeraz kullanarak hedef DNA amplifikasyonu ve dipstick tabanlı bir sistem ile amplifikasyon ürününün saptanmasını kapsayan üç aşamalı bir prosedürü içermektedir. SAMBA prosedürünün tamamlanması yaklaşık iki saat sürmektedir. Yöntemin klinik performansı hem mevsimsel hem de avian influenza virusları için değerlendirilmiştir. Wu ve ark.⁽⁶⁶⁾ Birleşik Krallık ve Belçika'da 328 hastadan alınan burun/böğaz ve nazofaringeal sürüntü örneklerinin değerlendirildiği çalışmada RT-PCR testi ile karşılaştırıldığında influenza A ve B virusları için sırasıyla %100 ve %97.9 sensitivite oranları bildirmişlerdir. Bu yöntemi kullanan analitik sensitivite influenza A ve B virusları için sırasıyla, viral genomların 95 ve 85 kopyası olmuştur. Aynı grup bir başka çalışmada, 262 hastaya ait burun/böğaz sürüntü numunesinden ekstrakte edilen RNA örneklerinin testine dayanan RT-PCR tabanlı bir yöntemle karşılaştırıldığında 2009 pandemik H1N1 virusu için %99.4 spesifite ile %95.3'lük sensitivite oranı tespit etmişlerdir ⁽⁶⁷⁾.

2.11.6.4. Nükleik asit sekans bazlı amplifikasyon

NASBA, tek bir reaksiyonda avian miyeloblastoz virus reverse transkriptaz, RNase H ve T7 RNA polimeraz gibi üç enzimin kombinasyonunu kullanan, izotermal PCR'den bağımsız bir amplifikasyon metodudur. NASBA, hem mevsimsel influenza A hem de oldukça patojen olan avian H5N1 ve H7N9 influenza A viruslarının saptanmasında başarıyla değerlendirilmiştir. Moore ve ark.⁽⁶⁸⁾ Çin'de influenza A H5N1 enfeksiyonu tespit edilmiş olgulardan elde edilen 19 klinik örnekte H5N1 enfeksiyonunun değerlendirilmesi için NASBA yöntemini uygulamışlardır. Yöntem, A/VietNam/1194/2004 H5N1 virusu için 0.01 TCID₅₀ analitik sensitivite göstermiş ve

%100 test sensitivitesi sergilemiştir. Başka bir çalışmada, Ge ve ark.⁽⁶⁹⁾ yeni domuz kökenli 2009 pandemik H1N1 virusunun hızlı tespiti için NASBA kullanmışlardır. Bu çalışmada NASBA, ticari bir domuz kökenli influenza A virus (S-OIV) (H1N1) real-time RT-PCR kiti ve CDC TaqMan testi ile karşılaştırılabilir veya daha yüksek olan, reaksiyon başına yaklaşık 50 kopya test sensitivitesi göstermiştir. Son zamanlarda, Wang ve ark.⁽⁷⁰⁾ mevsimsel H1N1 ve H3N2 ve 2009 pandemik H1N1 viruslarının tespiti için RNA hedeflerini veya SMART'ı (Simple Method for Amplifying RNA Targets) amplifiye etmek için basit bir yöntem olarak bahsedilen, değiştirilmiş bir NASBA prosedürü geliştirmişlerdir. Bu izotermal amplifikasyon yaklaşımında, spesifik viral RNA sekanslarını yakalamak için haberci moleküller olarak görev yapacak tek sarmallı DNA problemleri kullanılmıştır ki bu viral RNA sekansları daha sonra sıfır akış şartları altında bir mikroakışkan çip üzerinde ayrılır. SMART testi, influenza A viruslarının tespiti için %98.3'lük test sensitivitesi ve %95.7'lik spesifite ile 10⁵ viral RNA kopya/mL kadar analitik sensitivite göstermiştir ⁽³⁾.

2.11.6.5. Mikroarray tabanlı yaklaşımlar

Mikroarray temelli yaklaşımların influenza virusların tespiti ve alt tiplmesi için yararlı olduğu kanıtlanmıştır. Örneğin, düşük yoğunluklu DNA mikroarray olan FluChip mikroarrayin birkaç saat içinde H1N1, H3N2 ve H5N1 suşlarını tespit ettiği gösterilmiştir. Benzer şekilde MChip mikroarray, influenza A virus tanımlamak için %95 sensitivite ve %92 spesifite göstermiştir. CombiMatrix Corporation (Irvine, CA, ABD) tarafından geliştirilen yarı iletken tabanlı bir influenza A mikroarrayin bilinen tüm influenza A alt tiplerini beş saatten kısa bir sürede tespit ettiği gösterilmiştir. HA geninin bölünme bölgesi için 97 prob ve M için kodlanan korunan gen için bir prob kullanan düşük yoğunluklu mikroarray NanoChip 400 sisteminin (Nanogen Inc., San Diego, CA, ABD) H5N1 virus tanısı için yararlı bir test olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, bu mikroarray bazlı analizlerin tümü, hibridizasyon öncesinde influenza RNA'sının iki veya daha fazla enzimatik amplifikasyon adımını içermektedir. Buna ek olarak tespit, çoklu problemlerin etiketlenmesini veya RT-PCR ile üretilen çift sarmallı DNA'ya floresan boya veya biyotinle konjuge edilmiş nükleotidlerin eklenmesini gerektirmektedir. Ayrıca, konvansiyonel mikroarray analizlerin çoğunun sensitivitelerinin, hem amplikonların ve problemlerin hibridizasyonuna hem de hedef

amplifikasyon verimliliğine dayandığı gösterilmiştir. Bu testlerde yer alan çoklu adımlar bu yöntemleri karmaşık, pahalı, yoğun emekli ve kontaminasyona duyarlı yapmakta ayrıca gen mutasyonlarının, PCR inhibitörlerinin ve RNA degradasyonunun varlığı sebebiyle yanlış negatif sonuçlara eğilimli hale getirmektedir. Çoklu, virusa özgü primer setleri ve test optimizasyon prosedürlerinin tasarımı çeşitli zorluklar ortaya koymaktadır^(3,71).

Çoğu mikroarray testte yaygın olarak kullanılan, floresan boyalarla karşılaştırıldığında daha iyi sensitiviteye sahip olmaları sebebiyle tanı uygulamaları için gümüş boyama ile birleştirilmiş nanopartiküllerin kullanımına yıllar geçtikçe ilgi artmaktadır. Bu modifiye yaklaşım, hedef kalıbın amplifikasyonuna ihtiyaç duymadan insan genomik DNA örneklerinde tek nükleotid polimorfizmlerin hızlı tespit edilmesini sağlamaktadır. Nanomikroarray sistemi, yüksek oranda hibridizasyon etkinliği ve test spesifitesine sahiptir. Bu yöntem basittir ve influenza A ve B viruslarının M, HA ve NA kodlayan genlerin tamamen bütün genomundan korunan bölgelerin hedeflenmesi için özel olarak tasarlanmış çoklu oligonükleotidler kullanılmaktadır. Bu yaklaşımda, viral RNA'nın çoklu yakalama, hedef veya ara oligonükleotidlere bağlanması sağlanmakta ve özel altın nanopartiküllerine hibridize edilmektedir. Bu multipleks oligonükleotit tabanlı yaklaşım, genetik çeşitlilik geçirmiş yeni ortaya çıkan suşların saptanmasına olanak sağlamaktadır. Nanomikroarray testi, influenza A ve B viruslarını tespit etmek ve ayrıca farklı influenza A virus suşlarını (H5N1 ve 2009 pandemik H1N1 virus) mevsimsel influenzadan ayırt etmek için kullanılabilir. Aynı zamanda, her bir slide için birden fazla örnek ile tek bir testte influenza A viruslarının alt tiplerini aynı anda tespit edebilmektedir. Nanomikroarray'in analitik sensitivitesi, saflaştırılmış PCR fragmanı ve H5N1 viral RNA için 1×10^3 TCID₅₀ birimleri kullanılarak <100 fM'dir. Nanomikroarray görüntüleri ileri analiz için taranabilmekte ve çıplak gözle spesifik yoğunluk paterni olarak görülen sonuçlardan virus kimliğine ilişkin sonuçlar çıkarılabilmektedir. Bir sonraki nesil sekans analizi ile kombinasyon halinde bu test, amplifikasyon sayısını büyük ölçüde azaltan, fragman ayırma ve saflaştırmayı ortadan kaldıran minimal manipüle bir prosedürdür. Dolayısıyla, nihai laboratuvar onayı elde etmek için geniş skalada influenza virus taraması ve tanımlanması zaman ve emek verimliliği bakımından uygundur. Yeni influenza tespit algoritması, klinik örneklerde HPAI suşunu belirlemek için küçük bir test seti veya tek bir test seçerek bilinmeyen

influenza suşlarının enfeksiyon risklerinin tanımlanmasında ayırıcı tanının hassaslaştırılması için yeni bir yol temin etmektedir. Bu yöntem, mevsimsel epidemi veya pandemiler sırasında doğru teşhis ve hızlı identifikasyon için yeni bir araç sağlamaktadır^(3,72).

2.11.7. Nükleik asit sekans yaklaşımları

2.11.7.1. Sanger sekanslama

Dideoksi prosedürü olarak da anılan Sanger dizi analizi yöntemi, DNA sekansının bir zincir sonlandırma metodudur. Fredrick Sanger ve ark. tarafından 1970'lerin sonlarında geliştirilen bu yöntemde DNA polimeraz, bir çift DNA primeri, etiketsiz deoksiniükleotit trifosfatlar (dNTP'ler) ve her bazın benzersiz bir floresan ile etiketlendiği zincir sonlandırma dideoksiniükleotidler (di-ddNTP'ler) kullanılmaktadır. Burada, di-ddNTP'lerin DNA polimeraz tarafından yeni sentezlenmiş bir sarmal içine seçici olarak dahil edilmesi dizi sonunda floresanla etiketlenmiş ddNTP ihtiva eden çeşitli büyüklükte DNA fragmanları ile sonuçlanan hedef DNA'nın daha da uzamasını önleyen daha sonraki dNTP'lerin ilavesini inhibe etmektedir. DNA dizisi, daha sonra sekans reaksiyonundan gelen DNA fragmanlarının büyüklüğüne göre belirlenmektedir. Bu sekans yaklaşımı, reaksiyon başına 1000 bp DNA sekansı okuması sağlayabilmektedir. Sanger dizi analizi yöntemi, influenza viruslarının tüm genom sekansı için yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, dolaşan influenza virusları arasında antiviral direncin saptanması için de tercih edilmiştir⁽³⁾.

2.11.7.2. Yeni nesil sekans

NGS hızla genişleyen bir teknolojidir ve teknikler potansiyel olarak yaşam bilimi, tıp ve ilgili alanlarda çok büyük etkiler yaratabilmektedir. NGS, Sanger dizi analizi yöntemi ile karşılaştırıldığında sekans hızı ve veriminde belirgin ilerlemeler sağlamaktadır. Bu yöntemin otomatize iş akışını düzene koyması örnek hazırlamayı büyük ölçüde basitleştirmektedir. NGS, örneklerden ekstrakte edilen nükleik asit fragmanlarını doğrudan analiz etmesi sebebiyle Sanger sekansında zorunlu olan kompleks ve zaman alıcı vektör klonlamasını ortadan kaldırmaktadır. Sekans maliyeti NGS'nin ek bir üstünlüğüdür. Sanger dizi analizi ile insan boyutunda bir genomun

sekansı için yapılan harcama 2001'de 100 milyon dolardan 2014 yılında yaklaşık 5000 dolara düşmüş ve yakın gelecekte daha da azalması beklenmektedir. Son yıllarda NGS tekniklerine dayanan birçok uygulama ortaya çıkmıştır.

NGS teknolojisi, farklı sekans stratejileri, reaktifler ve biyoenformatik yazılımları kullanan, üreticiye özgü birkaç platformdan oluşmaktadır. Roche 454 Life Sciences (Branford, CT, ABD), uzayan başlangıç DNA dizisine dNTP'lerin eklenmesinin ardından pirofosfatın gerçek zamanlı salınımını izleyen, yüksek verimli bir sentez ile sekans biyoluminesans yöntemi olan pyrosekansa dayanan NGS platformları geliştirmiştir. Bu sekans platformu, influenza araştırmasında öncelikle dolaşan influenza A virusları arasındaki ilaç direncinin moleküler belirteçlerinin belirlenmesi için çeşitli gruplar tarafından tanınan bir araç olarak değerlendirilmiştir. Bu yöntemi ilk kez, 1994-2005 yılları arasında dünya genelinde izole edilen altı tip H1N1, H1N2 ve H3N2'den mevsimsel influenza A virusları arasındaki adamantine direncin insidansını incelemek amacıyla Bright ve ark.⁽⁷³⁾ kullanmışlardır. Gözlemin on yılı boyunca ilaç direncinde belirgin bir artış görülürken, 1994-1995 yılları arasındaki %0.4'lük oran, 2003-2004 yılları arasında %12.3'e yükselmiştir. Bu çalışma, dolaşan mevsimsel influenza virus suşları arasında antiviral direnç için hızlı taramanın klinik önemini vurgulamıştır. O zamandan beri birkaç grup, mevsimsel ve yüksek patojenik H5N1 avian influenza virusları arasında sırasıyla adamantanlar amantadin ve rimantadin ve oseltamavir karşı dirençten sorumlu M2 ve NA kodlayan genlerdeki mutasyonların saptanması için pyrosekans platformunu başarıyla uygulamışlardır. Pyrosekans, HA için gen kodlamasındaki tek nükleotid polimorfizmleri tanımlamak amacıyla birkaç grup tarafından da kullanılmıştır. Levine ve ark.⁽⁷⁴⁾ insanlarda artmış virulans ile ilişkili olduğu bilinen HA'nın aminoasit pozisyon 222'sinde 2009 pandemik H1N1 virus varyantlarının saptanması için özelleştirilmiş bir pyrosekans protokolü ile çalışmışlardır. Daha yakınlarda Lee ve ark.⁽⁷⁵⁾ oseltamivir ile tedavi edilen influenza A/H3N2 virusu ile enfekte immüno-kompromize bir çocukta HA ve NA kodlayan genlerdeki G186D ve R292K mutasyonlarını belirlemek için pyrosekans yöntemini uygulamışlardır. Ekim 2016'da 454 Yaşam Bilimleri'nin (454 Life Sciences) kapatılmasının ardından Roche 454 NGS araçları kullanımdan kalkmıştır.

Illumina NGS platformları köprü amplifikasyonu veya katı substrat üzerinde nükleik asit fragmanlarının amplifikasyonuna dayalı farklı "sequencing-by-synthesis"

yaklaşımları kullanmaktadır. Rutvisuttinunt ve ark.⁽⁷⁶⁾ Illumina MiSeq sequencer (San Diego, CA, ABD) ile influenza virus izolatlarından eksiksiz genom dizisi bilgisi edinmiş ve mevsimsel influenza A H3N2, 2009 pandemik H1N1 virus ve influenza B viruslarını eşzamanlı olarak tanımlamışlardır. Ren ve ark.⁽⁷⁷⁾ virus kültürü olmaksızın yakın zamanda ortaya çıkan influenza A H7N9 suşunun tam genom sekansını yapmak için Illumina/Solexa GAI sequencer kullanmışlardır. Kuroda ve ark.⁽⁷⁸⁾ 2009 pandemik H1N1 virus ile enfekte hastanın otopsi akciğerinden ekstrakte edilen RNA'nın Illumina GAI sequencer kullanarak dizi analizini yapmışlardır. *De novo* düzeneği uygulamışlar ve *Streptococcus pneumonia* gibi bakterilerin sebep olduğu olası koenfeksiyonları tespit etmişlerdir. Greninger ve ark.⁽⁷⁹⁾ birçok örneğin incelenmesinde (metagenomik strateji) hem ViroChip microarray ve hem de Illumina NGS tekniklerini çalışmışlardır. NGS derin sekans tekniği, virus enfeksiyonuna yanıt olarak üst solunum yolu mikrobiyotası ve konak gen ekspresyonuna ilişkin derinlemesine bilgi sağlarken ViroChip microarray kullanımının influenza 2009 pandemik H1N1 virusun önceden bir bilgi olmadan doğru tespit edilmesine izin verdiğini göstermişlerdir. Whitehead ve ark.⁽⁸⁰⁾ derin sekanslama yoluyla kapsamlı dizi fonksiyon haritası elde etmek için Illumina NGS platformundan yararlanmışlar ve NGS verilerine dayanarak influenza bağlayıcı proteinleri optimize etmişlerdir. Bu yaklaşımın önceden var olan ilaçların bilişimsel tasarımı ile kombinasyonunun yeni influenza inhibitörlerini daha verimli bir şekilde geliştirmek için yeni bir yol açabileceği düşünülmektedir.

Life Technologies/Applied Biosystem's Ion personal genome machine (PGM), Ion Proton and SOLiD NGS platformları, Pacific Biosciences' PACBIO RS/RSII single-molecule ve real-time sekans platformları da dahil olmak üzere influenza tanısı için uygun olabilecek Roche 454 ve Illumina MiSeq platformlarının yanı sıra birkaç alternatif NGS platformu bulunmaktadır. Temel özel sekans teknikleri oldukça farklı olduğu için her platform kendi avantaj ve dezavantajlarına sahiptir. Bu sebeple verimlilik, okuma uzunluğu, hata oranı ve maliyet gibi faktörlere dayalı olarak spesifik ihtiyaçları karşılamada en uygun NGS platformlarını seçmek araştırmacılar için çok önemlidir. Quail ve ark.⁽⁸¹⁾ tarafından yakın zamanda bildirilen karşılaştırma çalışması bazı uygun NGS platform seçim kriterleri sağlayabilir. Ion PGM, PACBIO RS ve Illumina's MiSeq olmak üzere üç platform, ortalama GC içeriği %19.3 ile %67.7 arasında değişen dört mikrobiyal genom sekansı için uygulanmıştır. Karşılaştırmada,

içerik dağılımı, sapma, GC dağılımı, varyant tespiti ve doğruluk değer şekilleri olarak kullanılmıştır. Araştırmacılar üç platformun da GC bakımından zengin, nötr ve orta derecede AT açısından zengin genomlarla ilgili %100'e yakın bir içerik sağladığı sonucuna varmışlardır. Bununla birlikte, PGM'de *Plasmodium falciparum*'un AT bakımından son derece zengin genomunun sekansında sistematik sapma gözlenmiştir. İçeriğe özgü hatalar PACBIO RS'nin değil ancak hem Ion PGM hem de MiSeq verilerinde tanımlanmıştır. Buna ek olarak, PACBIO RS'nin büyük ölçekli sekansta kullanımının önüne geçen, sınırlı verim ve baz başına yüksek maliyeti vardır. Ion PGM ve MiSeq, iş akışında kolaylık ve yararlılık açısından eşdeğerdir. Bilinen ve yeni ortaya çıkan bir influenza enfeksiyonundan tipik bir genetik matriks kompozisyonu belirlenebilmektedir. NGS tabanlı testlerin geliştirilmesi, halk sağlığı surveyansı için gelecekteki NGS tanı platformunun kullanılmasını kolaylaştıracak olan yeni verimlilik ve yenilik seviyelerini ortaya çıkarmak için yardımcı olacaktır ⁽³⁾.

2.12. Aşı

Ciddi influenza enfeksiyonlarının etkin ve zamanında tedavisinde engeller göz önüne alındığında koruyucu aşılama, influenza morbiditesini ve sosyoekonomik yükü azaltmak için önemli bir araçtır. İnfluenza virus aşısı için ulusal klavuzlar değişiklik gösterse de, aşılama genellikle sadece daha önceden ek tanısı veya yüksek maruz kalma riski olan yüksek riskli hastalar için değil aynı zamanda tüm popülasyonda, (6 aylık veya daha büyük) enfeksiyonun bireysel riskini sınırlamak, toplum bağışıklığını artırmak ve reassortment olasılığını azaltmak için de tavsiye edilmektedir ⁽⁶⁾.

Bağışıklama Uygulamaları Danışma Komitesi ve Amerikan Pediatri Akademisi, malignite tedavisi gören çocuklar için influenza aşılmasını sürekli tavsiye etse de, onkologlar tarafından bu tavsiye geleneksel olarak pek az kabul görmüştür. Genel hümmoral immünite tehlikeye atılmış olmasına rağmen, aşı cevapları hala ortaya çıkmaktadır ve aşılama kritik bir stratejidir. Birçok hastane şu anda, kemoterapi alan çocuklar arasındaki genel aşılama oranlarının iyileştirilmesi beklenen yüksek riskli popülasyonlarda influenza aşı oranlarını kalite ölçüsü olarak içermektedir ⁽⁵⁾.

İnfluenza virus suşları mevsimler arasında kademeli olarak değiştiğçe aşı kompozisyonu, bütün dünyada farklı bölgelerde ortaya çıkan ve dolaşan influenza viruslarını izleyen WHO'nun önerileri üzerine yıllık olarak güncellenmektedir.

Global Influenza Sürveyans ve Yanıt Sistemi (Global Influenza Surveillance and Response System; GISRS) olarak bilinen WHO tarafından kurulan influenza ağı, influenzayı küresel olarak izleyen 120'den fazla ulusal laboratuvarıdan oluşmaktadır. Kuzey ve Güney Yarım Küreler'e aşı içeriği hakkında tavsiyelerde bulunmak için insan serumundaki antikor seviyelerine dayanan antijenik analiz, dizi analizi ve popülasyon duyarlılığı kullanılmaktadır.

Aşının üretilmesinden 6-8 ay önce aşı suşları üzerine tavsiyeler yapılmalıdır, nitekim baskın suş, antijenik drift sebebiyle ara dönemde değişebilmektedir. WHO, baskın sirkülasyon suşunu tahmin eden dikkate değer 45 yıllık başarı kaydına sahiptir. Yalnızca iki durumda önerilen suş, ortaya çıkan suşla eşleşmemiştir. H3N2 alt türü için 1997-1998'de tavsiye edilen aşı suşu A/Wuhan/359/1995-like (H3N2) virustu, ancak Amerika Birleşik Devletleri üreticileri bunun yerine yüksek verimli üreme özellikleri sebebiyle A/Nanchang/933/1995 (H3N2) virusu kullanmayı tercih etmişlerdir. Antijenik drift ile A/Sydney/5/1997 (H3N2) ortaya çıkmış ve aşılanmış kişilerin enfeksiyonuna sebep olmuştur. A/Panama/2007/1999 (H3N2) virusu 2003-2004'te önerilen aşı suşudur, ancak A/Fujian/411/2002 (H3N2) baskın hale gelmiştir^(10,82).

Günümüzde onaylanmış aşılar, yumurta veya hücre kültüründe üretilen, kas içine uygulanan inaktive alt birim aşılar veya Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa'daki çocuklarda intranasal uygulama için kullanılan canlı, zayıflatılmış influenza viruslarına dayalı aşılardır. İnaktive edilmiş trivalan veya kuadrivalan aşı preparasyonları, sırasıyla iki influenza A virus suşunun (güncel olarak pandemik H1N1'in soyu ve dolaşımdaki bir H3N2 suşu) ve bir veya iki influenza B virus suşunun (Yamagata ve Victoria hattı) antijenlerini içermekte ve esas olarak bir immünoglobulin (Ig) G serum yanıtını tetiklemektedir. Bu IgG aracılı koruma, özellikle aşılama için kullanılan antijenler ile bunların mevcut dolaşımdaki mevsimsel influenza suşları arasında güçlü ayrım bulunduğu durumlarda, tahminler suboptimal olduğu zaman yetersiz olabilmektedir. Etkinliğin azaltılmasını en aza indirmek için çeşitli suşlara karşı çapraz koruma sağlayan aşılarda geliştirilmesine yönelik çalışmalar yapılmaktadır ve antikorlar virusun korunan HA kök bölgesine karşı gelişir. Canlı, attenüe aşı suşları genellikle bir H2N2 omurgası ve WHO tarafından önerilen 25°C'de üremeye adapte yüzey proteini ekspresyonu yapabilen ve dolaşımdaki HA ve NA genetik bilgilerini taşıyan suşlarla reassorte edilerek üretilir, böylece insanlardaki yayılım

sınırlanmaktadır. Hafıza T-hücreleri yanı sıra IgG ve IgA üretimi de dahil olmak üzere daha güçlü bir bağışıklık tepkisi ortaya çıkarılır, ancak sirküle eden virus suşları için muhtemel bir reassortment platformu ve zayıflatılmamış bir forma dönüşme olasılığı taşıdıkları için daha az güvenli sayılmaktadırlar. Bu sebeple canlı, attenüe aşılardan güvenliğini artırmak için örneğin, kesilmiş bir NS1 proteini silinerek veya eklenerek antiviral IFN cevabını engelleyemeyen mühendislik varyantları kullanılarak aşılardan yapılmaktadır ^(6,83).

İnfluenza aşısına verilen serolojik yanıtlar, 1970'lerde yapılan iki çalışmadan başlayarak şimdiye kadarki tüm çalışmalarda tanımlanmıştır. Serolojik yanıtların kritik bir önlem olmasına rağmen, immünkompromize popülasyonda hangi antikor seviyesinin koruyucu olduğunun göz önüne alınması gerektiği konusunda herhangi bir görüş birliği bulunmamaktadır. Sağlıklı genç yetişkinlerin çoğunda 1:40 hemaglutinasyon inhibisyon titreleri koruma sağlamaktadır. Bununla birlikte, pediatrik onkoloji hastalarında aşı etkinliği üzerine yapılan bir çalışmada, mevcut titreleri 1:320 olan bireylerde bulaşıcı enfeksiyon bulgusu ortaya çıkmıştır. Çalışma popülasyonunda evrensel aşılama rağmen serolojik konversiyon araştırılarak %15'lik enfeksiyon oranı bulunmuştur. Pozitif PCR testi ikinci bir tanı stratejisi olarak kullanıldığında enfeksiyon oranı yaklaşık %8 tespit edilmiştir ⁽⁸⁴⁾. Bu çalışmalar aşılamanın, yüksek koruma oranına sahip olduğunu göstermekte, ancak yönetimin daha da optimize edilmesine hala ihtiyaç duyulduğunu ortaya koymaktadır.

Kemoterapi alan çocuklarda influenza aşısı etkinliği ile ilgili birincil verileri içeren, 1990 yılından beri yapılan çalışmalar genelde malignite türleri, hasta yaşı ve kemoterapi evresi veya süresi açısından heterojen olan hasta popülasyonlarını kapsamaktadır ve genellikle hepsi aynı sonuca ulaşmıştır. Yanıtların büyüklüğü genellikle sağlıklı kontrollerden daha düşük olmasına rağmen neredeyse tüm çalışmalarda, hastaların genellikle bir yanıt oluşturabildikleri bulunmuştur. Birincil verilere ilişkin iki derleme, kemoterapi sırasında aşılamanın genel olarak tavsiye edilmesine sebep olmuştur. Bu çalışmalarda hastaların %30-70 anti-influenza antikor oranlarına sahip oldukları bulunmuştur (en az 1:32 veya 1:40 titreler). Hastalarda %30-80 (dört kat artış) serokonversiyon oranları görülmüştür.

Kemoterapi tipinin ve evresinin aşı yanıtını etkileyebildiği düşünülmektedir. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, tümör tipleri arasındaki yanıtlar doğrudan

karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada, akut miyeloid lösemi (AML) olan kişilerin aşırı son derece sınırlı serolojik yanıtlarının bulunduğu belirlenmiştir. Şaşırtıcı bir şekilde ALL hastaları tedavi protokolünün başında en iyi serolojik yanıtı göstermişlerdir ⁽⁸⁴⁾. Solid tümörlü çocuklarda yanıtlar sınırlı olmuş, ancak kemoterapide toplam süreye göre değişiklik görülmemiştir. Uygun strateji, aşı mevcut olduğu anda kanserli çocukları en kısa zamanda aşılamaştır. Kanıtlar, aynı zamanda çoklu aşı dozlarının verilmesini de desteklemektedir. Çocuklarda çalışmalar sınırlı olmakla birlikte, diğer aşamalarında aşı serolojik yanıtlarını artırdığı gösterilmiştir.

2.13. İnfluenza virus enfeksiyonunun tedavisi

Antiviral ilaçlar hem terapötik hem de profilaktik etkilere sahip olabilmektedir, ancak hastalığı önlemek için yüksek influenza etkinliklerinde sürekli uygulanmalıdır. M2 iyon kanal blokerleri (amantadin ve rimantadin) influenza A viruslarına karşı etkilidir, ancak dirençli viral suşlar hızla gelişmekte ve tedavi edilen hastaların yaklaşık üçte birinde tanınmaktadır. Daha yeni geliştirilen NA inhibitörleri zanamivir ve oseltamivir hem influenza A hem de B viruslarına karşı etkilidir. Her iki ilaç sınıfı profilaktik uygulandığında influenzanın önlenmesinde etkilidir ^(2,8).

Antiviral ilaçlarla tedavinin ateş süresini kısalttığı, influenzadan kaynaklanan komplikasyon riskini azalttığı ve hastanede kalış süresini genel popülasyonda kısalttığı gösterilmiştir.

İnfluenza virus enfeksiyonunun tedavisinde karşılaşılan en büyük zorluk, influenzaya spesifik antiviral tedavinin en fazla hastalığın başında etkili olması sebebiyle erken tespittir. İlk belirtiler influenza A virusa spesifik olmayıp, genel olarak solunum yolu viral enfeksiyonuna bağlı olduğundan, antiviral tedavinin hızlı başlangıcı ve diğer sebeplerden hızlı bir ayırım yapmaya olanak sağlamak için özellikle influenza mevsiminde PCR temelli tanı testleri ile birlikte hızlı ELISA'ya dayalı antijen testleri önerilmektedir. Bununla birlikte, WHO kılavuzları gecikmiş laboratuvar test sonuçlarını beklemeden influenzaya karşı başlangıç tedavisini önermektedir.

Hastaneye yatırılmış, ciddi veya ilerleyici hastalığı olan, komplikasyonlar açısından yüksek risk altında ve onaylanmış veya şüpheli influenza enfeksiyonu olan hastalar için erken tedavi (ideal olarak 48 saat içinde) tavsiye edilmektedir. Komplikasyon riski yüksek olan hastaların tedavisi için hastalığın laboratuvar onayı

beklenmemelidir. Hastalar, 2'den küçük yaş, kronik bakım servisinde yatma, immünsüpresif ilaçlar, insan immün yetmezlik virusu ve pulmoner, kardiyovasküler, renal, hepatik, hematolojik, nörolojik ve metabolik hastalıklar dahil olmak üzere kronik hastalıklar, diyabet, mental retardasyon veya ciddi gelişimsel gecikme, kas distrofisi ve omurilik yaralanması gibi morbidite riskini daha da artırabilecek birçok risk faktörüne sahip olabilmektedir ⁽⁶⁾.

Birkaç çalışma, spesifik olarak kanser tedavisi gören veya kemik iliği transplantasyonundan sonra hastalarda influenza tedavisi için antiviral tedavinin etkisini değerlendirmiştir. Bir çalışma, 2009 pandemik influenzanın bulunduğu kemik iliği transplantasyon hastalarında semptomların kaybolmasından sonra uzamış viral dökülmenin (medyan 46 gün) olduğunu göstermiş ve daha uzun süre tedavi, viral dökülme süresinin kısaltılmasıyla korele olmuştur ⁽⁸⁵⁾. Ardışık 12 influenza mevsiminde 62 hastanın dahil olduğu başka bir çalışmada, erken antiviral tedavinin pnömoni progresyonunun ve viral dökülmenin azalmasına katkıda bulunduğu önerilmiştir ⁽⁸⁶⁾. Transplantasyondan sonra hastalar daha erken enfekte olursa pnömoni gelişme olasılığı daha yüksektir. Semptomların ortaya çıktığı 2 gün içerisinde oseltamivir alan başka bir kemik iliği transplantasyon hastası çalışmasında sadece %5 oranında pnömoni gelişmiş ve influenza kaynaklı ölüm olmamıştır ⁽⁸⁷⁾.

Kemik iliği transplantasyonu olmayan hastalar için erken antiviral tedavinin avantajları sağlıklı çocuklarda görülen avantajlara benzerlik gösterir. Oseltamivir ile tedavi edilen hastalarda solunum yolu hastalıkları (pnömoni hariç), otitis media ve hospitalizasyon riski önemli oranda azalmıştır. Tedavideki gecikmeler, bu popülasyonda mortaliteye ve alt solunum yolu enfeksiyonuna (ASYE) artmış progresyon ile ilişkilidir.

Antiviraller için tamamlayıcı, destekleyici tedavi gereklidir. Bu önlemler ARDS için standart bakım içermektedir ve sistemik kortikosteroid tedavisi gibi anti-inflamatuar stratejiler ile tedavinin bugüne kadar önerilmediği halde, ekstrakorporal membran oksijenasyon protokollerinin yararlı olduğu bulunmuştur. Bakteriyel enfeksiyonlar hastalığın ciddiyetini arttıran ve sonucu kötüleştiren önemli bir komplikasyon oluşturduğundan, influenzaya bağlı ARDS'li hastalar ampirik antibiyotik tedavisine mümkün olduğunca erken başlamaları için dikkatle izlenmelidir. Jain ve ark. ⁽⁸⁸⁾ göğüs radyografisinde akciğer infiltrasyonları ve influenza şüphesiyle hastaneye

yatırılan hastaların hem antibiyotikler hem de influenza antiviral ajanları ile erken ve agresif tedavi almaları gerektiğini önermiştir.

2.13.1. İnfluenza virusuna karşı antiviral ilaçlar

2.13.1.1. M2 inhibitörleri

Amantadin ve rimantadin influenza antiviral ajanlarının ilk kuşağıdır. Amantadin (1-aminoadamantan), hidrokarbon trisiklo [3.3.1.1.3,7] dekanın bir türevidir. Amantadin, hidroklorid türevi (Symmetrel) 100 mg tablet veya şurup olarak veya etkin türevi rimantadin (α -metil-1-adamantanmetilamin hidroklorid, Flumadin) olarak kullanılabilir. Yüksek konsantrasyonlarda amantadin ve rimantadin, hücresel endozomlardaki pH'ı nonspesifik olarak yükselterek, viral HA'da asit tarafından uyarılan konformasyonel değişikliği inhibe etmekte veya geciktirmektedir. Düşük konsantrasyonlarda amantadin ve rimantadin, M2 proteininin iyon-kanal aktivitesini spesifik olarak inhibe etmektedir.

Rimantadin düşük advers ilaç reaksiyon oranları ile karakterizedir ve amantadine kıyasla çocuklar ve yaşlılar tarafından daha iyi tolere edilmektedir ^(1,6,8).

Amantadin veya rimantadin ile tedavi direnç yüzünden önerilmemektedir. Ne yazık ki M2 inhibitörlerinin kullanımı, “pore-facing” kalıntıların (V27A, A30T, S31N, G43E) mutasyonları, kanalın N-terminal yarısında bulunan birbirine yakın interhelikal rezidülerin (L26F) mutasyonları ve kanalın C-terminal yarısında uzak olarak konumlanmış uzak interhelikal rezidülerin (L38F) mutasyonları gibi ilaca dirençli influenza virus tiplerinin ortaya çıkması ile sınırlandırılmıştır.

2.13.1.2. NA inhibitörleri

Hafif ve ciddi influenza A ve B virusu enfeksiyonları için birincil antiviral ve ampirik tedavi, tüm yüksek riskli (immüsupresif, ağır ek hastalıklar, altta yatan kronik akciğer hastalığı, yaş <2 veya >65 yaş, morbid obezite, bakım evi sakinleri, gebe veya doğum sonrası kadınlar) ve ağır solunum yolu hastalığı bulguları olan hastalarda WHO tarafından tavsiye edilen mümkün olduğunca NA inhibitörlerinin erken uygulanmasıdır. FDA tarafından onaylı NA inhibitörleri olan oseltamivir ve zanamivir influenza kemoprofilaksisi veya tedavisinde influenza A, influenza B ve 2009 pandemik influenza

virusa karşı aktivite göstermektedir. Oseltamivir, 2 haftadan büyük hastalarda onaylanırken zanamivir ise 5 yaşından büyük çocuklarda kemoprofilaksi ve 7 yaşından büyük çocuklarda tedavi için onay almıştır ⁽⁸⁹⁾.

Kimyasal açıdan NA inhibitörleri, sialik asit türevleri (veya 5,6-dihidro-4H-piran türevleri), benzoik asit türevleri, siklohekzen türevleri, siklopentan türevleri, pirolidin türevleri ve doğal ürünler olarak sınıflandırılabilir.

Oseltamivir ile aynı olan zanamivir (4-guanidino-Neu5Ac2en veya 4-GU-DANA) etki mekanizması, molekülün sialik asidi taklit ettiği gerçeğiyle karakterize edilir, böylece asit ile rekabete girer ve viral NA moleküllerini geri dönüşümlü olarak bağlar. Oseltamivir (GS4104), oral yoldan verildikten sonra yüksek biyoyararlanım (%80) konsantrasyonuna sahip olacak şekilde tasarlanmışken zanamivir, solunum yollarında lokal olarak konsantre olacak şekilde tasarlanmıştır. Oseltamivir gastrointestinal sistemden çok iyi absorbe edilir ve hızla karaciğerde hepatik karboksil-esteraz 1 ile etkin oseltamivir karboksilat (GS4071) ([3R, 4R, 5S]-4-asetamido-5-amino-3-(1-etilpropoksi)-1-sikloheksen-1-karboksilat fosfat) metabolize olur. Aktif metabolit üst ve alt solunum yolu, orta kulak, trakea, burun mukozası ve akciğerler dahil olmak üzere vücuda dağıtılır. Plazma yarılanma ömrü, karboksilat formu için 6-10 saat olmak üzere 1-2 ila 3-4 saat arasında değişmektedir. Oseltamivir yaygın (%95'den fazla) olarak metabolize olmaktadır ⁽¹⁾.

Oseltamivir ve zanamivir, klinik profil bakımından karşılaştırılabilir ve adamantanlara göre daha üstün sonuçlar vermektedir. Randomize klinik araştırmalar, NA inhibitörlerinin semptom süresini ve pnömoni komplikasyonları riskini azaltmaya yönelik etkinliğini teyit etmiştir ve immünsupresif hastalarda tedavi süresi veya doz artırılabilir. Jefferson ve ark. ⁽⁹⁰⁾ tarafından iki ilacın klinik etkinliği ile ilgili olarak yakın zamanda yapılan bir meta-analiz, her iki ilacın sağlıklı yetişkinlerde ılımlı bir terapötik etkiye sahip olduğunu ve zanamivir veya oseltamivir ile profilaktik tedavinin hastalığın önlenmesinde etkili olduğunu ortaya koymuştur. Zanamivir, her biri 5 mg toz içeren dört blister ile "Rotadisk" te temin edilmektedir. Diskhaler inhalasyon cihazı ile beş Rotadisk paketlenmiştir. Oseltamivir, 75 mg kapsüller halinde veya 12 mg/mL (Oseltamivir fosfat) içeren oral süspansiyon olarak mevcuttur. Advers ilaç reaksiyonlarında genellikle bulantı ve kusma görülmektedir. Son zamanlarda, bir yaştan altındaki bebeklerde santral sinir sistemi toksisitesi bildirilmiştir.

Böbrek yetmezliği olan hastalarda düzenlemeler gerekliken, hepatik yetmezlik veya hafif obezite olan hastalarda herhangi bir ayarlama yapılması gerekmemektedir. Oseltamivir hamile kadınlara uygulanabilmektedir.

İnfluenza virusa bağlı solunum yetmezliği ile başvuran hastalar için NA tedavisi şiddetle tavsiye edilir ve semptom başlangıcından 48 saat sonra uygulansa bile sonuç açısından etkili olduğu bulunmuştur. NA inhibitörleri sıklıkla kritik bakım hastalarında intravenöz yolla uygulanmaktadır.

Günümüzde dolaşan A ve B suşlarının neredeyse tamamı onaylanmış NA inhibitörlerine duyarlıdır. Bununla birlikte, daha önce dolaşan influenza A H1N1 suşları oseltamivire karşı direnç göstermiştir. İmmünkompromize hastalardan izole edilmiş dirençli influenza'nın birkaç vaka bildirimi bulunmaktadır. Ison ve ark.⁽⁹¹⁾ anti-influenza ilaçlara dirençli moleküler belirteçlerle influenza enfeksiyonu olan immünkompromize üç vaka bildirmiştir. Bir başka çalışmada, kemoterapi alan hastaların yarısında hem tedavi öncesi hem de tedavi sırasında saptanan dirençli suşlara sahip oseltamivir dirençli influenza viruslar tespit edilmiştir⁽⁹²⁾. Halen dolaşan influenza suşlarının çoğunluğu amantadanlara dirençliken H1N1 ve H3N2 suşlarının ve B tipi virusların oseltamivir ve zanamivire karşı direnci çok düşüktür. Bu sebeple Amerika CDC ve WHO, mevsimsel ve pandemik influenza tedavisinde ve önlenmesinde bunların kullanımını önermektedir.

2.13.2. Diğer lisanslı ilaçlar

2.13.2.1. Diğer NA inhibitörleri

Zanamivir ve oseltamivirin Japonya ve diğer Asya ülkelerinde halen ruhsatlı olan iki analogu peramivir ve laninamivir oktanoat hidrattır (CS-8958).

Peramivir, çok zayıf biyoyararlanımı sebebiyle sadece intravenöz olarak uygulanmaktadır. Japonya'da ve Güney Kore'de lisanslıdır, ancak H1N1 pandemisi sırasında Amerika'da geçici olarak acil kullanım için onaylanmıştır.

Uzun süre aktif inhibitör etkisi sebebiyle ikinci ilaç çok umut vericidir. İnavir, Ekim 2010'da Japonya'da 20 mg kuru toz inhaleri olarak piyasaya sürülmüştür. Hava yolunda aktif NA inhibitörü olan laninamivire (R-125489) dönüştürülen ve 40 mg'ın tek bir inhalasyonundan sonra en az 10 gün boyunca yüksek konsantrasyonlarda tutulduğu

bir ön ilaçtır. İlacın sadece %15'i oral yolla biyolojik olarak kullanılabilir. Sıklıkla bildirilen advers ilaç reaksiyonları psikiyatrik, gastrointestinal ve merkezi sinir sistemi bozukluklarıdır. Çocuklar ve genç ergenler düzgün bir şekilde nefesle alamıyor olsalar bile tek bir inhalasyon dozu inaviri oldukça uygun bir ilaç yapmaktadır ^(1,89).

2.13.2.2. Ribavirin

vRNA'nın transkripsiyonuna ve replikasyonuna karşı hedeflenen bileşikler göz önünde bulundurulduğunda, ilk geliştirilen ilaçlardan biri ribavirindir. Virazol'un ticari adı olarak da bilinen ribavirin guanozin nükleozid analogudur: 1β-D-ribofuranosil-1, 2, 4-triazol-3-karboksamid. Etki mekanizması tamamen bilinmemektedir. Bununla birlikte, inozin 5'-monofosfat dehidrogenaz molekülün temel hedefi gibi görünmektedir. Bu inhibisyon, Guanozin-5'-trifosfat hücre içi konsantrasyonunu azaltmakta ve bu durum viral protein sentezini durdurmakta, viral RNA replikasyonunu sınırlamaktadır. Crotty ve ark.⁽⁹³⁾ ribavirinin guanozin veya adenozin ile benzerlik göstererek RNA replikasyonunda mutasyonlara sebep olan bir viral RNA letal mutajen olduğunu da göstermişlerdir. Bununla birlikte, iyi klinik sonuçlara sahip olmak için ilacın yüksek dozlarına duyulan ihtiyaç, anti-influenza ilacı olarak ribavirinin kullanımını sınırlamış ve Chan-Tack ve ark.'larının⁽⁹⁴⁾ literatürdeki güncel revizyonu influenza tedavisinde virazolün faydalı kullanımı hakkında kesin sonuçların olmadığını göstermiştir.

Ribavirin oral yolla, aerosolizasyon yoluyla ve nadiren intravenöz yolla uygulanabilmektedir. Advers ilaç reaksiyonları, ilaç intravenöz olarak verilirse ekstrasvasküler hemolitik anemi, aerosol haline getirilmiş ise bronkospazm olmak üzere uygulama yoluna bağlıdır.

2.13.2.3. Arbidol

HA inhibitörleri olarak işlev gören potansiyel olarak etkili bazı ilaçlar vardır. Bununla birlikte sadece bir ilaç, küçük indol türevi arbidol veya umifenovir veya etil-6-bromo-4-[(dimetilamino) metil]-5-hidroksi-1-metil-2 [(feniltio) metil]-indol-3-karboksilathidroklorür monohidratın lisansı alınmıştır.

Arbidol, Moskova'daki Uyuşturucu Kimyası Merkezi tarafından yapılmış, 20 yıl önce Rusya'da ruhsatlandırılmış ve 2006'dan beri A ve B influenza viruslarının sebep olduğu pnömoninin profilaksisi ve tedavisi için Çin'de kullanılmıştır. Arbidol, direkt

virüsidal etki, virüsün hücre giriş seviyesinde bir blok (bağlanma ve internalizasyon) ve proteinlere ve lipidlere bağlanma kabiliyeti sebebiyle viral replikasyonda bozulma gibi muhtemelen çoklu antiviral etki yapmaktadır. Birçok çalışma arbidolün, hepatit B virüs, hepatit C virüs, RSV, bazı picornavirus (rhinovirus 14 gibi), poliovirus 1, coxsackie virüs B5, PIV 3'ün yanı sıra avian coronavirus, enfeksiyöz bronşit virüs, Chikungunya virüs, reovirus, Hantaan virüsü, veziküler stomatitis virüsü ve avian onkojenik herpes virüs olan Marek hastalığı virüsü gibi zarflı ve zarfsız diğer virüslara karşı da etkili olduğunu göstermiştir.

Karaciğerde metabolize olmakta ve vücut dokularında yeniden dağıtılmaktadır.

Temel biyotransformasyon yolları, sülfoksidasyon, dimetilamin N-demetilasyon, glukuronidasyon ve sülfat konjugasyonunu içermektedir. Başlıca metabolit sülfonilarbidol ve bunu takiben metabolize edilmemiş arbidol, N-demetilsülfonilarbidol ve sülfonilarbidoldür. Diğer P450'ler ve flavin içeren monooksijenazlar minör rol oynarken CYP3A4, arbidol metabolizmasında yer alan başlıca izoformdur. Plazma yarılanma ömrü uzundur (25 saate kadar) ⁽¹⁾.

2.13.3. Alternatif korunma stratejileri

Kemoprofilaksi ve diğer birçok önlemler de dahil olmak üzere ek stratejiler, malignitesi olan çocuklarda influenza enfeksiyon riskini azaltmaya yardımcı olabilmektedir. Bu önlemler aşırıyı tamamlayıcı olarak düşünülmeli ve aşı yerine kullanılmamalıdır.

2.13.3.1. Primer kemoprofilaksi

Primer kemoprofilaksi, influenza enfeksiyonunu önlemek için antiviral ilaçların kullanımını ifade etmektedir. Çeşitli kemoprofilaksi stratejilerinin etkili olduğu gösterilmiş ve bu stratejiler aşılanamayan, aşırıya cevap veremeyen veya henüz aşılanmamış yüksek riskli hasta popülasyonları için önerilmiştir. Mevsimsel kemoprofilaksi, yerel influenza virüs dolaşımının zirvesindeyken 14 ila 18 haftalık bir süre için bir anti-influenza ilacının günlük uygulanması demektedir. Dolaşan influenza A suşlarında nispeten yüksek direnç oranları sebebiyle influenzaya karşı kemoprofilaksi için amantadin ve rimantadin mevcut durumda önerilmemektedir. Primer kemoprofilaksi, influenza aşısı alamayan veya influenza aşısına cevap veremeyen

hastalarda (örn. ciddi primer veya sekonder immün baskılama durumu) aşılamaya etkili bir alternatif olabilir. Bir derlemede, sağlıklı çocuklarda influenza A'nın önlenmesinde kemoprofilaksinin yaklaşık %90 oranında etkili olduğu belirtilmiştir ⁽⁹⁵⁾. Bununla birlikte, tek bir influenza vakasını önlemek için 17 çocuğun kemoprofilaksi alması gerektiği tahmin edilmektedir.

Pediyatrik onkoloji hastalarında kemoprofilaksi bildiren iki rapor vardır. Bir çalışmada, pediyatrik onkoloji biriminde bir influenza salgınında enfeksiyona maruz kalmış hospitalize hastaların hepsinde uygulanan kemoprofilaksinin başarılı olduğu bildirilmiştir. Enfekte hastaların izolasyonuna, koruyucu ekipmanların kullanımına ve ziyaretçilerin kısıtlamalarına ek olarak oseltamivir tedavisi başlatılmıştır. Bu önlemlerin uygulanmasından sonra yeni bir vaka gelişmemiştir. Kemik iliği transplantasyon hastaları için ayakta tedavi uygulanan bir merkezde dört influenza A vakasından oluşan bir başka salgın ortaya çıkmıştır ^(96,97). Oseltamivir profilaksisi 45 hastaya verilmiştir. Oseltamivir başladıktan sonra yeni bir influenza A vakası gelişmemiştir. Kanseri ve kemik iliği transplantasyonu olan pediyatrik hastalar için influenza mevsiminde oseltamivir profilaksisini değerlendiren bir çalışma bulunmaktadır. Kemoterapi alan veya kemik iliği transplantasyonu olan hastalara oseltamivir profilaksisi 8 hafta süreyle verilmiştir. Hiçbir hastada influenza enfeksiyonu gelişmemiştir ⁽⁹⁸⁾.

2.13.3.2. Sekonder kemoprofilaksi

Sekonder kemoprofilaksi, bilinen veya şüphelenilen bir maruziyetten sonra nispeten kısa bir süre için antiviral ilaçların kullanımını ifade etmektedir. İnfluenza enfeksiyonu doğrulanmış bir kişinin bulunduğu evlerde yapılan çalışmalar, antiviral ilaçların sekonder influenza vakalarını önleyebileceğini ortaya koymuştur. Bu çalışmalar, immüno-compromize çocuklu ailelerde yapılmamıştır. Daha fazla bulaşmanın önüne geçmek için onkoloji ünitesinde hastane kökenli influenza salgını ortamında oseltamivir profilaksisi önerilmiştir. Temas sonrası profilaksi ev ortamında kullanıldığında, genellikle 2 hafta boyunca uygulanmaktadır. Oseltamivir sağlık kuruluşunda influenza salgınına kontrol etmek için kullanıldığında, ilaca en son doğrulanmış nozokomiyal influenza vakasından 1 hafta sonra devam edilmektedir ⁽⁵⁾.

2.13.3.3. Bariyer korumaları

Hastadan hastaya influenza bulaşını önlemek için standart ve bulaşmaya karşı tedbirlerin uygun bir şekilde uygulanması önemlidir. Hastane ortamında, influenza bilinen veya şüphelenilen herhangi bir hasta için bulaşmaya yönelik önlemler alınması önerilmektedir. Bazı kurumlar solunum yolları viral enfeksiyonları için bu virusların bulaşma yollarını kesmek için damlacık ve temas önlemlerini kullanırken birçok kurumda damlacık önlemleri kullanılmaktadır. Enfekte hastaların enfekte olmayan hastalarla olan temaslarını sınırlandırmak için kohort veya ayırıştırma da influenza kontrolünün önemli bir bileşenidir ve yatarak veya ayakta tedavi ortamında uygulanabilmektedir. Bazen gezi sırasında grup etkinliklerinde (örn. partiler, alışveriş) aileler tarafından kullanılsa da, onkoloji hastalarını influenza enfeksiyonundan korumak için halka açık alanlarda maske kullanımı konusunda sistematik bir araştırma yapılmamıştır⁽⁵⁾.

2.13.3.4. Sosyal mesafeler ve diğer müdahaleler

CDC, onkoloji hastalarının mevsimsel influenzanın önlenmesinin bir bileşeni olarak "iyi sağlık alışkanlıklarını" izlemelerini önermektedir. Bu uygulamalar, hasta olan insanlarla yakın temasta bulunmamak, sık el temizliği ve gözlerin, burnun ve ağzın mukoza membranlarına dokunmayarak self inokülasyondan kaçınmak gibi önlemleri içermektedir. Ek önlemler, influenza benzeri hastalık belirtileri bulunan hastaların erken belirlenmesi ve diğer hastalardan ayrılmasını içermektedir^(5,89).

2.13.4. Yeni tedavi yaklaşımları

İlaca dirençli influenza A virus suşlarının giderek artan prevalansı göz önüne alındığında, günümüzde klinik araştırmalarda insanlarda uygulama için test edilen, influenza A virus enfeksiyonunun sonuçlarını iyileştiren ve viral replikasyonu sınırlayan yeni stratejiler oluşturmak için önemli çabalar sarf edilmektedir. Viral proteinleri ve işlevlerini doğrudan hedef alan bir ilaç sınıfı klasik antiviral ajanlar içermektedir. Daha geniş influenza suşu çeşidine karşı aktif olan, HA ve M2'ye karşı nötralize edici antikorlar test edilmektedir. Viral HA, glikozilasyon bölgelerine bağlanarak HA'yı bloke eden ve böylece hücreye adsorpsiyonu engelleyen karbohidrat bağlayıcı ilaçların (örneğin, cyanovirin-N 56) yanı sıra tuzak reseptörleri veya sialik asit içeren

inhibitörler tarafından da hedeflenmektedir. Favipiravir, bugünlerde viral polimeraz kompleksinin aktivitesini bloke eden ve dirençli influenza A virusun çok sınırlı gelişimini ortaya koyan faz III çalışmalarında değerlendirilen bir nükleozid inhibitörüdür. Viral bileşenleri doğrudan hedefleyen diğer stratejiler, küçük interferans RNA ve küçük molekül inhibitörlerinin kullanımını içermektedir. Ayrıca, farklı antiviral ilaçları kullanan kombinasyon tedavileri halen detaylı olarak incelenmekte ve influenza A virus replikasyonunun sınırlandırılmasında etki göstermektedir ⁽⁶⁾.

Yeni bir antiviral ilaç sınıfı, virus enfeksiyonu veya replikasyonu için gerekli sinyal yollarını veya konak hücre proteinlerini etkilemektedir. DAS181 (Fludase), konak hücre yüzeyinden sialik asidin ayrışmasıyla konak hücreye HA adsorpsiyonunu ortadan kaldırır. HA, transmembran proteininin doğru posttranslasyon işlemlerini önleyen (Nitazoxanide) ve ayrıca internal proteaz HAT ve TMPRSS2 ile HA'nın ayrışmasını bloke eden (Aprotinin) ajanlar tarafından hedef alınmaktadır. Bir diğer yaklaşım, influenza enfeksiyonu üzerine aktive olduğu ve virus replikasyonu için destekleyici olduğu kanıtlanmış NF- κ B transkripsiyon faktörünün inhibisyonudur. NF- κ B inhibisyonunun viral replikasyonda azalma, daha az inflamasyon ve preklinik modellerde daha iyi sonuç ile neticelenmesi göz önüne alınarak, solunan bir bileşik olan L-lizin asetilsalisilat glisin (LASAG), faz II çalışmalarında test edilmiştir. Virus atılımından sonra hasar gören epitelin onarımını yönlendirmek, pulmoner konak savunmasını geliştirmek ve virus kaynaklı akciğer hasarı sırasında dengesiz ve aşırı miktarda inflamatuvar yanıtı modüle etmek için başka stratejiler de amaçlanmaktadır. GM-CSF, makrofaj ve dendritik hücre aracılı antiviral bağışıklığın önemli bir modülatörüdür ve alveolar epitelin onarımında da önemli bir rol oynamaktadır. Herold ve ark.⁽⁹⁹⁾ GM-CSF'nin pnömoni ve influenza A virus ile indüklenen ARDS'li hastalara lokal olarak verilmesinin konak savunmasını, oksijenasyonunu ve sonucunu geliştireceğini öne sürmüştü ve bakteriyel veya viral pnömoni ile indüklenen ARDS tedavisi için inhale GM-CSF üzerinde plasebo kontrollü, çift kör, randomize, çok merkezli bir faz II çalışması başlatılmıştır. Bu gibi konağı modüle edici tedavilerin gelecekte influenza kaynaklı solunum yetmezliğinin sonucunu iyileştirmek için antivirallerle kombine edileceği düşünülmektedir.

Son olarak, gelecekteki tedavi seçenekleri kök hücre temelli yaklaşımlardır. İlginç olarak klinik öncesi çalışmalar, akut akciğer hasarının tedavisi için

immünomodülatör ve rejeneratif özelliklere sahip olan kemik iliği kaynaklı mezenkimal stromal hücrelerin uygulanmasının faydalı etkilerini göstermiştir ve mezenkimal stromal hücreler bugünlerde insan ARDS tedavisi için test edilmektedir. Mezenkimal stromal hücrelerin potansiyeli şimdiye kadar influenza pnömonisinin preklinik modelleri üzerinde çalışılmamış olmasına rağmen, hücre tedavisi (sistemik olarak veya lokal olarak yaralı akciğere uygulanmış) influenza A virus kaynaklı ARDS hastalarını tedavi etmek için yenilikçi bir yaklaşım oluşturabilir. Ayrıca, murin akciğeriindeki endojen epitelyal kök/progenitor hücreler yakın zamanda tanımlanmıştır ve distal akciğer epitelini yeniden doldurduğu ve dolayısıyla bir p63/krt5 rejenerasyon programının aktivasyonu yoluyla influenzaya bağlı hasardan sonra onarım evresine aktif olarak katılımları bulunduğu tespit edilmiştir. Herold ve ark.'larının⁽⁹⁹⁾ verileri, bu rejenerasyon yollarının indüklendiğini ve özellikle “stem cell niche” enfeksiyonu esnasında influenza virusları tarafından modüle edildiğini ortaya koymuş ve virusa bağlı ciddi hasar sonrası akciğer rejenerasyonunu iyileştirmek için yeni varsayılan bir hedef olarak endojen kök hücreleri ve mediyatörlerini vurgulamaktadır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde Ocak 2014 ve Eylül 2017 tarihleri arasında Pediatrik Onkoloji Bilimdalı ve Pediatrik Hematoloji Bilimdalı'nda tedavi görmekte olan ve solunum yolu enfeksiyonu belirtileri olan 134 hastadan alınan nazofaringeal sürüntü örnekleri influenza virus varlığını araştırmak için real-time PCR (RealStar Influenza S & T RT-PCR Kit 3.0, Altona Diagnostics, Germany) ve DFA (Argene SA, France) testi ile çalışıldı. İnfluenza A virus pozitif bulunan örnekler H1N1 ve H3N2 alt tipleri araştırılması için influenza A H1N1 ve H3N2 Real-TM PCR kiti (Sacace, Italy) ile analiz edildi.

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 flocked 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 saniye 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 testi çalışılincaya kadar -80°C'de saklandı.

3.2. Direkt immunfloresan test (DFA) ile antijen tespiti

Nazofaringeal sürüntü örnekleri influenza A ve B antijeni tespiti için DFA testi (Argene SA, France) ile analiz edildi. Testin yapım süresi 65 dakika idi.

3.2.1. Örneklerin işlenmesi 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 µl PBS eklenerek pipetaj yapıldı.
7. Test edilecek olan 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 10 dakika bekletildi.
10. Lamalar 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 işlemler

1. Çalışılacak örneklerin preparatları dondurucuda ise çıkartılıp kuruması için laminer flow kabin içerisinde 10-15 dakika bekletildi.
2. Steril ependorf tüpleri antijen varlığı araştırılan influenza A ve B virus için etiketlendi.
3. Fluorescein isothiocyanate ile konjuge virus spesifik monoklonal antikorlar 1/40 oranında PBS ile dilüe edildi.

4. Lamdaki 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/H1N1, influenza A ve influenza B real-time RT-PCR

Nazofaringeal sürüntü örneklerinde real-time PCR (RealStar Influenza S & T RT-PCR Kit 3.0, Altona Diagnostics, Germany) yöntemi ile influenza virus varlığı araştırıldı. Real-time PCR testi, örneklerden nükleik asit ekstraksiyonu ve real-time PCR amplifikasyonu aşamalarından oluşmaktadır.

3.3.1. RNA ekstraksiyonu

Nazofaringeal sürüntü örneklerinden viral genom eldesi için yapılan ekstraksiyon işleminde QIAamp Viral RNA Mini Kit (50) (QIAGEN, Germany) kullanıldı. RNA ekstraksiyonu üretici firmanın önerilerine göre aşağıdaki gibi yapıldı.

3.3.1.1. Reaktiflerin hazırlanması

Liyofilize carrier RNA içeren tüpe 310 µl Buffer AVE eklendi. Carrier RNA tamamen eritildi. Buffer AVE ve Carrier RNA karışımı 6 örneklik çalışma için 33.6 µl’lik eşit miktarlara bölündü ve çalışmada kullanılmayacak olan tüpler bir sonraki çalışmada kullanılmak üzere -20°C’de saklandı.

Buffer AW1 ve Buffer AW2 konsantre halinde temin edilmektedir. İlk kullanımlarından önce uygun miktarda etanol (%96-100) eklendi.

3.3.1.2. RNA ekstraksiyon aşaması

1. Buffer AVL'den 3360 µl eklenmiş 15 ml'lik falkon tüpüne 33.6 µl Buffer AVE-Carrier RNA karışımı eklendi. Tüp yavaşça 10 kez alt-üst çevirerek karıştırıldı.
2. Carrier RNA içeren Buffer AVL'den 560 µl hasta numarası verilmiş 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Üzerine 140 µl nazofarengeal sürüntü örneği eklendi. Tüpler 15 saniye vortekslendi ve oda ısısında (15-25°C) 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Tüpler kısaca santrifüj edildi.
3. Örnekler 560 µl etanol (%96-100) eklendi ve 15 saniye vortekslendi. Vorteks işleminden sonra tüpler kısaca santrifüj edildi.
4. Örneğin 630 µl'si dikkatli bir şekilde column tüplerine aktarıldı. Tüplerin kapakları kapatıldı ve 6000 g (8000 rpm)'de 1 dakika santrifüj edildi. Temiz 2 ml'lik toplama tüpüne column yerleştirildi ve süzüntü içeren tüp atıldı.
5. Basamak 4'te yapılan işlemler tekrarlandı.
6. Tüplere 500 µl Buffer AW1 eklendi ve tüpler 6000 g (8000 rpm)'de 1 dakika santrifüj edildi. Temiz 2 ml'lik toplama tüpüne column yerleştirildi ve süzüntü içeren tüp atıldı.
7. Tüplere 500 µl Buffer AW2 eklendi. Tüplerin kapakları kapatıldı ve maksimum hızda (20000 g; 14000 rpm) 3 dakika santrifüj edildi.
8. Column yeni bir 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirildi ve süzüntü içeren tüp atıldı. Tüpler maksimum hızda 1 dakika santrifüj edildi.
9. Column temiz 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi. Süzüntü içeren eski toplama tüpü atıldı. Oda sıcaklığına gelene kadar dengelenmiş 60 µl Buffer AVE eklendikten sonra tüplerin kapakları kapatıldı. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübasyon sonrası tüpler 6000 g (8000 rpm)'de 1 dakika santrifüj edildi.
10. Elde edilen viral RNA -70°C'de saklandı.

3.3.2. Real-time RT-PCR aşaması

İnfluenza A/H1N1, influenza A ve influenza B virus tespiti için RealStar Influenza S & T RT-PCR Kit 3.0 (Altona Diagnostics, Germany) kullanıldı. Real-time RT-PCR testi üretici firmanın önerilerine göre aşağıdaki gibi yapıldı.

1. Real-time RT-PCR aşamasında bir hasta örneği için 5 µl Master A, 10 µl Master

- B ve 1 µl Internal Control kullanıldı.
2. Yukarıda yazılan malzemelerin miktarları çalışılacak örnek sayısına göre hesaplandı.
 3. Karışımın hazırlanacağı 0.1 mL'lik tüp, hasta ve kontrol sayısına göre ayarlanmış 4'lü stripler soğuk metal bloğa dizildi.
 4. Malzemeler oda ısısında bekletilip kısa spin atıldıktan sonra steril 0.1 mL'lik tüp içerisine eklendi. Bu karışım hafifçe vortekslendi, örnek ve pozitif kontrol sayısı kadar 15 µL dağıtıldı. Ekleme esnasında iyice pipetaj yapıldı.
 5. Hazırlanan PCR mix üzerine 10 µL örnek pipetaj yapılarak eklendi.
 6. Çalışmanın sensitivitesi ve spesifitesi için influenza A, influenza B, influenza A/H1N1 olmak üzere 3 pozitif kontrol ve bir negatif kontrol çalışmaya dahil edildi. Böylece veriler analiz edilip değerlendirilirken pozitif ve negatif kontroller göz önünde bulunduruldu.
 7. Stripler kapakları kapatıldıktan sonra firmanın protokolüne uygun olarak real-time PCR cihazına yüklendi ve tablo 1'deki ısı döngüsü kullanılarak çalışma başlatıldı.

Tablo 1. İnfluenza A/H1N1, influenza A ve influenza B real-time RT-PCR ısı döngüsü

	Siklus	Floresan Okuma	Sıcaklık	Zaman
cDNA sentezi	1	-	50°C	10 dakika
Denatürasyon	1	-	95°C	2 dakika
Amplifikasyon	45	-	95°C	15 saniye
		√	55°C	45 saniye
		-	72°C	15 saniye

8. Real-time RT-PCR çalışması tamamlandıktan sonra veriler analiz edildi. İnfluenza A için Cy5, influenza B için ROX, influenza A/H1N1 için FAM ve internal kontrol için JOE kanallarında değerlendirme yapıldı. İlk olarak internal kontrolün ve pozitif, negatif kontrollerin uygun şekilde çalışıp çalışmadığı değerlendirildi. İnternal kontrolün, pozitif ve negatif kontrollerin uygun şekilde sonuç vermesi çalışmanın başarılı olduğunun göstergesidir. Böylelikle hasta

örnekleri kontrollere bağılı olarak değerdendirilip, influenza A, influenza B, influenza A/H1N1 RNA'sının varlığı araştırıldı.

3.4. İnfluenza A H1N1 ve H3N2 real-time PCR

İnfluenza A virus pozitif bulunan örnekler H1N1 ve H3N2 alt tipleri araştırılması için influenza A H1N1 ve H3N2 Real-TM PCR kiti (Sacace, Italy) ile analiz edildi.

3.4.1. RNA ekstraksiyonu

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

1. Lizis solüsyonu ve yıkama solüsyonu buz kristalleri kayboluncaya kadar 60-65°C'de bekletildi. Negatif kontrol tüpü dahil olmak üzere hasta numarası ile etiketlenmiş ependorf tüpleri hazırlandı.
2. Her tüpe 450 µL lizis solüsyon ve 10 µL Internal Control RNA (IC RNA) pipetaj yapılarak eklendi. Tüpler oda ısısında 5 dakika inkübe edildi.
3. Lizis solüsyon ve IC içeren tüplere 100 µL örnek, C_{neg} olarak etiketlenmiş negatif kontrol tüpüne 100 µL C- Negative Control eklendi.
4. Tüpler vortekslendi ve 5000 g'de 5 saniye santrifüj edildi. Santrifüj sonrası erimeyen örnekler maksimum hızda (12000 g) tekrar 1 dakika santrifüj edildi.
5. Yeni tüpe aktarılan supernatant üzerine iyice vortekslenmiş Sorbent'ten 25 µL eklendi.
6. Tüpler 5-7 saniye vortekslendi.
7. Oda ısısında 10 dakika inkübasyona bırakılan tüpler periyodik olarak vortekslendi.
8. Örnekler 1 dk 10000 g'de santrifüj işleminden sonra supernatant bariyerli pipet ucu kullanılarak pellete zarar verilmeden alınarak atıldı.
9. Her tüpe 400 µL yıkama solüsyonu konuldu. İyice vortekslenen tüpler 1 dakika 10000 g'de santrifüj edildi ve supernatant tekrar atıldı.

10. Tüplere %70'lik etanolden 500 µL eklendi. İyice vortekslenen tüpler 1 dakika 10000 g'de santrifüj edildi. Supernatant atıldı.
11. Tüplere tekrar 500 µL %70'lik etanol eklendi. Tüpler iyice vortekslendi, 10000 g'de santrifüj edildi. Supernatant uzaklaştırıldı.
12. Her tüpe 400 µL aseton eklendi ve tüpler iyice vortekslenip 10000 g'de santrifüj edildi. Supernatant atıldı.
13. Tüpler kapakları açık olarak 60°C'de 10 dakika inkübe edildi.
14. Her tüpe 50 µL RNA-eluent eklenerek pellet tekrar süspanse edildi ve 60°C'de 10 dakika inkübasyona bırakılan tüpler periyodik olarak vortekslendi.
15. Tüpler 2 dakika maksimum hızda (12000 g) santrifüj edildi.
16. RNA içeren supernatant cDNA sentezinde kullanılmak üzere -80°C'ye kaldırıldı.

3.4.2. cDNA sentezi

Örnek ekstraktlarından Reverta Reverse Transcription (Sacace, Italy) kiti ile cDNA sentezi yapıldı.

1. RT-mix içeren tüpe 12 örneklik reaksiyon karışımı hazırlamak için 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 10 µL dağıtıldı.
4. Nükleik asit ekstraktları maksimum hızda (12000 g) 2 dakika santrifüj edilip supernatantların 10 µL'si dikkatli bir şekilde pipetaj yapılarak reaksiyon karışımı içeren tüplere eklendi.
5. Tüpler MJ Mini Personal Termal Cyler (Bio-Rad Life Science Research, France) cihazında 37°C'de 30 dakika inkübe edildi.
6. Elde edilen 20 µL cDNA örnekleri her tüpe 20 µL TE-buffer eklenerek 1:2 oranında dilüe edildi. Dilüe cDNA örnekleri -70°C'ye kaldırıldı.

3.4.3. Real-time PCR aşaması

cDNA örnekleri ile PCR amplifikasyonu, İnfluenza A H1N1 ve H3N2 Real-TM PCR (Sacace, Italy) kitinin önerdiği protokole uyularak yapıldı.

1. Kontrol ve klinik örneklerin cDNA amplifikasyonu için gerekli sayıda PCR-Mix-1 H1N1 ve PCR-Mix-1 H3N2 tüpü hazırlandı.
2. Her tüpe, wax tabakasının yüzeyine 7 µL PCR-Mix-2 eklendi.
3. Hazırlanan tüplere örneğe ait cDNA'dan 10 µL eklendi.
4. Her çalışmada amplifikasyonun negatif kontrolü olarak etiketlenmiş tüpe 10 µL TE buffer, H1N1 pozitif kontrol tüpüne 10 µL Positive control cDNA influenza virus A H1N1, H3N2 pozitif kontrol tüpüne 10 µL Positive control cDNA influenza virus A H3N2 ve internal kontrol DNA pozitif kontrol tüpüne 10 µL Positive control STI dağıtıldı.
5. Reaksiyon tüpleri yarım saat önceden açılmış BioRad iQ5 cihazının kuyularına yerleştirildi ve tablo 2'deki ısı döngüsü programında çalıştırıldı.

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

Sıcaklık, °C	Süre	FloresanTespit	Siklus
95°C	15dk		1
95°C	15sn	- - -	42
54°C	25sn	FAM, JOE/HEX/Cy3, ROX/Texas Red	
72°C	25sn	-	

6. İnfluenza A virus H1 ve influenza virus A H3 JOE/Yellow kanalında, influenza virus A N1 ve influenza virus A N2 ROX/Orange kanalında ve internal kontrol FAM/Green kanalında değerlendirildi. Örnekler için uygun floresan kanaldaki siklus eşik değeri (Ct) ≤35 olduğunda 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 kabul edildi.

4. BULGULAR

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde Ocak 2015 ve Eylül 2017 tarihleri arasında Pediatrik Onkoloji Bilimdalı ve Pediatrik Hematoloji Bilimdalı'nda tedavi görmekte olan, solunum yolu enfeksiyonu belirtileri olan 19 yaş ve altı 134 çocuktan alınan nazofaringeal sürüntü örnekleri influenza virus tespiti için real-time PCR ve DFA testleri ile analiz edildi. Real-time PCR ile influenza A virus pozitif bulunan sürüntü örneklerinde H1N1 ve H3N2 alt tipleri araştırması yapıldı.

Nazofaringeal sürüntü örneklerinin 40'ı (%29.9) poliklinik hastası olan ve 94'ü (%70.1) serviste yatarak tedavi gören çocuklara aitti. İnfluenza virus tespit edilen hastaların 10'u (%18.2) ayakta ve 45'i (%81.8) ise yatarak tedavi gören çocuklardı. Çalışma grubundaki çocukların hiçbirinde influenza aşısı yapılmamıştı.

İnfluenza virus enfeksiyonu olduğundan şüphelenilen pediatrik onkoloji ve hematoloji hastalarının 97'si (%72.4) erkek, 37'si (%27.6) kız olmak üzere büyük çoğunluğu erkekti. Erkeklerin kızlara oranı 2.6 idi. Toplam 134 hastanın %13.4'ü 2 yaş ve altı, %24.6'sı 3-5 yaş, %30.6'sı 6-9 yaş, %31.3'ü 10 yaş ve üstü gruba aitti. Çocuklardan 33'ü 10 yaş ve üstü erkek iken yalnızca 3'ü 2 yaş ve altı kız grubunda idi. (Tablo 3)

Tablo 3. Pediatrik onkoloji ve hematoloji hastalarının cinsiyet ve yaş gruplarına göre dağılımı

Pediatrik hastalar	Yaş grupları									
	≤ 2 yaş		3-5 yaş		6-9 yaş		10-19 yaş		Toplam	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Erkek	15	83.3	20	60.6	29	70.7	33	78.6	97	72.4
Kız	3	16.7	13	39.4	12	29.3	9	21.4	37	27.6
Toplam	18	13.4	33	24.6	41	30.6	42	31.3	134	100

Pediatrik onkoloji ve hematoloji hastaları en fazla 27 (%20.1) hasta ile ALL tanısı alan çocuktan oluşurken bunu 14 (%10.4) hasta ile talasemi ve 10'ar (%7.5) hasta ile Fanconi aplastik anemi, Nöroblastom, Non-Hodgkin lenfoma ve 9 (%6.7) hasta ile AML izlemiştir. (Tablo 4)

Tablo 4. Toplam 134 pediatrik hastanın tanıları

Hastalık	no	%
Wilms tümörü	7	5.2
ALL	27	20.1
Talasemi	14	10.4
Fanconi aplastik anemi	10	7.5
Nöroblastom	10	7.5
Primitif nöroektodermal tümörler	4	3
Non-Hodgkin lenfoma	10	7.5
Rabdomyosarkom	5	3.7
Aplastik anemi	2	1.5
Lenfadenopati	3	2.2
Ewing sarkom	2	1.5
Germ hücreli tümör	2	1.5
AML	9	6.7
Hodgkin lenfoma	4	3
Langerhans hücreli histiositoz	2	1.5
Diğer onkolojik hastalıklar	23	17.2

Toplam 134 çocukta real-time PCR yöntemi ile influenza A virus %35, influenza B virus ise %6 oranlarında bulunmuştur. İnfluenza A virus pozitif 47 örneğin tiplendirilmesi sonucu influenza A H1N1 virus %18.7, influenza A H3N2 virus %16.4 oranında tespit edilmiştir.

İnfluenza virus tespit edilen pediatrik onkoloji ve hematoloji hastalarının 39'u erkek (%70.9) ve 16'sı (%29.1) kız idi. Erkeklerin 6'sı (%85.7) 2 yaş ve altı grupta, 5'i (%55.6) 3-5 yaş, 11'i (%61.1) 6-9 yaş ve 17'si (%81) 10-19 yaş grubunda yer almıştır. Kızların ise 1'i (%14.3) 2 yaş ve altı grupta olup 4'ü (%44.4) 3-5 yaş, 7'si (%38.9) 6-9 yaş ve 4'ü (%19) 10-19 yaş grubundadır. (Tablo 5)

Tablo 5. İnfluenza virus pozitif hastaların cinsiyet ve yaş gruplarına göre dağılımı

İnfluenza virus pozitif hastalar	Yaş grupları									
	≤ 2 yaş		3-5 yaş		6-9 yaş		10-19 yaş		Toplam	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Erkek	6	85.7	5	55.6	11	61.1	17	81	39	70.9
Kız	1	14.3	4	44.4	7	38.9	4	19	16	29.1
Toplam	7	12.7	9	16.4	18	32.7	21	31.3	55	100

İnfluenza virus tespit edilen çocuklardan 19'u (%34.5) ALL, 8'i (%14.5) talasemi, 5'i (%9.1) rabdomyosarkom tanısı almış olup ve nöroblastom, primitif nöroektodermal tümörler, Non-Hodgkin lenfoma ve AML tanılarının her biri için 3 (%5.5) hasta influenza virus pozitif bulunmuştur. (Tablo 6)

Tablo 6. İnfluenza virus pozitif hastaların tanıları

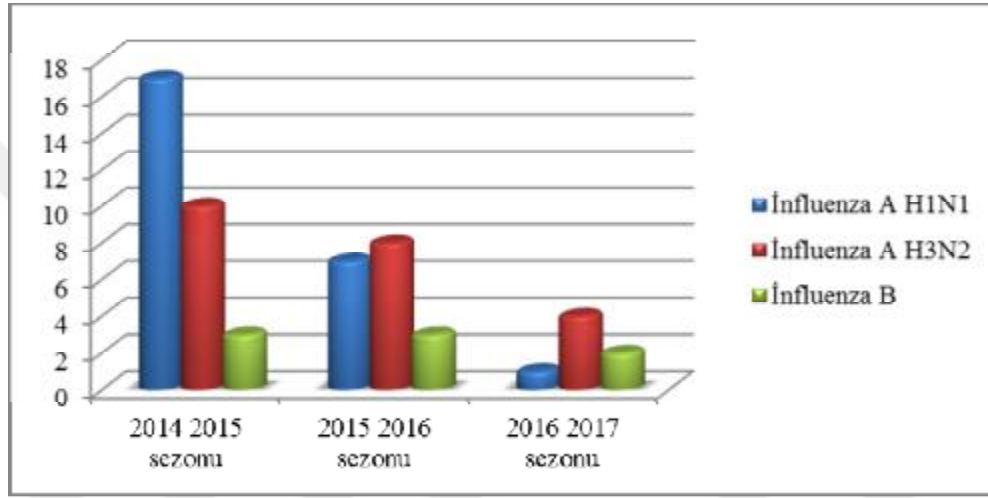
Hastalık	no	%
Wilms tümörü	2	3.6
ALL	19	34.5
Talasemi	8	14.5
Fanconi aplastik anemi	2	3.6
Nöroblastom	3	5.5
Primitif nöroektodermal tümörler	3	5.5
Non-Hodgkin lenfoma	3	5.5
Rabdomyosarkom	5	9.1
Aplastik anemi	1	1.8
Ewing sarkom	1	1.8
Germ hücreli tümör	1	1.8
AML	3	5.5
Hodgkin lenfoma	1	1.8
Diğer onkolojik hastalıklar	3	5.5

İnfluenza virus tespit edilen ve edilmeyen pediatrik onkoloji ve hematoloji hastalarında en fazla görülen klinik belirtiler ateş, öksürük ve burun akıntısıdır. İnfluenza pozitif hastalarda en sık görülen klinik belirtiler ateş (%74.5), öksürük (%69.1), burun akıntısı (%63.6), bulantı-kusma (%32.7), burun tıkanıklığı (%30.9) ve solunum güçlüğüdür (%30.9). İnfluenza virusun tespit edilmediği hastalarda ateş (%59.5), öksürük (%41.8), burun akıntısı (%35.4), burun tıkanıklığı (%24.1), solunum güçlüğü (%22.8) ve bulantı-kusma (%22.8) en çok görülen klinik belirtilerdi (Tablo 7)

Tablo 7. İnfluenza virus pozitif ve negatif pediatrik onkoloji ve hematoloji hastalarının klinik belirtileri

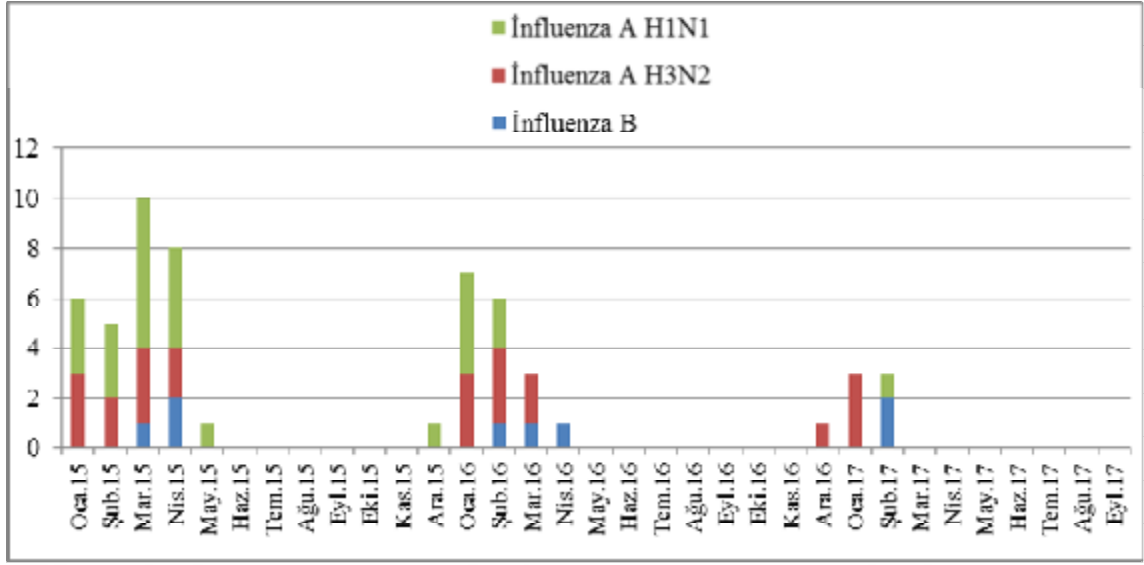
Belirtiler	İnfluenza virus pozitif 55 hasta		İnfluenza virus negatif 79 hasta		Toplam 134 hasta	
	n	%	n	%	n	%
Ateş	41	74.5	47	59.5	88	65.7
Öksürük	38	69.1	33	41.8	71	53
Boğaz ağrısı	14	25.5	17	21.5	31	23.1
Burun akıntısı	35	63.6	28	35.4	63	47
Burun tıkanıklığı	17	30.9	19	24.1	36	26.9
Solunum güçlüğü	17	30.9	18	22.8	35	26.1
Takipne	11	20	7	8.9	18	13.4
Göğüs ağrısı	2	3.6	1	1.3	3	2.2
Baş ağrısı	11	20	7	8.9	18	13.4
Kas ağrısı	5	9.1	4	5.7	9	6.7
Bulantı-Kusma	18	32.7	18	22.8	36	26.9
İshal	8	14.5	17	21.5	25	18.7
Konfüzyon	1	1.8	0	0	1	0.7
Baş dönmesi	2	3.6	1	1.3	3	2.2
Ağızdan gıda alamama	2	3.6	16	20.3	18	13.4

İnfluenza A virus alt tipleri ve influenza B virus ile enfekte vakaların influenza sezonlarına göre dağılımında 2014-2015 sezonunda influenza A H1N1 %35.4 (17/48), influenza A H3N2 %20.8 (10/48) ve influenza B virus %6.3 (3/48) oranlarında, 2015-2016 sezonunda influenza A H1N1 %19.4 (7/36), influenza A H3N2 %22.2 (8/36) ve influenza B virus %8.3 (3/36) oranlarında, 2016-2017 sezonunda ise influenza A H1N1 %4.8 (1/21), influenza A H3N2 %19 (4/21) ve influenza B virus %9.5 (2/21) oranlarında tespit edilmiştir. (Şekil 1)



Şekil 1. İnfluenza A ve B virus ile enfekte vakaların influenza sezonlarına dağılımı

Pediyatrik onkoloji ve hematoloji hastalarında influenza A virus 2014-2015 sezonunda Ocak ayında %42.9 (6/14), Şubat'ta %62.5 (5/8), Mart'ta %75 (9/12), Nisan'da %60 (6/10), Mayıs'ta %25 (1/4) oranlarında, 2015-2016 sezonunda Aralık, Ocak, Şubat, Mart aylarında sırasıyla %16.7 (1/6), %70 (7/10), %62.5 (5/8), %50 (2/4) ve 2016-2017 sezonunda Aralık Ocak, Şubat aylarında sırasıyla %16.7 (1/6), %37.5 (3/8), %33.3 (1/3) oranlarında bulunmuştur. İnfluenza B virus ise 2014-2015 sezonunda Mart ve Nisan aylarında sırasıyla %8.3 (1/12), %20 (2/10), 2015-2016 sezonunda Şubat ayında %12.5 (1/8), Mart ve Nisan aylarında %25 (1/4) ve 2016-2017 sezonunda ise Şubat ayında %66.7 (2/3) oranlarında bulunmuştur. (Şekil 2)



Şekil 2. Pediatrik onkoloji ve hematoloji hastalarında tespit edilen influenza virusların aylara göre dağılımı

D2FA ile hastaların influenza A virus 39’unda (%29.1), influenza B virus 8’inde (%6) görülmüştür. Pediatrik onkoloji ve hematoloji hastalarında influenza A ve B virus için real-time PCR testine göre DFA testinin sensitivitesi sırasıyla %83 , %100 ve spesifitesi %97.7 , %100 bulunmuştur. (Tablo 8)

Tablo 8. İnfluenza A ve B virus için real-time PCR testi ve DFA testi sonuçları

	DFA	Real-time PCR			
		Pozitif	Negatif	Sensitivite	Spesifite
İnfluenza A	Pozitif	39	2	%83	%97.7
	Negatif	8	85		
İnfluenza B	Pozitif	8	-	%100	%100
	Negatif	-	126		

5. TARTIŞMA

İnfluenza, kısa inkübasyon süresi, yüksek ateş, solunum yolu semptomları ve sistemik semptomlar ile karakterize bir hastalık olup, hem insan sağlığı hem de ekonomi üzerinde önemli bir etki göstererek insanlarda her yıl tekrarlayan salgınlara sebep olmaktadır. Orthomyxoviridae ailesine ait olan influenza viruslar çoğunlukla solunum yolu sekresyonlarının damlacıkları veya kontamine olmuş yüzeylerle doğrudan temas ile bulaşan negatif polariteli, tek sarmallı RNA viruslarıdır ⁽⁷⁾.

İnfluenza viruslar, insan solunum yolu enfeksiyonlarının en sık görülen etkenleridir ve yüksek morbidite ve mortaliteye sebep oldukları için en önemliler arasındadır. İnfluenzaya bağlı ölümler, sağlıklı insanlar için 100.000'de <10'dan kronik hastalığı olanlarda 100.000'de >600'e kadar değişim göstermektedir. Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi (European Centre for Disease Prevention and Control; ECDC), Avrupa'da popülasyonun yaklaşık %10'unun her yıl enfekte olduğunu öngörmektedir. Ayrıca Amerika Birleşik Devletleri'nde popülasyonun %5-20'sinin her yıl influenzaya yakalandığı bildirilmektedir ^(1,2,5).

İnfluenzadan etkilenen insanların çoğu birkaç gün içinde veya en fazla 2 hafta içinde iyileşmektedir. Bununla birlikte, bazı hastalarda çok ciddi komplikasyonlar gelişebilmektedir. En yaygın komplikasyonlar bronşit, pnömoni, kulak enfeksiyonlarıdır. Astım, kronik obstrüktif akciğer hastalığı veya kalp rahatsızlığı gibi altta yatan hastalığı olan kişiler komplikasyonlar açısından yüksek risk altındadır. Miyozit, akut ensefalopati veya Reye sendromu gibi komplikasyonlar nadirdir. Reye sendromu klasik olarak kızarıklık, kusma ve karaciğer hasarı ile karakterizedir. Genellikle uzun bir süre aspirin kullanan çocuklarda viral hastalık sırasında ortaya çıkabilmektedir ^(1,16).

İnfluenza enfeksiyonunun komplikasyonları hematopoietik kök hücre transplantasyonu (HKHT) ve solid organ transplant popülasyonlarında sık görülmektedir. Bazı raporlarda, özellikle akciğer transplant alıcılarında ve HKHT alıcılarında, viral pnömoniye ilerlemede nispeten yüksek bir oran olduğu görülmektedir. Ciddi hastalık sıklıkla %43 gibi yüksek mortalite oranları ile HKHT alıcılarında bildirilmiştir. İnfluenza enfeksiyonu olan 62 HKHT alıcısıyla yapılan geniş çaplı bir derlemede, nakil sonrası enfekte olanlarda ve lenfopeni görülenlerde pnömoni geliştiği

gösterilmiştir. Antivirallerle tedavi edilmemiş hastalarda %18 oranında pnömoni gelişmiştir. Virus atılımı, 1 mg/kg/gün'ün üzerindeki steroid dozlarında daha uzun sürmüş ve oseltamivirin bu atılımı azaltabileceği önerilmiştir ⁽⁸⁶⁾. Lenfopeni (mutlak lenfosit sayısı <200 hücre/mL), influenza pnömonisine ilerleme için tanımlanan spesifik bir risk faktörüdür ⁽⁴⁾.

İnfluenza A virusları akuatik kuşlar ve yarasalardaki doğal rezervuarlarında minimal düzeyde evrim geçirmekte ve inaparan hastalığa sebep olmaktadır, ancak bir kez diğer türlere transfer olduklarında hızla evrim geçirebilir ve evcil kanatlı hayvanlarda, nispeten basit veya ilkel memelilerde ve insanlarda akut solunum yolu hastalığı epidemisi ve pandemilerine yol açabilmektedir. İnfluenza B virus, periyodik olarak büyük epidemilere sebep olabilmekte ancak pandemilerde rol oynamamaktadır. İnfluenza C virus ise endemiktir ve sporadik olarak hafif solunum yolu hastalığı etkenidir ^(1,10).

Her yıl influenza virusları (influenza A ve influenza B) 200.000'den fazla hastaneye yatış ve 30.000-50.000 ölüm ile sonuçlanan mevsimsel epidemilerden sorumludur. Yıllık mevsimsel epidemilere ek olarak, H1N1 ve H3N2 virusları, 1918'de "İspanyol gribi", 1958'de "Asya gribi", 1968'de "Hong Kong gribi" ve daha yeni olarak 2009 H1N1 pandemisi olmak üzere dört büyük influenza pandemisine sebep olmuştur. Amerika Birleşik Devletleri'nde 1957 yılındaki pandemide 66.000'den fazla ölüm görülürken 1918'de kaydedilen tarihteki en şiddetli salgın, yaklaşık 546.000 ölüm (toplam 675.000 ölüm) ve dünya genelinde 50 milyon kişinin ölümü ile sonuçlanmıştır. HPAI'nın yeni bir alt tipi olan H5N1 ile insan enfeksiyonları 1997 yılından beri bildirilmiştir. H5N1 influenza ile ilk insan enfeksiyonu vakalarının 1997'de Hong Kong'daki kümes hayvanları çiftliklerinde ve pazarlarındaki HPAI salgınlarında 18 vaka ve 6 ölüme sebep olduğu bildirilmiştir. O zamandan beri bu virus, Asya, Afrika ve Avrupa'daki pek çok ülkeye yayılmış ve %60'ın üzerinde ölüm oranı 424'ü aşan insan vakasına sebep olmuştur. Buna ek olarak, H9N2 ve H7N7 kuş gribi alt tiplerinin de insan enfeksiyonlarına sebep olduğu bildirilmiştir. İnsanları enfekte eden en son suş olan H7N9, 2011 yılında Çin'de tespit edilmiştir ^(1,3,89).

Şiddeti önceden belirlenememekle birlikte, kronik hastalığı olan insanlar influenzanın etken olduğu ciddi enfeksiyon, komplikasyonlar ve ölüm için yüksek risk altındadır. Pediatrik onkoloji hastalarında influenza virus ile çok ciddi enfeksiyonlar

görülebılır. Bu hastaların enfeksiyona duyarlılığı, kronik hastalık ve immun supresyona bağlıdır. Aşılamayı sağlamak, enfeksiyon kontrol önlemleri ve kişisel koruma ile ilgili eğitim gibi basit stratejiler, ciddi influenzaya duyarlı olan bu nüfusu koruyabilmektedir.

Viral yüzey glikoproteinlerinde sürekli olan antijenik drift ve sporadik antijenik shiftler sebebiyle düzenli olarak güncellenen influenza aşılarının immünojenitesi incelenen popülasýona bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. HKHT alıcılarında nakil sonrası 6 aydan önce aşı yanıtı yoktur ve aşı uygulamak için 6 aya kadar beklenmesi önerilmektedir. Benzer şekilde, solid organ transplant alıcılarında aşı, transplantasyondan 3-6 ay sonra herhangi bir zamanda verilebilmektedir. Bu popülasýonda aşılamanın sonucunda akut veya kronik rejeksiyonu destekleyecek hiçbir veri bulunmamaktadır. İntranazal influenza aşısı canlı attenüe aşıdır ve bağışıklık sistemi baskılanmış popülasýon için önerilmemektedir. Yakın tarihli bir çalışmada, pediatrik onkoloji popülasýonu için serokonversiyon oranlarının genel popülasýon oranlarının çok altında olduğu sonucuna varılmıştır. Buna ek olarak, ALL hastalarına tedavi başlangıcında verildiğinde daha iyi yanıt almışlardır. İnfluenza aşılarının mevsimsel doğasından dolayı bu durum, optimal sonuç almak için aşı zamanlamasının düzenlenebilmesinde ek bir soruna sebep olmaktadır. Bununla birlikte genel olarak bu hastalarda görülen serokonversiyonun, influenza enfeksiyonundan veya komplikasyonlarından korunmak için etkili olup olmadığı henüz net değildir. Pediatrik onkoloji hastalarında influenza enfeksiyonunun yol açtığı ciddi morbidite ve mortalite yüksek riskinin yanı sıra, kemoterapinin kesilmesi ve gecikmesi riski yüksek olduğu için, sağlıklı çocuklarla karşılaştırıldığında sınırlı immun cevaba rağmen terapinin tamamlanmasından itibaren 6 ay içinde olanları da kapsayacak şekilde kemoterapi alan tüm çocuklar için yıllık influenza aşısı halen önerilmektedir. Yođun kemoterapi alan veya kemik iliği transplantasyonu yapılan hastalarda aşı yerine antiviral profilaksi düşünölmelidir, çünkü bu hastalarda immünsüpresyon derecesi sebebiyle aşının immünojenik olma olasılığı düşüktür. Aile üyeleri ve sağlık hizmeti sunucuları da aşılanmalı ve aşılar yıllık olarak güncellenmeli, dahil edilen virus antijenlerinin dolaşımdaki suşlarla uyuştuğundan emin olunmalıdır ^(4,84).

Viral replikasyonla ilgili birçok bilgi 1999 yılından beri edinilmiş ve yeni grip ilaçlarının geliştirilmesi ve hem önleme hem de tedavide yeni protokoller için yeni deneysel hipotezler gelişim göstermiştir. Anti-influenza ilaçları, hastalığa karşı en etkili

silah olan aşılamanın önemli bir tamamlayıcısıdır. İnfluenza A ve B için etkili olan nöraminidaz inhibitörleri, oseltamivir ve zanamivirden oluşan tedavi, semptomların başlangıcından itibaren 48 saat içinde başlatılmalıdır. Zanamivir, inhale preparat halinde bulunan ve semptom başlangıcından itibaren 48 saat içinde başladığında genel popülasyonda influenza A'ya karşı etkili olduğu gösterilen bir sialik asit analogudur. Zanamivir, influenza A veya B enfeksiyonu olan HKHT alıcılarında da başarıyla kullanılmıştır. Önerilen zanamivir dozu 5 gün süreyle günde iki kez 10 mg'dır (veya iki puf). Büyük oranda influenza A H1N1 virusunda ve bazı influenza A H5N1 ve influenza B viruslarında oseltamivire karşı direnç gelişmiştir. Diğer taraftan, H3N2 virusları zanamivire karşı yüksek direnç gösterir, ancak oseltamivire duyarlı kalmaktadır. M2 inhibitör sınıfı (amantadin ve rimantadin), influenza A enfeksiyonu olan transplant alıcılarında da kullanılabilir, ancak yan etkileri ve antiviral direnç sebebiyle kullanımı sınırlıdır. Ribavirin ayrıca influenzaya karşı in vitro aktiviteye sahiptir ve potansiyel olarak diğer antivirallerle kombinasyon halinde kullanılabilir. Ek olarak, peramivir gibi yeni bileşikler ve kombinasyon antiviral tedaviler de klinik araştırmalarda incelenmektedir ^(1,4,100).

HKHT alıcılarında influenza virus enfeksiyonlarının araştırıldığı çalışmalardan Loria ve ark.⁽¹⁰¹⁾ Amerika'da 2003 ve 2005 kış sezonunda akut solunum yolu enfeksiyonu olan yatarak veya ayakta tedavi gören hematoloji-onkoloji hastası ve HKHT alıcısı 62 çocuktan alınan 78 nazal yıkantı örneği ile yaptıkları çalışmada real-time RT-PCR yöntemi ile örneklerin %6.4'ünde (5/78) influenza A virus olmak üzere 31'inde (%40) solunum yolu viruslarını tespit etmişlerdir. Ayrıca araştırmaya katılan çocukların sadece %8'inin influenza aşısı yapılmıştır. Çocukların yaş ortalamasının 9 yıl ve %60'ının erkek olduğunu bildirmişlerdir. Örneklerin %40'ı HKHT alıcısı çocuklara ait olup HKHT alıcısı olmayanların akut lösemi (21), aplastik anemi (2), Langerhans hücreli histiyositoz (3), solid tümör (5), orak hücre anemisi (3), myelodisplastik sendrom (1), otoimmün nötrojeni (1) ve Hodgkin lenfoma (1) hastalığı olan çocuklar olduğunu belirtmişlerdir.

Benites ve ark.⁽¹⁰²⁾ Brezilya'da kanser ve akut solunum yolu enfeksiyonu ve/veya ateşi olan pediatri hastalarında solunum yolu virus enfeksiyonlarının prevalansını değerlendirmek amacıyla Ocak 2011 ve Aralık 2012 döneminde 21 yaşından küçük akut solunum yolu enfeksiyonu olan çocukların nazofarengeal

örneklerini analiz etmişlerdir. İnfluenza virus (H1N1, B), rhinovirus, PIV, adenovirus, RSV, human parechovirus, human bocavirus, human metapneumovirus ve human coronavirus için multipleks real-time PCR (FTD, Respiratory pathogens, multiplex Fast Trade Kit, Malta) kullanılırken influenza virus tespitinde hızlı test (Kit Biotrin, Inc. Ireland) uygulamışlardır. Ortalama yaş 12 ± 5.2 olan araştırmalarında 104 kan ve nazofarengeal örneğini analiz etmişlerdir. Çocukların %51'i erkek, %68'i beyaz, %32'si tekrarlayan akut solunum yolu enfeksiyonuna sahip, %32'si önceden antibiyotik kullanmış, %19.8'i öksürüğü olan, %8'i akut solunum yolu enfeksiyonu olanlarla temasta bulunanlardan oluşmuştur. Çocuklarda ALL (%42.3) en yaygın neoplazi olmuştur. İnfluenza A 2 (%1.9), influenza B 3 (%2.9) ve influenza A H1N1 1 (%1) olmak üzere (toplam 6; %5.8) solunum yolu viruslarını 50 (%48) örnekte tespit etmişlerdir. Nötropenik 13 hastanın %13'ünde ateş gözlemiş ve 4'ünün (%30.7) virus varlığı açısından pozitif olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmalarında ölüm olmamıştır.

Dotan ve ark.⁽¹⁰³⁾ İsrail'de solid tümörü ve hematolojik malignensisi olan immüno-compromize çocuklarda pandemik influenza A H1N1'in klinik ve epidemiyolojik özelliklerini belirlemek amacıyla Ağustos 2009 ve Şubat 2011 tarihleri arasında pediatrik hematoloji onkoloji ünitesinde yaptıkları çalışmada demografik ve klinik verileri, H1N1 enfeksiyonu olduğundan şüphelenilen (yüksek ateş ile solunum semptomları olan veya olmayan) hospitalize edilmiş çocuklardan elde etmişlerdir. İnfluenza A H1N1 laboratuvar tanısı için nazofarengeal yıkantı örneklerini PCR yöntemini ile araştırdıkları çalışmalarında 40 çocukta 57 epizot tespit etmişlerdir. İnfluenza A H1N1 sonuçları alınincaya kadar tüm epizotlarda çocukları oseltamivir ve antibiyotik ile tedavi etmişlerdir. Tüm epizotların 13'ü (%22.8) influenza A H1N1 pozitif bulunmuştur. Malignitesi olan 40 çocuktan 16'sında lösemi, 10'unda lenfoma, 4'ünde nöroblastom ve 10'unda diğer maligniteler olduğunu gözlemlemişlerdir. H1N1 pozitif buldukları çocukların 2'si (%15.4) önceden influenza A H1N1 için bağışıklık kazanmış çocuklardır. PCR sonucu pozitif olan 3 (%23) ve negatif olan 1 (%2.3) çocuk pediatrik yoğun bakım ünitesine yatırılmış ve mekanik ventilasyon uygulanmıştır. Çalışmalarında hospitalize edilmiş pandemik influenza A H1N1 pozitif olan ve olmayan febril pediatrik onkoloji hastalarının nispeten iyi sonuç ile benzer demografik ve klinik tabloya sahip olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu durumun muhtemelen erken antiviral tedavi ve virusun nispeten düşük virülansa sahip olması sebebiyle gerçekleştiği

sonucuna varmışlardır. Bu hastalarda aşılamanın teşvik edilmesi gerektiğini vurgulamışlardır.

Schulert ve ark.⁽¹⁰⁴⁾ Amerika’da Ağustos 2009 ve Aralık 2010 tarihleri arasında hastaneye kabulünden 24 saat içinde solunum yolu viral panel istemi yapılan yatarak tedavi gören pediatri hastaları ile yaptıkları çalışmada solunum yolu virus sonuçları ve hastaneye yatış süresi arasındaki ilişkinin, hastanın özellikle hematoloji/onkoloji servisi olmak üzere servise kabulü ile bağlantılı olduğunu gözlemlemişlerdir. Ayrıca solunum yolu virusları açısından pozitif olan hastalarda daha kısa intravenöz antibiyotik uygulama süresi olduğunu, fakat bu durumun birincil kabul hizmetinden etkilendiğini tespit etmişlerdir. Çalışma süreleri boyunca influenza virus %2.8 (20) oranında bulunmuş olup solunum yolu viral panel pozitif olan 358 hastanın 31’inin (%9) hematoloji-onkoloji servisinde olduğunu bildirmişlerdir. Bazı ortak solunum yolu tanısı olan hastalarda kısa süreli antibiyotik tedavisi ve hastaneye yatış süresinin kısa olmasının solunum yolu viral paneli pozitif sonuçlar ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir.

Elbahlawan ve ark.⁽²²⁾ Amerika’da H1N1 ilişkili akut solunum yetmezliği olan kritik pediatrik onkoloji-hematoloji hastalarında klinik seyir ve sonuçları gözlemlemişlerdir. H1N1 enfeksiyonu olan 5 hastayı 2009-2010 influenza sezonunda St. Jude Children's Research Hospital yoğun bakım ünitesine kabul etmişlerdir. Tüm hastalara oseltamivir uygulamışlar, ancak oseltamivir direnci belirlenmiş olan 2 hastada intravenöz zanamivir geçmişlerdir. DFA ile vakaların yalnızca %60’ında (3/5) influenza A tespit ederken, tüm hastalar için influenza A için pozitif PCR sonucu elde etmişlerdir. Tiplendirme sonucu 4 örneği H1N1 olarak tespit etmişler ve bir örnek tiplendirilememiştir. Çalışma grubu deneyimlerine göre, H1N1 ilişkili akut solunum yetmezliği sırasında yoğun desteğin ve bu yüksek riskli popülasyonda oseltamivir dirençli H1N1 enfeksiyonun erken tanısı ve yönetiminin öneminin altını çizmişlerdir.

Caselli ve ark.⁽¹⁰⁵⁾ İtalya’da pediatrik hematoloji onkoloji merkezlerinde H1N1 pandemisinin geçerli etkisini ve mortalitesini belirlemeyi amaçladıkları çalışmada PCR yöntemini kullanarak bilinmeyen orjinli ateşi, influenza benzeri semptomları veya bronkopnömonisi olan hastalardan aldıkları faringeal swab örneklerini kullanmışlardır. H1N1 enfeksiyonunu 16’sı tedaviyi henüz bırakan, 2’si tanı aşamasında olan ve 44’ü tedavi alan olmak üzere 62 hastada tespit etmişlerdir. Yaşları 2 ile 19 yaş arasında olan (medyan 10 yaş) hastaların ilk tanılarının ALL (25, %40.3), nöroblastom (6, %9.6),

beyin tümörü (6, %9.6), non-Hodgkin lenfoma (5, %8), osteosarkom (4, %6.4), Ewing sarkomu (4, %6.4), miyelodisplazi (3, %4.8), AML (2, %3.2), Wilms tümörü (2, %3.2) ve aplastik anemi, agammaglobulinemi, kronik miyeloid lösemi, akut promiyelositik lösemi veya botryoid sarkom (her biri bir vaka, %1.6) olduğunu gözlemlemişlerdir. Çalışmalarında klinik seyir, 1 hastada şiddetli (yoğun bakım tedavisi gerektiren), 38 hastada orta şiddetli (hastanede tedavi gerektiren) ve geriye kalan 23 (%37) hastada ayakta tedavi olacak şekilde hafif seyirli olmuştur. H1N1 komplikasyonlarına bağlı olarak hiçbir hasta ölmezken 2 hastayı ilerleyen kanser sebebiyle kaybetmişlerdir; kalan tüm olgularda semptomlar 11 gün içinde tedavi edilmiştir. Vakalarının 10'unda klinik seyrin solunum sıkıntısı veya bronkopnömoni ile komplike olduğunu bildirmişlerdir. Hastaların %82'sine oseltamivir tedavisi uygulamışlardır. Vakaların %54'ünde kemoterapi tedavisi ortalama 21 gün geçici olarak kesilmiştir (4-43 gün aralığında). Sonuç olarak H1N1 enfeksiyonunun kanseri olan çocukların hiç birinde ölüme sebep olmadığını fakat, yoğunluğu azaltılmış anti-kanser tedavisi ile sonuçlandığını belirtmişlerdir.

Tasian ve ark.⁽¹⁰⁶⁾ Seattle'da Temmuz 2000 ve Haziran 2005 tarihleri arasında 24 pediatrik onkoloji hastasında influenza enfeksiyonu tespit etmişlerdir. Hastalarının %83'ü hematolojik veya solid malignansilerden dolayı kemoterapi almıştır. Hastaların üçte ikisini ortalama 7.4 gün süreyle hospitalize etmişlerdir. Planlanan kemoterapi tedavisinde hastaların %40'ında influenza enfeksiyonu sebebiyle gecikme yaşamışlardır. Primer influenza pnömonisi ve/veya solunum yetmezliği üç çocukta görülmüş ve dört klinik bulguda solunum desteği gerekli olmuştur. İnfluenza tanısı konulmasından 2 gün içinde hastaların %63'üne antiviral tedavi uygulamışlardır. Hastalarının 15'i (%63) erkek olup kanser olan 24 çocukta 20 (%83) influenza A ve dört influenza B (%17) atağı meydana gelmiş ve tüm influenza enfeksiyonlarının %4.7'sini oluşturmuştur. Uzun süreli influenza ile ilişkili hastalık sebebiyle üç hasta iki kez hastaneye kaldırılmıştır. Araştırmalarında altta yatan onkolojik tanılar ALL (10 hasta), AML (1 hasta), Hodgkin lenfoma (1 hasta), non-Hodgkin lenfoma (1 hasta), Langerhans hücreli histiyositoz (2 hasta), Wilms tümörü (2 hasta), osteosarkom (2 hasta), rabdomiyosarkom (2 hasta), nöroblastom (3 hasta) ve beyin sapı glioması (1 hasta) olmuştur. Yaptıkları bu çalışmada pediatrik onkoloji hastalarının ciddi influenza ilişkili morbidite yaşadığı sonuncuna varmışlardır. Viral solunum yolu enfeksiyonu

sezonunda influenza virus enfeksiyonu ve aynı zamanda bakteriyel veya mantar enfeksiyonunun, solunum yolu enfeksiyonu semptomları olan febril çocuklarda dikkate alınması gerektiğini vurgulamışlardır.

Mendoza Sánchez ve ark.⁽¹⁰⁷⁾ İspanya, Madrid'de yaptıkları çalışmada kanser veya HIV enfeksiyonu olan 14 yaş ve altındaki çocuklarda solunum yolu virus enfeksiyonlarının klinik önemini değerlendirmişlerdir. Demografik özellikleri, enfeksiyon ile ilişkili klinik sendromları, hospitalizasyon ihtiyacını, ilaç ile tedaviyi ve sonuçları analiz etmişlerdir. HIV ile enfekte olmuş 129 çocuğun 26'sında (%20) ve kanser olan 218 çocuğun 27'sinde (%12) olmak üzere 53 viral solunum yolu enfeksiyonu bildirmişlerdir. Solunum yolu enfeksiyonlarının 20'sinin (%38) nozokomiyal olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmalarında viral enfeksiyon tespit edilen 53 çocuğun 14'ünde (%26) influenza A virus ve 2'sinde (%4) influenza B virus bulunmuştur. İnfluenza A enfeksiyonu kanser hastalarının %3.2 (7/218), HIV enfeksiyonu olanların %5.4'ünde (7/129) görülmüştür. Antikanser tedavisi alan çocukların 12'si ALL, 6'sı nöroblastom, 2'si Wilms tümörü, 2'si rabdomiyosarkom, 1'i testiküler endodermal sinüs tümörü, 1'i anaplastik ependimoma, 1'i osteosarkom, 1'i miyelodisplastik sendrom ve 1'i AML tanısı almıştır. Genel olarak, 48 çocukta (%90) ÜSYE semptomları ve 9 çocukta (%17) solunum sıkıntısı gözlemlenmiştir. Çocukların 35'inde (%65) ateş vardı. Başvuruda 3 (%5.6) çocuğa bilinmeyen orijinli ateş tanısı konmuş ve nihai tanı RSV, influenza ve adenovirus enfeksiyonu ile ÜSYE olmuştur. Çalışmalarında 37 çocuk (%70) antibiyotik ve 9 çocuk (%17) antiviral ilaçlarla tedavi edilmiştir.

Carr ve ark.⁽¹⁰⁸⁾ Memphis'de Ocak 2002 ve Nisan 2009 tarihleri arasında yaptıkları çalışmada 4201 pediatrik onkoloji hastasının %2.5'inde (107/4201) influenza epizodu tespit etmişlerdir. İnfluenza A virusu %1.6 (70/4201), influenza B virusu ise %0.9 (37/4201) oranlarında bulmuşlardır. Araştırmalarında çocuklardan %64.4'ünün (69/107) hematolojik malignansı (lösemi ve lenfoma), %17.8'inin (19/107) solid tümörü olup %17.8'i (19/107) ise HKHT alıcısıdır.

Babor ve ark.⁽¹⁰⁹⁾ Almanya'da Düsseldorf Üniversitesi Çocuk Hastanesi'nin hemato-onkolojik biriminde Ekim 2009 ve Ocak 2010 tarihleri arasında pandemik 2009 influenza A H1N1 enfeksiyonu olan 21 vakanın retrospektif çalışmasını gerçekleştirmişlerdir. Araştırmalarında kız erkek oranı yaklaşık 1:1 olan vakaların 11'i

erkek, 10'u kız olup tanıda medyan yaş 12 yıl 10 aydır (8 ay ila 19 yıl 7 ay aralığında). Pandemik 2009 influenza A H1N1 enfeksiyonu olan 21 çocuktan 7'sinde (%33) akut lösemi (4'ünde ALL, 2'sinde relaps ALL ve 1'inde relaps AML), 4'ünde lenfoma, 2'sinde osteosarkom ve 1'inde rabdomiyosarkom ve 1'inde miyelodisplastik sendrom olduğunu bildirmişlerdir. Malign olmayan hematolojik hastalıkları olan hasta grupları ise Fanconi anemisi olan 2 çocuk ve sferositoz, piro-poikilositoz ve beta talasemisi bulunan hastaları içermektedir. En sık görülen belirtiler ateş (>38.5°C), öksürük (%100) ve burun akıntısı (12 hasta, %57) olmuştur. Sadece 1 hastada gastrointestinal semptom görülmüştür. Ampirik intravenöz antibiyotik tedavisi ve klinik gözlem için 6 hasta hastaneye yatırılmış, 15 çocuk ayakta tedavi görmüştür. Yüksek dozda veya yoğun kemoterapi ile pandemik 2009 influenza A H1N1 enfeksiyonu geçiren 2 hastada yoğun bakım veya mekanik ventilasyon gerekli olmamış ve her ikisi de antiviral tedavi altında iyileşmiştir. Hastalarda görülen komplikasyonların hospitalizasyon (%19), oksijen takviyesi gereksinimi, antineoplastik tedavinin geciktirilmesi/kesilmesi ve antibiyotik ve antipiretiklerin uzun süreli uygulanması olduğunu bildirmişlerdir. Pandemik 2009 influenza A H1N1 aşısı yapılan 3 çocuktan ikisine aşılandıktan 1 gün sonra, 1 çocuğa ise aşı yapıldıktan 19 gün sonra sonra pandemik 2009 influenza A H1N1 tanısı konulmuştur. İnceledikleri hasta popülasyonunda pandemik 2009 influenza A H1N1 enfeksiyonunun çoğu vakada hafif seyrettiğini, ancak hastaların bir kısmında morbiditede önemli derecede artışa ve antikanser tedavisinde kesinti ve gecikmeye sebep olduğu sonucuna varmışlardır.

Cost ve ark.'larının⁽¹¹⁰⁾ Teksas, Amerika'da 27 Nisan ve 5 Aralık 2009 tarihleri arasında yaptıkları çalışmada ILI olan 218 pediatrik onkoloji hastasından elde edilen nazofarengeal swab veya bronkoalveolar lavaj örnekleri klinik viroloji laboratuvarında test edilmiştir. Örnekleri hızlı influenza testi (Directigen™ EZ Flu A+B, Becton Dickinson, Sparks, MD), DFA (D3 Ultra™ Respiratory Virus Screening and ID Kit, Diagnostic Hybrids, Athens, OH) veya Respiratory Viral Panel PCR ile analiz etmişlerdir. Kanser veya HKHT olan 218 hastadan 30'unda (%13.7) influenza A mevcut olup ALL (18), merkezi sinir sistemi tümörleri (4), CML (1), Ewing sarkomu (1), Hodgkin lenfoma (1), LCH (1), ağır aplastik anemi (1) ve HKHT (3) olan hastalarda doğrulanmış (5) ve muhtemel H1N1 (25), hızlı test (%73), DFA (%13) veya Respiratory Viral Panel PCR (%13) testleriyle toplam 30 hastada doğrulanmıştır. Bu

çalışmada çocuklarda en sık görülen belirtiler ateş (28; %93), öksürük (29; %97) ve burun akıntısı (25; %83) olup boğaz ağrısı (6; %20), baş ağrısı (5; %17) ve miyaljiler (2; %7) seyrek olarak görülmüştür. Ayrıca hastalarda iştahsızlık (12; %40) ve kusma (5; %17), diare (4; %13), karın ağrısı ve bulantı (her biri 3; %10) olmak üzere gastrointestinal semptomlar raporlamışlardır. İlk değerlendirmeden sonra hastaların 10'u (%33) hospitalize edilmiş ve 20 hasta ayakta tedavi görmüştür. Kemoterapi 5 hastada ertelenmiştir. Oseltamivir tedavisini 28 hastaya uygulamışlar ve 1 hastanın oseltamivire dirençli bir suş geliştirmesi sebebiyle ve zanamivir ile tedavi etmişlerdir. Mevsimsel influenza aşısı 18 (%60) çocukta (7 yatan hasta) 2009 H1N1 influenza hastalığından önce yapılmışken 11 (%37) hasta akut influenza hastalığından sonra H1N1 influenza aşısı olmuştur. Sonuç olarak kanser ve HKHT olan çocuklarda 2009 influenza H1N1 enfeksiyonunun çoğu hastada hafif seyredebileceği, ancak ciddi komplikasyonlara sebep olabileceği yorumunda bulunmuşlardır.

Hakim ve ark.⁽¹¹¹⁾ Ekim 2007 ile Mayıs 2011 tarihleri arasında Tennessee, Memphis'teki St. Jude Çocuk Araştırma Hastanesi'nde ALL tedavi protokolüne kayıtlı hastalardan (≤ 18 yaş) aldıkları nazofarengeal swab veya yıkama, trakeal aspirat ve/veya bronkoalveoler lavaj örneklerinde influenza A ve B, PIV, human metapneumovirus, adenovirus ve RSV tespiti için viral kültür, DFA ve PCR yöntemlerini kullanmışlardır. ALL tedavisi alan ve akut solunum yolu hastalığı epizodu olan 133 çocukta en sık görülen virus 51 (%38) epizot ile influenza virus ve 45 (%34) epizot ile RSV'dir. İnfluenza virus ve RSV ile solunum yolu enfeksiyonlarında mevsimsel dağılım Şubat ayında pik yapmıştır. Viral akut solunum yolu hastalığının 133 epizodunda hastaların %61'i hospitalize edilmiş, %26'sı komplikasyonlu seyir izlemiş, %80'inde kemoterapide gecikme olmuş ve %0.7'si hayatını kaybetmiştir. Bu çalışmada ALL olan çocuklarda viral akut solunum yolu hastalığı insidansının düşük olmasına rağmen, ilişkili morbidite, mortalite ve kemoterapideki gecikmenin klinik olarak anlamlı olduğu sonucuna varmışlardır.

Lee ve ark.⁽¹¹²⁾ Ocak 1999 ve Eylül 2011 tarihleri arasında 41 Amerika çocuk hastanesinden ALL hastalığının başlangıcında olan 0-19 yaş aralığındaki 10698 çocuk ile retrospektif kohort araştırması yapmışlardır. Çalışmalarında influenzaya bağlı hastaneye yatışların oranı ayda 100000 kişide 618.3 olmuştur. Hastane mortalitesi %1 (%95 güven aralığı, %0.3-%2.3) olup tanıdan itibaren <6 ay (%1.6; %95 güven aralığı,

%0.4-%4.5) ve <2 yaş (%6.7, %95 güven aralığı, %1.3-%22.7) çocuklarda en yüksek görülmüştür. İnfluenzaya bağlı hospitalizasyonlarda toplam kalış süresi, geniş spektrumlu antibiyotik kullanma ve yoğun bakım süresi influenza kaynaklı olmayan hastaneye yatışlarla karşılaştırıldığında belirgin olarak daha yüksek olmuştur. Sonuç olarak ALL'li çocuklarda inflenzaya bağlı hastaneye yatışların yüksek olduğunu ve önemli ölçüde artan kaynak kullanımı ve mortalite ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir.

Babady ve ark.⁽¹¹³⁾ New York'da, Memorial Sloan-Kettering Kanser Merkezi'nde pediatrik hastalarda xTAG RVP Fast (Luminex Diagnostics, Toronto, Canada) ve FilmArray RVP (FA RVP; Idaho Technology, Salt Lake City, UT) olmak üzere RSV, influenza A ve B virus, PIV 1, 2, 3 ve 4, human metapneumovirus, adenovirus, enterovirus-rhinovirus, coronavirus NL63, HKU1, 229E ve OC43 ve bocavirus varlığını araştıran iki ticari kitin performansını karşılaştırmışlardır. Temmuz 2010 ve Mart 2011 tarihleri arasında ÜSYE ve ASYE olan 173 pediatrik hastadan (0-21 yaş arası) alınan ve daha önce DFA ve viral kültürle test edilen 358 solunum yolu örneğini test etmişlerdir. Çalışma gruplarında en sık rastlanan altta yatan hastalık hematolojik maligniteler (%46.8) ve çoğunlukla akut lösemi (%85) olmuştur. Hastaların %71.6'sında (124/173) ÜSYE ve %63.6'sında (110/173) ASYE semptomları görülmüştür. Hastalarda test süresince ateş ($\geq 38^{\circ}\text{C}$) %48.6 (84/173) oranında iken 14 (%8) hastada herhangi bir solunum semptomu gözlenmemiştir. İnfluenza A virus tespiti, DFA/kültür tarafından saptanmayan ilave influenza A izolatlarını tespit eden her iki test olan hem xTAG RVP Fast hem de FA RVP için benzer bulunmuştur. xTAG RVP Fast, hem DFA/kültür hem de FA RVP ile tespit edilen iki influenza A virus 2009 H1 örneğinden birini tespit etmemiş ve bir influenza B örneğini influenza A H-3 olarak yanlış tanımlamıştır (DFA/kültür ve FA RVP'de influenza B olarak tanımlanmış). İnfluenza A için xTAG RVP Fast sensitivite ve spesifitesini sırasıyla %95.2 ve %99.6 ve FA RVP'nin sensitivite ve spesifitesini %100 olarak belirlemişlerdir. İnfluenza A virus %5.8 (21/358), influenza B virus ise %0.5 (2/358) oranlarında bulunmuştur. Çalışma izolatları arasında kültürde iki influenza B virus tespit edilmiş, xTAG RVP Fast iki izolattan birini, FA RVP ise her ikisini de tespit etmiştir.

Tantawy ve ark.⁽¹¹⁴⁾ Mısır'da Mart 2011 ve Şubat 2012 tarihleri arasında yaptıkları çalışmada hematolojik ve solid malignansileri olan 90 çocukta %37.7'sinde (34/90) viral patojen tespit etmişlerdir. İnfluenza A %17.8 (16/90) ve influenza B %4.4

(4/90) olmak üzere araştırmalarında en sık görülen influenza virus olup PIV 1 %10 (9/90), PIV 3 %3.3 (3/90) oranlarında bulunmuştur.

Srinivasan ve ark.'larının⁽¹¹⁵⁾ 2000 ve 2009 yılları arasında Memphis, Amerika'da toplam 820 lösemi veya lenfoma tanılı çocuğa ait örneklerde solunum yolu viruslarını araştırmışlardır. İnfluenza A %9.7 (80/820), influenza B %4.8 (39/820) olmak üzere influenza virus enfeksiyonlarını %14.5 (119/820) oranında tespit etmişlerdir. Çocuklarda PIV %10 (83/820), RSV %7.1 (59/820) ve human metapneumovirus %1.5 (12/820) oranlarında bulunmuştur.

Ülkemizde yapılan çalışmalardan Özdemir ve ark.⁽¹¹⁶⁾ İstanbul'da influenza salgını sırasında (1 Kasım 2009-14 Ocak 2010) pediatri kliniğinden 187 çocuğa ait nazofaringeal ve bronkoalveolar örneklerinde influenza A H1N1 tespiti için kullandıkları PCR yöntemi ile 63 hastayı (%33.6) pozitif bulmuş ve bunlar arasında hematolojik hastalığı olan 28 çocuğun 10'unun (%35.7) pozitif olduğunu bildirmişlerdir. Altta yatan hematolojik hastalığı olan 10 çocuktan 3'ünde ALL, 2'sinde medulloblastom, 1'inde AML, 1'inde osteosarkom, 1'inde yumuşak doku sarkomu, 1'inde hepatoblastom ve 1'inde hereditör sferositoz görölmüştür. Hastaların medyan yaşları 5 (1-17 yaş aralığı) olup 5'i (%50) erkektir. Çocuklarda en sık görülen belirtiler ateş (%100) ve öksürük (% 90), daha az görülen belirtiler ve semptomlar ise boğaz ağrısı (7 hasta), burun akıntısı (5), miyalji (4), kusma (2) ve ishaldir (1). Febril nötropeni tanısı ile 5 hastaya sistemik antibiyotik tedavisi uygulamışlardır. Hastaların 4'ü yatarak tedavi görmüş, diğerlerini tanıdan sonra hospitalize etmişlerdir. Oseltamivir ile tedavi edilen 8 hastanın hepsi ilacı iyi tolere etmiştir. Kanser olan 9 hastadan 4'ünde planlanan kemoterapide 7-15 gün gecikme olmuştur. Pandemik H1N1 influenza enfeksiyonunun kanser ve/veya hematolojik hastalığı olan çocuklarda hafif semptomlara sebep olmakla birlikte, antikanser tedavisinde gecikme ve hospitalizasyon ve antibiyotik kullanımında artış ile sonuçlandığını vurgulamışlardır.

Yöntem ve ark.⁽¹¹⁷⁾ İzmir'de yaptıkları çalışmada lösemi tedavisi alan 98 çocuktan 8'inde (%8.1) pandemik H1N1 influenza virus tespit etmişler ve hastaların 2'si (%25) kaybedilmiştir.

Çalışmamızda 134 çocukta %35'i (47/134) influenza A virus, %6'sı (8/134) influenza B olmak üzere %41 (55/134) oranında influenza virus tespit edilmiştir.

İnfluenza A H1N1 %18.7 (25/134), influenza AH3N2 ise %16.4 (22/134) oranlarında bulunmuştur.

İnfluenza virus için %41 (55/134) olan bulgumuz Amerika'da Hakim ve ark.'larının %38 oranı ile benzer olup, Amerika'da Srinivasan ve ark.'larının %14.5 oranından yüksektir ^(111,115).

Bu çalışmada %35 olarak bulunan influenza A virus oranı diğer ülkelerde yapılan çalışmalardan Amerika'da Loria ve ark.'larının %6.4, Brezilya'da Benites ve ark.'larının %1.9, Amerika'da yapılan başka bir çalışmada Srinivasan ve ark.'larının %9.7, Mısır'da Tantawy ve ark.'larının %17.8, İspanya'da Mendoza Sánchez ve ark.'larının %3.2, yine Amerika'da Carr ve ark.'larının %1.6, Cost ve ark.'larının %13.7 ve Babady ve ark.'larının %5.8 oranlarından oldukça yüksektir ^(101,102,107,108,110,113-115). İnfluenza A virus oranlarımızın diğer çalışmalara göre daha yüksek olmasının sebebi olarak hastaların hiçbirinin influenzaya karşı aşılanmamış olması ve çoğunluğunun yatan hastalar olup enfeksiyonun nozokomiyal olabileceği düşünülmüştür.

İsrail'de Dotan ve ark. tarafından yapılan araştırmada tespit edilen %22.8 influenza A H1N1 virus oranı çalışmamıza ait %18.7 oranına benzerdir. Ayrıca bu bulgumuz Brezilya'da Benites ve ark.'larının %1 ve İzmir'de Yöntem ve ark.'larının %8.1 oranlarından oldukça yüksek, ülkemizde Özdemir ve ark.'larının İstanbul'daki çalışmalarına ait %33.6 bulgusundan oldukça düşüktür ^(102,103,116,117).

Çalışmamızda pediatrik onkoloji ve hematoloji hastalarında influenza B virusa ait %6 oranı Amerika'da Babady ve ark.'larının %0.5, Amerika'da Carr ve ark.'larının %0.9 ve Brezilya'da Benites ve ark.'larının %2.9 oranlarından yüksek, Mısır'da Tantawy ve ark.'larının %4.4 ve Amerika'da Srinivasan ve ark.'larının %4.8 oranlarına ise yakındır ^(102,108,113-115).

Toplam pozitiflik oranı çalışmamızda 2014-2015 2. ve 20. haftalar arasında influenza sezonunda %62.5 olup bu oran WHO Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS) Türkiye bulgusu %29.8 ve aynı sezonda Türkiye Halk Sağlığı Kurumu 40. ve 20. haftalar arasında Türkiye'de sentinel sürveyans kapsamında bulunan %23.8 oranlarından yüksektir ^(118,119). Pozitiflik oranımızın yüksek olmasının sebebi çalışma grubumuzun influenza virus için yüksek risk grubu olmasından kaynaklıdır.

Ülkemizde 2015-2016 grip sezonunda 40. ve 20. haftalar arasında GISRS verilerine göre %45.2 olan toplam influenza virus pozitifliği çalışmamızda tespit ettiğimiz %50 oranına benzerdir. Ayrıca bu bulgumuz Türkiye Halk Sağlığı Kurumu 2015-2016 grip sezonu sentinel süveyans oranı %31'den yüksektir ^(118,120).

İnfluenza virus 2015-2016 sezonu Türkiye Halk Sağlığı Kurumu sentinel/nonsentinel süveyans sonuçlarına göre Adana'da toplam pozitiflik %53.2'dir ve çalışmamızda %50 olan pozitiflik oranına benzerdir ⁽¹²⁰⁾.

Türkiye'de 2016-2017 influenza virus sezonunda Türkiye Halk Sağlığı Kurumu %24.9 oranı aynı sezonda çalışmamızda tespit edilen %33.3 oranından biraz düşüktür ⁽¹²¹⁾.

Avrupa'da 2014-2015 grip sezonunda %37 influenza virus oranı araştırmamızdaki %62.5 oranından oldukça düşük, 2015-2016 sezonunda %50 olan bulgumuz %36.6 oranından yüksek ve 2016-2017 sezonunda %33.3 influenza virus pozitiflik oranımız Avrupa'nın %35.7 oranına benzerdir ⁽¹²²⁻¹²⁴⁾.

Çalışmamızda influenza A virus alt tipleri ve influenza B virus ile enfekte vakaların influenza sezonlarına göre dağılımında 2014-2015 sezonunda en sık tespit edilen %35.4 (17/48) oranıyla H1N1 alt tipi, 2015-2016 sezonunda %22.2 (8/36) oranıyla H3N2 ve 2016-2017 sezonunda %19 (4/21) oranıyla yine H3N2 alt tipi olmuştur.

Flu News Europe verilerine göre Avrupa'da 2014-2015 sezonunda influenza A H1N1 virus %5.4, influenza A H3N2 virus %17.9 ve influenza B virus %12.2, 2015-2016 sezonunda influenza A H1N1 virus %17, influenza A H3N2 virus %2.7 ve influenza B virus %16, 2016-2017 sezonunda ise influenza A H1N1 virus %0.4, influenza A H3N2 virus %26.6 ve influenza B virus %3.8 oranlarında tespit edilmiş olup 2016-2017 sezonunda çalışmamızdaki sonuçlara (H3N2 %19) benzer olarak Avrupa'da da (H3N2 %26.6) H3N2 alt tipi baskın bulunmuştur. Yine çalışmamızda 2014-2015 influenza sezonunda H1N1 (%35.4) ve 2015-2016 influenza sezonunda ise H3N2 (%22.2) baskın iken Avrupa'da bu sezonlarda baskın influenza A alt tipi sırasıyla H3N2 (%17.9) ve H1N1 (%17) olarak bildirilmiştir. Buna karşılık ülkemizde Türkiye Halk Sağlığı Kurumu sentinel süveyans sonuçlarına göre bulgularımızla uyumlu olarak 2014-2015 sezonunda H1N1 (%7.2) , 2015-2016 ve 2016-2017 sezonlarında H3N2 alt tipleri (sırasıyla %11.1, %17.1) baskın bulunmuştur ⁽¹¹⁹⁻¹²⁴⁾.

Çalışmamızda influenza virusların aylara göre dağılımına bakıldığında pediatrik onkoloji ve hematoloji hastalarında influenza A virus 2014-2015 sezonunda en fazla Şubat, Mart, Nisan (sırasıyla %62.5, %75, %60), 2015-2016 sezonunda Ocak, Şubat (sırasıyla %70, %62.5) ve 2016-2017 sezonunda Ocak, Şubat (sırasıyla %33.7, %33.3) aylarında tespit edilmiştir. İnfluenza B virus ise 2014-2015 sezonunda Nisan (%20), 2015-2016 sezonunda Mart, Nisan (sırasıyla %25, %25) ve 2016-2017 sezonunda Şubat (%66.7) aylarında en fazla bulunmuştur. GISRS verilerine göre ülkemizde 2014-2015 grip sezonunda influenza A virus Şubat, Mart ve Nisan (sırasıyla %12.7, %17.6, %15.7) aylarında en fazla tespit edilmiştir. İnfluenza 2015-2016 sezonunda ise influenza A virus Aralık, Ocak, Şubat (sırasıyla %25.6, %52.9, %35.9) aylarında en yoğun görülmüştür. İnfluenza A virus 2016-2017 sezonunda en sık Aralık, Ocak (sırasıyla %17.7, %37.9) aylarında bulunmuştur. İnfluenza B virus ise 2014-2015 sezonunda Mart, Nisan (sırasıyla %17.6, %18.4), 2015-2016 sezonunda yine Mart, Nisan (sırasıyla %24, %17.6) ve 2016-2017 sezonunda ise Şubat, Mart, Nisan (sırasıyla %8.9, %10, %9.9) aylarında en fazla bulunmuştur ⁽¹¹⁸⁾.

Çalışmamızda pediatrik onkoloji ve hematoloji hastalarında influenza A virus için real-time PCR testine göre DFA testinin sensitivitesi %83 olup diğer ülkelerde yapılan çalışmalardan Meksika'da %68.9, Kanada'da %76.7 oranlarından yüksek, İtalya'da %89 oranı ile benzerdir. Meksika'da yapılan çalışmaya ait %76.3 influenza A virus spesifite oranı çalışmamıza ait %97.7 oranından düşük olup bulgumuz Kanada'da %99.7 ve İtalya'da %99 spesifite oranları ile benzerlik göstermiştir ⁽¹²⁵⁻¹²⁷⁾.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde Ocak 2015 ve Eylül 2017 tarihleri arasında pediatrik onkoloji ve hematoloji hastalarında influenza virus enfeksiyonlarının real-time PCR ve DFA testleri ile araştırıldığı çalışmamızın sonuçları;

1. Toplam 134 pediatrik onkoloji ve hematoloji hastasının 97'si (%72.4) erkek, 37'si (%27.6) kızdı. Erkeklerin kızlara oranı 2.6 idi. Toplam 134 hastanın %13.4'ü 2 yaş ve altı, %24.6'sı 3-5 yaş, %30.6'sı 6-9 yaş, %31.3'ü 10 yaş ve üstü gruba aitti.
2. Pediatrik onkoloji ve hematoloji çalışma grubu çoğunlukla ALL (27; %20.1), talasemi (14; %10.4), Fanconi aplastik anemi, Nöroblastom, Non-Hodgkin lenfoma (her biri 10 hasta; %7.5) ve AML (9; %6.7) tanısı alan çocuklardan olmuştur.
3. Real-time PCR yöntemi ile onkoloji ve hematoloji hastası 134 çocukta influenza A virus %35, influenza B virus ise %6 oranlarında bulunmuştur. İnfluenza A virus pozitif 47 örneğin tiplendirilmesi sonucu influenza A H1N1 virus %18.7, influenza A H3N2 virus %16.4 oranında tespit edilmiştir.
4. İnfluenza virus tespit edilen pediatrik hastaların 39'u erkek (%70.9) ve 16'sı (%29.1) kız idi. Erkeklerin 6'sı (%85.7) 2 yaş ve altı grupta, 5'i (%55.6) 3-5 yaş, 11'i (%61.1) 6-9 yaş ve 17'si (%81) 10-19 yaş grubunda yer almıştır. Kızların ise 1'i (%14.3) 2 yaş ve altı grupta olup 4'ü (%44.4) 3-5 yaş, 7'si (%38.9) 6-9 yaş ve 4'ü (%19) 10-19 yaş grubundadır.
5. İnfluenza virus tespit edilen çocuklardan 19'u (%34.5) ALL, 8'i (%14.5) talasemi, 5'i (%9.1) rabdomyosarkom tanısı almış olup ve nöroblastom, primitif nöroektodermal tümörler, Non-Hodgkin lenfoma ve AML tanılarının her biri için 3 (%5.5) hasta influenza virus pozitif bulunmuştur.
6. En fazla görülen klinik belirtiler hastaların 88'inde (%65.7) ateş, 71'inde (%53) öksürük ve 63'ünde (%47) burun akıntısı olmakla birlikte diğer semptomlar (boğaz ağrısı, burun tıkanıklığı, solunum güçlüğü, takipne vb.) değişen oranlarda gözlenmiştir.

7. İnfluenza virus pozitifliği 2014-2015 sezonunda %62.5 olup en sık tespit edilen %35.4 (17/48) oranıyla H1N1 alt tipi, 2015-2016 sezonunda toplam pozitiflik %50 ve en fazla görülen %22.2 (8/36) oranıyla H3N2 alt tipi ve 2016-2017 sezonunda pozitiflik %33.3 ve en baskın %19 (4/21) oranıyla yine H3N2 alt tipi olmuştur.
8. İnfluenza A virus 2014-2015 sezonunda en fazla Şubat, Mart, Nisan (sırasıyla %62.5, %75, %60), 2015-2016 sezonunda Ocak, Şubat (sırasıyla %70, %62.5) ve 2016-2017 sezonunda Ocak, Şubat (sırasıyla %33.7, %33.3) aylarında tespit edilmiştir. İnfluenza B virus ise en sık 2014-2015 sezonunda Nisan (%20), 2015-2016 sezonunda Mart, Nisan (sırasıyla %25, %25) ve 2016-2017 sezonunda Şubat (%66.7) aylarında görülmüştür.
9. Pediatrik onkoloji ve hematoloji hastalarında influenza A ve B virus için real-time PCR testine göre DFA testinin sensitivitesi sırasıyla %83, %100 ve spesifitesi %97.7 ve %100 bulunmuştur.

Sonuç olarak çalışmamızda pediatrik onkoloji ve hematoloji hastalarında influenza A virus enfeksiyon insidansı %35 ve influenza B virus %6 oranlarında oldukça yüksek bulunmuştur. İnfluenza virus enfeksiyonları için yüksek risk grubu olan pediatrik onkoloji ve hematoloji hastalarında influenzaya bağlı ciddi komplikasyonların önlenmesi, enfeksiyon kontrol önlemlerinin alınarak nozokomiyal yayılımın engellenmesi, antikanser tedavisinde gecikmenin önlenmesi, hastanede kalış süresinin kısaltılması ve antibiyotik kullanımının azaltılması için influenza virusların real-time PCR ile erken tanısı önemlidir.

KAYNAKLAR

1. **Gasparini R, Amicizia D, Lai PL, Bragazzi NL, Panatto D.** Compounds with anti-influenza activity: present and future of strategies for the optimal treatment and management of influenza. Part I: influenza life-cycle and currently available drugs. *J Prev Med Hyg*, **2014**; 55(3):69-85.
2. **Taubenberger JK, Morens DM.** The pathology of influenza virus infections. *Annu Rev Pathol*, **2008**; 3:499-522.
3. **Vemula SV, Zhao J, Liu J, Wang X, Biswas S, Hewlett I.** Current approaches for diagnosis of influenza virus infections in humans. *Viruses*, **2016**; 8(4):96.
4. **Kumar D, Humar A.** Respiratory viral infections in transplant and oncology patients. *Infect Dis Clin North Am*, **2010**; 24(2):395-412.
5. **Kersun LS, Reilly AF, Coffin SE, Sullivan KE.** Protecting pediatric oncology patients from influenza. *Oncologist*, **2013**; 18(2):204-211.
6. **Peteranderl C, Herold S, Schmoldt C.** Human influenza virus infections. *Semin Respir Crit Care Med*, **2016**; 37(4):487-500.
7. **Bouvier NM, Palese P.** The biology of influenza viruses. *Vaccine*, **2008**; 26 Suppl 4:D49-53.
8. **Stevaert A, Naesens L.** The influenza virus polymerase complex: An update on its structure, functions, and significance for antiviral drug design. *Med Res Rev*, **2016**; 36(6):1127-1173.
9. **Matsuoka Y, Matsumae H, Katoh M, Eisfeld AJ, Neumann G, Hase T, Ghosh S, Shoemaker JE, Lopes TJ, Watanabe T, Watanabe S, Fukuyama S, Kitano H, Kawaoka Y.** A comprehensive map of the influenza A virus replication cycle. *BMC Syst Biol*, **2013**; 7:97.
10. **Webster RG, Govorkova EA.** Continuing challenges in influenza. *Ann N Y Acad Sci*, **2014**; 1323:115-1139.
11. **Neumann G, Kawaoka Y.** Transmission of influenza A viruses. *Virology*, **2015**; 479-480:234-246.
12. **McHardy AC, Adams B.** The role of genomics in tracking the evolution of influenza A virus. *PLoS Pathog*, **2009**; 5(10):e1000566.
13. **Ortiz JR, Neuzil KM, Rue TC, Zhou H, Shay DK, Cheng PY, Cooke CR, Goss CH.** Population-based incidence estimates of influenza-associated respiratory failure hospitalizations, 2003 to 2009. *Am J Respir Crit Care Med*, **2013**; 188(6):710-715.
14. **Taubenberger JK, Morens DM.** 1918 Influenza: the mother of all pandemics. *Emerg Infect Dis*, **2006**; 12(1):15-22.
15. **Hsieh YC, Wu TZ, Liu DP, Shao PL, Chang LY, Lu CY, Lee CY, Huang FY, Huang LM.** Influenza pandemics: past, present and future. *J Formos Med Assoc*, **2006**; 105(1):1-6.
16. **Kuiken T, Taubenberger JK.** Pathology of human influenza revisited. *Vaccine*, **2008**; 26 Suppl 4:D59-66.
17. **Blyth CC, Webb SA, Kok J, Dwyer DE, van Hal SJ, Foo H, Ginn AN, Kesson AM, Seppelt I, Iredell JR; ANZIC Influenza Investigators; COSI Microbiological Investigators.** The impact of bacterial and viral co-infection in severe influenza. *Influenza Other Respir Viruses*, **2013**; 7(2):168-176.

18. **Kash JC, Taubenberger JK.** The role of viral, host, and secondary bacterial factors in influenza pathogenesis. *Am J Pathol*, **2015**;185(6):1528-1536.
19. **Albright FS, Orlando P, Pavia AT, Jackson GG, Cannon Albright LA.** Evidence for a heritable predisposition to death due to influenza. *J Infect Dis*, **2008**; 197(1):18-24.
20. **Chironna M, Tafuri S, Santoro N, Prato R, Quarto M, Germinario CA.** A nosocomial outbreak of 2009 pandemic influenza A(H1N1) in a paediatric oncology ward in Italy, October-November 2009. *Euro Surveill*, **2010**; 15(1).
21. **Espinosa-Aguilar L, Green JS, Forrest GN, Ball ED, Maziarz RT, Strasfeld L, Taplitz RA.** Novel H1N1 influenza in hematopoietic stem cell transplantation recipients: Two centers' experiences. *Biol Blood Marrow Transplant*, **2011**; 17(4):566-573.
22. **Elbahlawan L, Gaur AH, Furman W, Jeha S, Woods T, Norris A, Morrison RR.** Severe H1N1-associated acute respiratory failure in immunocompromised children. *Pediatr Blood Cancer*, **2011**; 57(4):625-628.
23. **Marchant DJ, Bilawchuk L, Nish G, Hegele RG.** Virus-induced signaling influences endosome trafficking, virus entry, and replication. *Methods Enzymol*, **2014**; 534:65-76.
24. **Szewczyk B, Bieńkowska-Szewczyk K, Król E.** Introduction to molecular biology of influenza A viruses. *Acta Biochim Pol*, **2014**; 61(3):397-401.
25. **Liang R, Li H, Swanson JM, Voth GA.** Multiscale simulation reveals a multifaceted mechanism of proton permeation through the influenza A M2 proton channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2014**; 111(26):9396-9401.
26. **Hutchinson EC, Fodor E.** Transport of the influenza virus genome from nucleus to nucleus. *Viruses*, **2013**; 5(10):2424-2446.
27. **Taylor G.** Sialidases: structures, biological significance and therapeutic potential. *Curr Opin Struct Biol*, **1996**; 6(6):830-837.
28. **Guarner J, Shieh WJ, Dawson J, Subbarao K, Shaw M, Ferebee T, Morken T, Nolte KB, Freifeld A, Cox N, Zaki SR.** Immunohistochemical and in situ hybridization studies of influenza A virus infection in human lungs. *Am J Clin Pathol*, **2000**; 114(2):227-233.
29. **Guarner J, Paddock CD, Shieh WJ, Packard MM, Patel M, Montague JL, Uyeki TM, Bhat N, Balish A, Lindstrom S, Klimov A, Zaki SR.** Histopathologic and immunohistochemical features of fatal influenza virus infection in children during the 2003-2004 season. *Clin Infect Dis*, **2006**; 43(2):132-140.
30. **To KF, Chan PK, Chan KF, Lee WK, Lam WY, Wong KF, Tang NL, Tsang DN, Sung RY, Buckley TA, Tam JS, Cheng AF.** Pathology of fatal human infection associated with avian influenza A H5N1 virus. *J Med Virol*, **2001**; 63(3):242-246.
31. **Uiprasertkul M, Puthavathana P, Sangsiriwut K, Pooruk P, Srisook K, Peiris M, Nicholls JM, Chokephaibulkit K, Vanprapar N, Auewarakul P.** Influenza A H5N1 replication sites in humans. *Emerg Infect Dis*, **2005**; 11(7):1036-1041.
32. **de Jong MD, Simmons CP, Thanh TT, Hien VM, Smith GJ, Chau TN, Hoang DM, Chau NV, Khanh TH, Dong VC, Qui PT, Cam BV, Ha do Q, Guan Y, Peiris JS, Chinh NT, Hien TT, Farrar J.** Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia. *Nat Med*, **2006**; 12(10):1203-1207.

33. **Shope RE.** Swine influenza: I. Experimental transmission and pathology. *J Exp Med*, **1931**; 54(3):349-359.
34. **Shope RE.** Swine influenza: III. Filtration experiments and etiology. *J Exp Med*. **1931**; 54(3):373-385.
35. **Shope RE.** The infection of ferrets with swine influenza virus. *J Exp Med*, **1934**; 60(1):49-61.
36. **Shope RE.** The infection of mice with swine influenza virus. *J Exp Med*, **1935**; 62(4):561-572.
37. **Baskin CR, García-Sastre A, Tumpey TM, Bielefeldt-Ohmann H, Carter VS, Nistal-Villán E, Katze MG.** Integration of clinical data, pathology, and cDNA microarrays in influenza virus-infected pigtailed macaques (*Macaca nemestrina*). *J Virol*, **2004**; 78(19):10420-10432.
38. **Baas T, Baskin CR, Diamond DL, García-Sastre A, Bielefeldt-Ohmann H, Tumpey TM, Thomas MJ, Carter VS, Teal TH, Van Hoeven N, Proll S, Jacobs JM, Caldwell ZR, Gritsenko MA, Hukkanen RR, Camp DG 2nd, Smith RD, Katze MG.** Integrated molecular signature of disease: analysis of influenza virus-infected macaques through functional genomics and proteomics. *J Virol*, **2006**; 80(21):10813-10828.
39. **Kuiken T, Rimmelzwaan GF, Van Amerongen G, Osterhaus AD.** Pathology of human influenza A (H5N1) virus infection in cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*). *Vet Pathol*, **2003**; 40(3):304-310.
40. **Schrauwen EJ, de Graaf M, Herfst S, Rimmelzwaan GF, Osterhaus AD, Fouchier RA.** Determinants of virulence of influenza A virus. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **2014**; 33(4):479-490.
41. **Tscherne DM, García-Sastre A.** Virulence determinants of pandemic influenza viruses. *J Clin Invest*, **2011**; 121(1):6-13.
42. **de Wit E, Fouchier RA.** Emerging influenza. *J Clin Virol*. **2008**; 41(1):1-6.
43. **Mänz B, Schwemmle M, Brunotte L.** Adaptation of avian influenza A virus polymerase in mammals to overcome the host species barrier. *J Virol*, **2013**; 87(13):7200-7209.
44. **Bahadoran A, Lee SH, Wang SM, Manikam R, Rajarajeswaran J, Raju CS, Sekaran SD.** Immune responses to influenza virus and its correlation to age and inherited factors. *Front Microbiol*, **2016**; 7:1841.
45. **Soema PC, Kompier R, Amorij JP, Kersten GF.** Current and next generation influenza vaccines: Formulation and production strategies. *Eur J Pharm Biopharm*, **2015**; 94:251-263.
46. **Newton DW, Treanor JJ, Menegus MA.** Clinical and laboratory diagnosis of influenza virus infections. *Am J Manag Care*, **2000**; 6(5 Suppl):S265-275.
47. **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):713-717.
48. **Ginocchio CC, Zhang F, Manji R, Arora S, Bornfreund M, Falk L, Lotlikar M, Kowerska M, Becker G, Korologos D, de Geronimo M, Crawford JM.** Evaluation of multiple test methods for the detection of the novel 2009 influenza A (H1N1) during the New York City outbreak. *J Clin Virol*, **2009**; 45(3):191-195.

49. **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):1189-1194.
50. **Vanhems P, Bénét T, Munier-Marion E.** Nosocomial influenza: encouraging insights and future challenges. *Curr Opin Infect Dis*, **2016**; 29(4):366-372.
51. **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):500-511.
52. **Diederén BM, Veenendaal D, Jansen R, Herpers BL, Ligtoet EE, Ijzerman EP.** Rapid antigen test for pandemic (H1N1) 2009 virus. *Emerg Infect Dis*, **2010**; 16(5):897-898.
53. **Ginocchio CC, Zhang F, Manji R, Arora S, Bornfreund M, Falk L, Lotlikar M, Kowerska M, Becker G, Korologos D, de Geronimo M, Crawford JM.** Evaluation of multiple test methods for the detection of the novel 2009 influenza A (H1N1) during the New York City outbreak. *J Clin Virol*, **2009**;45(3):191-195.
54. **Crawford JM, Stallone R, Zhang F, Gerolimatos M, Korologos DD, Sweetapple C, de Geronimo M, Dlugacz Y, Armellino DM, Ginocchio CC.** Laboratory surge response to pandemic (H1N1) 2009 outbreak, New York City metropolitan area, USA. *Emerg Infect Dis*, **2010**; 16(1):8-13.
55. **Centers for Disease Control and Prevention (CDC).** Evaluation of rapid influenza diagnostic tests for detection of novel influenza A (H1N1) virus - United States, 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2009; 58(30):826-829.
56. **Faix DJ, Sherman SS, Waterman SH.** Rapid-test sensitivity for novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *N Engl J Med*, **2009**; 361(7):728-729.
57. **Louie JK, Guevara H, Boston E, Dahlke M, Nevarez M, Kong T, Schechter R, Glaser CA, Schnurr DP.** Rapid influenza antigen test for diagnosis of pandemic (H1N1) 2009. *Emerg Infect Dis*, **2010**; 16(5):824-826.
58. **Gordon A, Videá E, Saborío S, López R, Kuan G, Balmaseda A, Harris E.** Diagnostic accuracy of a rapid influenza test for pandemic influenza A H1N1. *PLoS One*, **2010**; 5(4):e10364.
59. **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(7):2658-2659.
60. **Ferguson BS, Buchsbaum SF, Wu TT, Hsieh K, Xiao Y, Sun R, Soh HT.** Genetic analysis of H1N1 influenza virus from throat swab samples in a microfluidic system for point-of-care diagnostics. *J Am Chem Soc*. **2011**; 133(23):9129-9135.
61. **Bhattacharyya A, Klapperich CM.** Thermoplastic microfluidic device for on-chip purification of nucleic acids for disposable diagnostics. *Anal Chem*, **2006**; 78(3):788-792.
62. **Cao Q, Fan A, Klapperich C.** Microfluidic chip fabrication and method to detect influenza. *J Vis Exp*, **2013**; (73).
63. **Poon LL, Leung CS, Chan KH, Lee JH, Yuen KY, Guan Y, Peiris JS.** Detection of human influenza A viruses by loop-mediated isothermal amplification. *J Clin Microbiol*, **2005**; 43(1):427-430.
64. **Kubo T, Agoh M, Mai le Q, Fukushima K, Nishimura H, Yamaguchi A, Hirano M, Yoshikawa A, Hasebe F, Kohno S, Morita K.** Development of a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay for detection of pandemic (H1N1) 2009 virus as a novel molecular method for diagnosis of pandemic influenza in resource-limited settings. *J Clin Microbiol*, **2010**; 48(3):728-735.

65. **Parida M, Shukla J, Sharma S, Ranghia Santhosh S, Ravi V, Mani R, Thomas M, Khare S, Rai A, Kant Ratho R, Pujari S, Mishra B, Lakshmana Rao PV, Vijayaraghavan R.** Development and evaluation of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and real-time detection of the swine-origin influenza A H1N1 virus. *J Mol Diagn*, **2011**; 13(1):100-107.
66. **Wu LT, Curran MD, Ellis JS, Parmar S, Ritchie AV, Sharma PI, Allain JP, Jalal H, Zambon M, Lee HH.** Nucleic acid dipstick test for molecular diagnosis of pandemic H1N1. *J Clin Microbiol*, **2010**; 48(10):3608-3613.
67. **Wu LT, Thomas I, Curran MD, Ellis JS, Parmar S, Goel N, Sharma PI, Allain JP, Lee HH.** Duplex molecular assay intended for point-of-care diagnosis of influenza A/B virus infection. *J Clin Microbiol*, **2013**; 51(9):3031-3038.
68. **Moore C, Hibbitts S, Owen N, Corden SA, Harrison G, Fox J, Gelder C, Westmoreland D.** Development and evaluation of a real-time nucleic acid sequence based amplification assay for rapid detection of influenza A. *J Med Virol*, **2004**; 74(4):619-628.
69. **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):495-497.
70. **Wang J, Tai W, Angione SL, John AR, Opal SM, Artenstein AW, Tripathi A.** Subtyping clinical specimens of influenza A virus by use of a simple method to amplify RNA targets. *J Clin Microbiol*, **2013**; 51(10):3324-3330.
71. **Gall A, Hoffmann B, Harder T, Grund C, Höper D, Beer M.** Design and validation of a microarray for detection, hemagglutinin subtyping, and pathotyping of avian influenza viruses. *J Clin Microbiol*, **2009**; 47(2):327-334.
72. **Zhao J, Ragupathy V, Liu J, Wang X, Vemula SV, El Mubarak HS, Ye Z, Landry ML, Hewlett I.** Nanomicroarray and multiplex next-generation sequencing for simultaneous identification and characterization of influenza viruses. *Emerg Infect Dis*, **2015**; 21(3):400-408.
73. **Bright RA, Medina MJ, Xu X, Perez-Orozco G, Wallis TR, Davis XM, Povinelli L, Cox NJ, Klimov AI.** Incidence of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005: a cause for concern. *Lancet*, **2005**; 366(9492):1175-1181.
74. **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):1307-1312.
75. **Lee HK, Tang JW, Loh TP, Kong DH, Lau YW, Yap HK, Koay ES.** Emergence of G186D mutation in the presence of R292K mutation in an immunocompromised child infected with influenza A/H3N2 virus, treated with oseltamivir. *J Clin Microbiol*, **2014**; 52(5):1749-1750.
76. **Rutvisuttinunt W, Chinnawirotpisan P, Simasathien S, Shrestha SK, Yoon IK, Klungthong C, Fernandez S.** Simultaneous and complete genome sequencing of influenza A and B with high coverage by Illumina MiSeq Platform. *J Virol Methods*, **2013**; 193(2):394-404.
77. **Ren X, Yang F, Hu Y, Zhang T, Liu L, Dong J, Sun L, Zhu Y, Xiao Y, Li L, Yang J, Wang J, Jin Q.** Full genome of influenza A (H7N9) virus derived by direct sequencing without culture. *Emerg Infect Dis*, **2013**; 19(11):1881-1884.
78. **Kuroda M, Katano H, Nakajima N, Tobiume M, Aina A, Sekizuka T, Hasegawa H, Tashiro M, Sasaki Y, Arakawa Y, Hata S, Watanabe M, Sata T.** Characterization of quasispecies of pandemic 2009 influenza A virus (A/H1N1/2009) by de novo sequencing using a next-generation DNA sequencer. *PLoS One*, **2010**; 5(4):e10256.

79. **Greninger AL, Chen EC, Sittler T, Scheinerman A, Roubinian N, Yu G, Kim E, Pillai DR, Guyard C, Mazzulli T, Isa P, Arias CF, Hackett J, Schochetman G, Miller S, Tang P, Chiu CY.** A metagenomic analysis of pandemic influenza A (2009 H1N1) infection in patients from North America. *PLoS One*, **2010**; 5(10):e13381.
80. **Whitehead TA, Chevalier A, Song Y, Dreyfus C, Fleishman SJ, De Mattos C, Myers CA, Kamisetty H, Blair P, Wilson IA, Baker D.** Optimization of affinity, specificity and function of designed influenza inhibitors using deep sequencing. *Nat Biotechnol*, **2012**; 30(6):543-548.
81. **Quail MA, Smith M, Coupland P, Otto TD, Harris SR, Connor TR, Bertoni A, Swerdlow HP, Gu Y.** A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics*, **2012**; 13:341.
82. **Brydak LB, Nitsch-Osuch A.** Prevention of influenza infection--a polish perspective. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, **2014**; 68:137-144.
83. **Soema PC, Kompier R, Amorij JP, Kersten GF.** Current and next generation influenza vaccines: Formulation and production strategies. *Eur J Pharm Biopharm*, **2015**; 94:251-263.
84. **Reilly A, Kersun LS, McDonald K, Weinberg A, Jawad AF, Sullivan KE.** The efficacy of influenza vaccination in a pediatric oncology population. *J Pediatr Hematol Oncol*, **2010**; 32(5):e177-181.
85. **Tran D, Science M, Dix D, Portwine C, Zelcer S, Johnston DL, Yanofsky R, Gassas A, Ethier MC, Sung L.** Pandemic (H1N1) 2009 influenza in Canadian pediatric cancer and hematopoietic stem cell transplant patients. *Influenza Other Respir Viruses*, **2012**; 6(6):e105-113.
86. **Nichols WG, Guthrie KA, Corey L, Boeckh M.** Influenza infections after hematopoietic stem cell transplantation: Risk factors, mortality, and the effect of antiviral therapy. *Clin Infect Dis*, **2004**; 39(9):1300-1306.
87. **Machado CM, Boas LS, Mendes AV, da Rocha IF, Sturaro D, Dulley FL, Pannuti CS.** Use of Oseltamivir to control influenza complications after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*, **2004**; 34(2):111-114.
88. **Jain S, Benoit SR, Skarbinski J, Bramley AM, Finelli L; 2009 Pandemic Influenza A (H1N1) Virus Hospitalizations Investigation Team.** Influenza-associated pneumonia among hospitalized patients with 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus--United States, 2009. *Clin Infect Dis*, **2012**; 54(9):1221-1229.
89. **Çiftçi E, Karbuz A, Kendirli T.** Influenza and the use of oseltamivir in children. *Turk Pediatri Ars*, **2016**;51(2):63-71.
90. **Jefferson T, Jones MA, Doshi P, Del Mar CB, Hama R, Thompson MJ, Spencer EA, Onakpoya I, Mahtani KR, Nunan D, Howick J, Heneghan CJ.** Neuraminidase inhibitors for preventing and treating influenza in healthy adults and children. *Cochrane Database Syst Rev*. **2014**; (4):CD008965.
91. **Ison MG, Gubareva LV, Atmar RL, Treanor J, Hayden FG.** Recovery of drug-resistant influenza virus from immunocompromised patients: A case series. *J Infect Dis*, **2006**; 193(6):760-764.
92. **Carr S, Ilyushina NA, Franks J, Adderson EE, Caniza M, Govorkova EA, Webster RG.** Oseltamivir-resistant influenza A and B viruses pre- and postantiviral therapy in children and young adults with cancer. *Pediatr Infect Dis J*, **2011**; 30(4):284-288.
93. **Crotty S, Cameron C, Andino R.** Ribavirin's antiviral mechanism of action: lethal mutagenesis? *J Mol Med (Berl)*, **2002**; 80(2):86-95.

94. **Chan-Tack KM, Murray JS, Birnkrant DB.** Use of ribavirin to treat influenza. *N Engl J Med*, **2009**; 361(17):1713-1714.
95. **Alves Galvão MG, Rocha Crispino Santos MA, Alves da Cunha AJ.** Amantadine and rimantadine for influenza A in children and the elderly. *Cochrane Database Syst Rev*, **2012**; 1:CD002745.
96. **Buchbinder N, Dumesnil C, Pinquier D, Merle V, Filhon B, Schneider P, Vannier JP.** Pandemic A/H1N1/2009 influenza in a paediatric haematology and oncology unit: successful management of a sudden outbreak. *J Hosp Infect*, **2011**; 79(2):155-160.
97. **Vu D, Peck AJ, Nichols WG, Varley C, Englund JA, Corey L, Boeckh M.** Safety and tolerability of oseltamivir prophylaxis in hematopoietic stem cell transplant recipients: A retrospective case-control study. *Clin Infect Dis*, **2007**; 45(2):187-193.
98. **Chik KW, Li CK, Chan PK, Shing MM, Lee V, Tam JS, Yuen PM.** Oseltamivir prophylaxis during the influenza season in a paediatric cancer centre: prospective observational study. *Hong Kong Med J*, **2004**; 10(2):103-106.
99. **Herold S, Hoegner K, Vadász I, Gessler T, Wilhelm J, Mayer K, Morty RE, Walmrath HD, Seeger W, Lohmeyer J.** Inhaled granulocyte/macrophage colony-stimulating factor as treatment of pneumonia-associated acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*, **2014**; 189(5):609-611.
100. **Sandrock C, Kelly T.** Clinical review: update of avian influenza A infections in humans. *Crit Care*, **2007**; 11(2):209.
101. **Loria C, Domm JA, Halasa NB, Heitman E, Miller EK, Xu M, Saville BR, Frangoul H, Williams JV.** Human rhinovirus C infections in pediatric hematology and oncology patients. *Pediatr Transplant*, **2015**; 19(1):94-100.
102. **Benites EC, Cabrini DP, Silva AC, Silva JC, Catalan DT, Berezin EN, Cardoso MR, Passos SD.** Acute respiratory viral infections in pediatric cancer patients undergoing chemotherapy. *J Pediatr (Rio J)*, **2014**; 90(4):370-376.
103. **Dotan A, Ben-Shimol S, Fruchtman Y, Avni-Shemer Y, Kapelushnik J, Ben-Harush M, Givon-Lavi N, Leibovitz E, Greenberg D.** Influenza A/H1N1 in pediatric oncology patients. *J Pediatr Hematol Oncol*, **2014**; 36(5):e271-274.
104. **Schulert GS, Lu Z, Wingo T, Tang YW, Saville BR, Hain PD.** Role of a respiratory viral panel in the clinical management of pediatric inpatients. *Pediatr Infect Dis J*, **2013**; 32(5):467-472.
105. **Caselli D, Carraro F, Castagnola E, Ziino O, Frenos S, Milano GM, Livadiotti S, Cesaro S, Marra N, Zanazzo G, Meazza C, Cellini M, Aricò M.** Morbidity of pandemic H1N1 influenza in children with cancer. *Pediatr Blood Cancer*, **2010**; 55(2):226-228.
106. **Tasian SK, Park JR, Martin ET, Englund JA.** Influenza-associated morbidity in children with cancer. *Pediatr Blood Cancer*, **2008**; 50(5):983-7.
107. **Mendoza Sánchez MC, Ruiz-Contreras J, Vivanco JL, Fernández-Carrión F, Baro Fernández M, Ramos JT, Otero JR, Folgosa D.** Respiratory virus infections in children with cancer or HIV infection. *J Pediatr Hematol Oncol*, **2006**; 28(3):154-159.
108. **Carr SB, Adderson EE, Hakim H, Xiong X, Yan X, Caniza M.** Clinical and demographic characteristics of seasonal influenza in pediatric patients with cancer. *Pediatr Infect Dis J*, **2012**; 31(11):e202-7.

109. **Babor F, Grund S, Siepermann M, Oommen PT, Kuhlen M, Schuster FR, Laws HJ, Wessalowski R, Bienemann K, Janßen G, Adams O, Borkhardt A, Meisel R.** Epidemiology and clinical characteristics of pandemic (H1N1) 2009 influenza infection in pediatric hemato-oncology and hematopoietic stem cell transplantation patients. *Transpl Infect Dis*, **2012**;14(6):589-594.
110. **Cost C, Brock E, Adams-Huet B, Siegel JD, Ardura MI.** 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus infection in pediatric oncology and hematopoietic stem cell transplantation patients. *Pediatr Blood Cancer*, **2011**; 56(1):127-133.
111. **Hakim H, Dallas R, Zhou Y, Pei D, Cheng C, Flynn PM, Pui CH, Jeha S.** Acute respiratory infections in children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*, **2016**; 122(5):798-805.
112. **Lee GE, Fisher BT, Xiao R, Coffin SE, Feemster K, Seif AE, Bagatell R, Li Y, Huang YS, Aplenc R.** Burden of influenza-related hospitalizations and attributable mortality in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatric Infect Dis Soc*, **2015**; 4(4):290-296.
113. **Babady NE, Mead P, Stiles J, Brennan C, Li H, Shuptar S, Stratton CW, Tang YW, Kamboj M.** Comparison of the Luminex xTAG RVP Fast Assay and the Idaho Technology FilmArray RP Assay for detection of respiratory viruses in pediatric patients at a cancer hospital. *J Clin Microbiol*, **2012**; 50(7):2282-2288.
114. **Tantawy AA, Barakat MM, Adly AA, Ebeid FS, Shamaa MF, Yassin M.** One-year prospective study of community acquired influenza and parainfluenza viral infections in hospitalized Egyptian children with malignancy: Single center experience. *Pediatr Hematol Oncol*, **2015**; 32(5):304-314.
115. **Srinivasan A, Wang C, Yang J, Inaba H, Shenep JL, Leung WH, Hayden RT.** Parainfluenza virus infections in children with hematologic malignancies. *Pediatr Infect Dis J*, **2011**; 30(10):855-859.
116. **Ozdemir N, Celkan T, Midilli K, Aygün G, Sinekbasan S, Kılıç O, Apak H, Camcıoğlu Y, Yıldız I.** Novel influenza a (H1N1) infection in a pediatric hematology oncology clinic during the 2009-2010 pandemic. *Pediatr Hematol Oncol*, **2011**; 28(4):288-293.
117. **Yöntem Y, İlker D, Yeşim O, Ayşen T, Gülcihan O, Özgür C, Meral AC, Burçak TG, Bengü D, Esin A, Selim B, Canan V.** Analysis of fatal cases of pandemic influenza A (H1N1) virus infections in pediatric patients with leukemia. *Pediatr Hematol Oncol*, **2013**; 30(5):437-444.
118. **World Health Organization, FluNet.** Influenza laboratory surveillance data from any week Erişim: (<http://apps.who.int/flumart/Default?ReportNo=12>) Erişim tarihi: 25.9.2017
119. **T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu.** Haftalık influenza (grip) sürveyans raporu, 20. Hafta (11-17 Mayıs 2015). 20 Mayıs 2015. Erişim: (https://www.thsk.gov.tr/dosya/birimler/bulasici_hastaliklar_db/dokumanlar/grip/influenza_raporu_20_hafta.pdf) Erişim tarihi: 01.03.2017
120. **T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu.** Haftalık influenza (grip) sürveyans raporu, 20. Hafta (16-22 Mayıs 2016). Haziran 2016. Erişim: (http://www.thsk.gov.tr/dosya/birimler/bulasici_hastaliklar_db/dokumanlar/grip/2016/influenza_Raporu_20_Hafta_20_06_2016.pdf) Erişim tarihi: 11.10.2016
121. **T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu.** Haftalık influenza (grip) sürveyans raporu, 20. Hafta (15-21 Mayıs 2017). Mayıs 2017. Erişim: (http://www.thsk.gov.tr/dosya/birimler/bulasici_hastaliklar_db/dokumanlar/grip/2017/Haftalik_InfluenzaGrip_Surveyans_Raporu_2017_20_hafta.pdf) Erişim tarihi: 25.05.2017

122. **Flu News Europe.** Weekly influenza surveillance, Week 20/2015 (11 - 17 May 2015). 27 Mayıs 2015. Erişim: (<https://flunewseurope.org/Archives>) Erişim tarihi:8.10.2017
123. **Flu News Europe.** Weekly influenza surveillance, Week 20/2016 (16 - 22 May 2015). 27 Mayıs 2016. Erişim: (<https://flunewseurope.org/Archives>) Erişim tarihi:8.10.2017
124. **Flu News Europe.** Weekly influenza surveillance, Week 20/2015 (15 - 21 May 2015). 26 Mayıs 2017. Erişim: (<https://flunewseurope.org/Archives>) Erişim tarihi:8.10.2017
125. **Zazueta-García R, Canizalez-Roman A, Flores-Villaseñor H, Martínez-Garcia J, Llausas-Vargas A, León-Sicairos N.** Effectiveness of two rapid influenza tests in comparison to reverse transcription-PCR for influenza A diagnosis. *J Infect Dev Ctries*, **2014**; 8(3):331-338.
126. **Gharabaghi F, Hawan A, Drews SJ, Richardson SE.** Evaluation of multiple commercial molecular and conventional diagnostic assays for the detection of respiratory viruses in children. *Clin Microbiol Infect*, **2011**; 17(12):1900-1906.
127. **Percivalle E, Rovida F, Piralla A, Rognoni V, Zavattoni M, Baldanti F, Marchi A, Gerna G.** Rapid typing, subtyping and RNA quantification of influenza virus type A strains in respiratory secretions. *New Microbiol*, **2008**; 31(3):319-327.

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Konya’da doğdu. 2000 yılında Vakıfbank İlköretim Okulu’ndan mezun oldu ve liseyi Seyhan ÇEAŞ Anadolu Lisesi’nde 2004 yılında tamamladı. 2010 yılında Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden mezun oldu. 2011 yılında Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda Tezli Yüksek Lisans programına başladı ve 2013 yılında mezun oldu. 2013 yılında Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda Doktora programına başladı.

