T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KONYA BÖLGESİNDE GRİP HASTALIĞI ETKENİ İNFLUENZA VİRÜSLERİNİN FARKLI YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Mehmet ÖZDEMİR

DOKTORA TEZİ

VİROLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman
Prof.Dr. Sibel YAVRU

KONYA- 2011

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KONYA BÖLGESİNDE GRİP HASTALIĞI ETKENİ İNFLUENZA VİRÜSLERİNİN FARKLI YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Mehmet ÖZDEMİR

DOKTORA TEZİ

VİROLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman
Prof.Dr.Sibel YAVRU

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 08102002 proje numarası ile desteklenmiştir

KONYA- 2011

ii.ÖNSÖZ

Her kış sezonunda hemen hemen her kişi solunum yolu virusları ile karşılaşarak semptomatik yada asemptomatik hastalık geçirmektedir. Dünyada her yıl insanların %10-%20'si, İnfluenza infeksiyonu geçirdiği tahmin edilmektedir. Dolayısı ile İnfluenza infeksiyonu, karşılaşılan en sık infeksiyon hastalıklarından biridir. Bu nedenle bu hastalığın erken tanısı ve tedavisi önem kazanmaktadır. Hastalık semptomları ortaya çıkınca erken tanı koymak, hem hastayı rahatlatmak açısından önemlidir hem de gereksiz antibiyotik kullanımının azaltılması açısından faydalıdır. Hasta kişinin tedavi edilmesi için, İnfluenza infeksiyonunun kesin tanısını sağlayan laboratuvar testlerine ihtiyaç vardır.

2007 yılında bu tez projesini planlarken Konya bölgesinde İnfluenza infeksiyonunun kesin tanısı için kullanılan rutin laboratuvar testi yoktu. Özellikle 2009 yılının kış sezonunda pandemik 2009 A virusunun bölgemizde de etkisini göstermesi araştırma bu konunun önemini ortaya koymuştur.

Bu çalışma sırasında örneklerin toplanması ve hızlı antijen testlerinin çalışılmasında yardımcı olan Meram Tıp Fakültesi Göğüs hastalıkları Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd.Doç.Dr.Turgut TEKE, İnfeksiyon hastalıkları Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd.Doç.Dr.İbrahim ERAYMAN, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı araştırma görevlileri Dr.Mehmet Emin DEMİRCİLİ ve Dr. N.Seval GÜNDEM'e, Sağlık Ocağı hekimleri Dr. Mehmet Şeker ve Dr. Mehmet Coşkuna ve çalışmaların gerçekleştirilmesinde yardımcı olan Veteriner Fakültesi Araştırma görevlileri Oğuzhan AVCI ve Ela ESİN'e teşekkürü borç bilirim. Bu araştırmanın gerçekleştirilmesinde bilimsel yardım ve desteklerini her zaman gördüğüm başta Viroloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Sibel YAVRU ve öğretim üyeleri Prof. Dr.Atilla Şimşek, Doç.Dr.Orhan YAPICI, Doç.Dr.Oya BULUT'a ve bilimsel çalışmalarımın her aşamasında desteğini gördüğüm Meram Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanımız Prof Dr.Bülent BAYSAL hocama sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Bu tez çalışmasını maddi yönden destekleyen Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü yetkililerine teşekkür ederim.

iii. İÇİNDEKİLER

SİMGE VE KISALTMALAR **iv**

1. GİRİŞ ……..... **1-25**

1.1. Epidemiyoloji ……..…… 3

1.1.1. Antijenik Drift ……. 4

1.1.2. Antijenik Şift……. 5

1.2. Sınıflandırma…… 5

1.3. Morfoloji ve Genom Yapısı…… 6

1.4. Polipeptitler ……..... 7

1.4.1. Hemaglütinin (HA) Proteini…… 8

1.4.2.Nöraminidaz (NA) Proteini…… 8

1.4.3. M1ve M2 Proteinleri……. 9

1.5. Replikasyon……..... 9

1.6. İnfluenza Viruslarında Genetik……..... 10

1.7. Virus Çoğaltılması…… 12

1.8. Kanatlıların İnfluenza Virusu……..... 13

1.9. Laboratuvar Tanısı…….……..... 14

1.9.1. Hücre Kültürü……. 15

1.9.2.İnfluenza Virusunun Embriyonlu Yumurtada Üretilmesi…….. 16

1.9.3. Virus Üremesinin Gösterilmesi ve İdentifikasyonu…….. 17

1.9.4.Hemaglütinasyon ve Hemadsorbsiyon…… 17

1.9.5.İnfluenzalarının Antijenik Tiplendirilmesi, Hemaglütinasyon İnhibisyon Deneyi…….. 18

1.9.6. Hızlı Kültür Yöntemleri……. 18

1.9.7. İmmünofloresan Antikor Boyama Yöntemi (IFA)…… 19

1.9.8. Ticari Hızlı Tanı Testleri…… 19

1.9.9. Moleküler Yöntemler……. 20

1.9.10.İnfluenza Virusunun Tanısında Real-time PCR'ın Kullanımı……. 21

1.10. İnsanlarda Patogenez ve İmmunite……. 22

1.11. Klinik Özellikler…….. 24

1.11.1. İnfluenza Virus Pnömonisi…… 25

1.11.2. İnfluenza B ve C Virus İnfeksiyonları…….. 25

2. GEREÇ VE YÖNTEM ……..... 26

2.1. Örneklerin Alınması ve İşlenmesi……. 26
2.2.Hızlı Antijen Testi……. 27
2.3.Hücre Kültürü (Shell Vial)……... 27
2.3.Shell-vialin inokulasyonı işlemleri……. 28
2.3.2.Shell-vialin boyama işlemleri……. 28
2.4.Multipleks PCR İşlemleri……..... 29
2.4.1. RNA İzolasyonu (Ekstraksiyon İşlemi)…….. 30
2.4.2.cDNA Sentezi …… 31
2.4.3.Multipleks PCR aşaması……. 31
2.4.4.Agaroz Jel Elektroforezi…… 32
3. BULGULAR……..... **33**
4. TARTIŞMA…….. 43
5. SONUÇ VE ÖNERİLER…… 54
6. ÖZET …… 55
7. SUMMARY……..... 56
8. KAYNAKLAR…….. 57
9.EKLER……..…….... 62
Ek 1.Etik Kurul Kararı…… 62
10.ÖZGEÇMİŞ…… 63

IV.SİMGELER VE KISALTMALAR

CDC	Center for Disease Control
CPE	sitopatik etki
DSÖ (WHO)	Dünya sağlık örgütü
EIA	Enzim İmmun Assay
HA	hemaglütinin
HAI	hemaglütinasyon inhibisyon
HEF	hemaglutinin–esteraz füzyon proteini
HPAI (Highly Pathogenic Avian İnfluenza)	yüksek derecede patojen İnfluenza virusu
IFA	İmmünofloresan Antikor Boyama
IFN	İnterferon
ILI (Influenza-like illness)	İnfluenza benzeri hastalık
LPAI(Low Pathogenic Avian İnfluenza)	düşük derecede patojen İnfluenza virus
MDCK Hücresi	Madin-Darby Köpek Böbrek Hücresi
M geni	matriks geni
NA	nöraminidaz
NS(non-structual)	Yapısal olmayan
PCR(Polimeraz Chain Reaction)	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PMKC	primer maymun böbrek hücresi
RT-PCR	revers transkriptaz PCR
RSV	Respiratuvar Sinsityal Virus
TCID(tissue culture infectious dose)	Doku kültürü infeksiyöz dozu
TPCK-tripsin	1-tosylamide-2-phenylethyl chloromethyl ketone-treated trypsin

1.GİRİŞ

İnfluenza A ve B virusları, epidemi ve pandemi oluşturabilen morbidite ve mortalitesi yüksek, viral solunum yolu infeksiyonları etkenleridir. Klinik olarak ateş, boğaz ağrısı, öksürük, halsizlik, miyalji ve baş ağrısı gibi belirtilerin görüldüğü virus infeksiyonları bulaşıcılığı yüksek olduğundan, toplumda hızla yayılabilir (Cox ve Kawaoka 1998). Kronik hastalığı olanlar, yaşlı bireyler, 10 yaş altı küçük çocuklar ve immün sistemi baskılanmış bireyler, İnfluenza virus infeksiyonları yakalanma ve komplikasyon geliştirme açısından yüksek risk taşırlar. Dünya üzerinde her sene erişkinlerin ise %10'u, çocukların yaklaşık %20'si, İnfluenza infeksiyonu geçirmektedir (Cox ve Ziegler 2003). Bu infeksiyonların oranını aşılama ile azaltmak ve erken tanısını sağlamak, antibiyotik kullanımının azaltılmasını sağlar. Ağır klinik durumlarda bu hastalığın erken tanısını koymak, uygun antiviral terapinin uygulanmasını imkan verir (Aslan 2006).

İnfluenza virus infeksiyonlarının diğer solunum yolu virus infeksiyonlarından klinik ayrımı, zordur çünkü grip hastalığında görülen ateş,başağrısı,burun akıntısı, öksürük, halsizlik, kırgınlık gibi semptomlar diğer solunum yolu virus infeksiyonlarında da görülür. Bu durumda hasta kişinin tedavi edilmesi için, İnfluenza infeksiyonunun kesin tanısını sağlayan laboratuvar testlerine ihtiyaç vardır (CDC, 2009). İnfluenza virus infeksiyonlarına bağlı olarak meydana gelen epidemi ve pandemileri önlemek için aşılama en etkili yöntemdir. Mevsimsel İnfluenza virus aşısı, dünyada dolaşımda olan iki A tipi insan İnfluenza virusu ve bir B tipi İnfluenza virusu karşı korumayı sağlamaktadır. Bu viruslarda görülen küçük veya büyük çapta antijenik değişikliklerle epidemi ve pandemiler meydana gelir. Bu değişiklerin takibinde, influenza surveyansı kullanılır. Bu sürveyans çalışmaları ile influenza virusuna ait epidemiyolojik ve virolojik veriler toplanır ve dolaşımdaki virusların identifikasyonunu ve antijenik özelliklerinin belirlenir (Scuffham ve West 2002, Harper ve ark 2005).

Bu hastalığın tanısında ve sürveyans çalışmalarında kullanılabilecek birçok farklı laboratuvar yöntemi vardır. Kullanılacak metodun karar verilmesinde, bu metodların avantaj ve dezavantajları değerlendirilerek laboratuvarın ve hastanın ihtiyacına göre karar verilir. Hızlı antijen testi gibi tanı yöntemleri, ilaç reçete edilen

ve infeksiyon tedavisinin yapıldığı sağlık kuruluşlarında kullanılır. Bu durumda amaç tanının hızlı konması ve tedavinin başlanmasıdır (Booth ve ark 2006).

İnfluenza virus sürveyansının yapıldığı bir referans laboratuvarında virus izolatlarının antijenik tipinin bilinmesi için, bir dizi çalışmanın gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Bu amaçla virus izolasyonu için embriyonlu tavuk yumurtası veya duyarlı bir hücre kültürü kullanılır. İnfluenza tanısında kullanılan laboratuvar metodlarının her birinin, kendine özgü avantaj ve dezavantajları vardır. Hücre kültürü tekniği ile virus izolasyonu yaygın olarak uygulanmamaktadır. Sonucun elde edilmesi için uzun süre gerekir ve virusun izolasyonu, örnek alımı ile taşınma koşullarına bağlı olarak değişir (Aslan 2006). Sürveyans ve referans laboratuvarlarında, antijenik varyantların analizi için hücre kültüründe veya embriyonlu tavuk yumurtasında virus izolasyonu gerekir. Moleküler teknikler hızlı ve duyarlı testler olmalarına rağmen, bu laboratuvarlarda yeterli olmamaktadır. Bu nedenle moleküler teknikler standart yöntemlere tamamlayıcı olarak kullanılması, influenza virus tanısının duyarlılığının ve özgüllüğünün arttırılmasında yardımcı olmaktadır (Ogilvie 2001).

Klinik tanının kısa sürede konması ve bu sayede sürveyans sisteminin iyileştirilmesini mümkün kılan, güvenilir sonuç veren çeşitli moleküler teknikler kullanıma girmiştir. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) bazlı bu yöntemlerin duyarlılığı yüksek olması, hızlı sonuç vermesi ve örnekte canlı virus olmaksızın tanıya imkan vermesi, kullanımlarını yaygınlaştırmıştır. PCR yöntemleri ile influenza virus tespitinin yanı sıra bazen, tip ve alttip ayrımı da yapılabilen yöntemler mevcuttur (Ellis ve Zambon 2002). Antijen saptayan mevcut hızlı testler göreceli olarak düşük duyarlılığa sahiptir bu nedenle, kullanımlarını hızlı tanı ile sınırlanmaktadır (Chan ve ark 2002).

Ülkemizde ve bölgemizde dolaşımda bulunan influenza viruslerinin laboratuvar tanısı son zamanlarda önem kazanmıştır. Çalışmamızda İnfluenza virusların tanısında kullanılan shell-vial hücre kültürü, multipleks PCR ve hızlı testlerin duyarlılık/özgüllüklerinin değerlendirilmesi ve birbirleri ile karşılaştırılması hedeflenmiştir. Bu şekilde, son dönemde önem kazanan viral patojenlerden biri olan influenza virusün kültürünün yapılması ve bölgemizdeki sıklığının tespit edilmesi ve hızlı test ve multipleks PCR'ın tanı değerinin ortaya konması mümkün olacaktır.

1.1.Epidemiyoloji

İnfluenza virüsleriyle her yıl kuzey yarımkürede kış aylarında oluşan salgınlar görülür. İnfluenza A virüsü hem insanlarda hem de hayvanlarda infeksiyon oluşturur. Antijenik şhift sonucu oluşan yeni bir suşa karşı toplumun bağışık olmaması nedeniyle pandemiler görülmektedir. Antijenik drift sonucu özellikle HA ve NA'ı kodlayan RNA segmentindeki değişiklikle oluşan farklı suş küçük salgınlara sebep olmaktadır. Hastalığın hızlı yayılması, dünyanın her tarafında görülmesi ve antijenik değişikliğe uğraması nedeniyle, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) bir iletişim ağı kurmuştur. Dünyadaki İnfluenza virüs sirkülasyonunda, hangi tip ve antijenik yapıdaki virüsün etken olduğunun bilinmesi ve izolasyonlarının saptanıp ilgili laboratuarlara bilgi aktarılması, önlem almada ve sonraki yıl için üretilecek aşı ile ilgili bilgi birikimini sağlamak yönünden önem taşır (Akarsu 2009).

Epidemiler aniden başlamaları, iki-üç hafta içinde pik yapmaları ve toplam beş-sekiz hafta devam ederek bir toplumda hastalık oluşturması ile karakterizedir. Okul çağı çocuklarının, virusun toplum içine yayılmasında önemli rolü olduğu bilinmektedir. Okula ve işe gidememe, pnömoni nedeniyle hastaneye yatış ve ölüm, genellikle grip epidemisi esnasında pik yapar. Pandemiler arasında meydana gelen epidemilerin boyutu çok değişkenlik gösterir, fakat genellikle yeni bir virus alt tipi meydana geldiği zaman daha büyük salgınlar görülür. Pandemik grip birden fazla kıtada görülür ve bütün yaş gruplarını etkiler. Geçen yüzyılda, üç büyük grip pandemisi olduğu konusunda görüş birliğivardır; 1918 İspanya gribi (A/H1N1), 1957 Asya gribi (A/H2N2) ve 1968 Hong Kong gribi (A/H3N2). 1977 yılından beri İnfluenza A virusunun iki alt tipi ile İnfluenza B virusu ile birlikte dolaşımdadır. İnfluenza A (H3N2) virusu 1968'deki pandemik şekli ortaya çıktığından beri varlığını devam ettirmektedir. İnfluenza B virusu da ilk izole edildiği 1940'tan beri dolaşımda görülmektedir. İnfluenza A virusun H1N1 alttipi de, 1977'den beri H3N2 alttipi ile birlikte dolaşımdadır. Grip sezonu boyunca bu üç grup virusun prevalansı, ülke içinde, ülkeler ve kıtalar arasında, yer ve zaman açısından değişebilir (Aslan 2006, Carhan ve ark 2009).

İnfluenza viruslarının başlıca öksürme, hapşırma yoluyla salınan virus yüklü solunum sekresyon damlacıkları ile yayıldığı kabul edilmekle birlikte, direkt bulaşın da olduğu bildirilmiştir. İnfluenza virusunun inkübasyon periyodu, göreceli olarak

kısadır (1-4 gün). İnfeksiyonun epidemi veya pandemilerde birçok kişide eşzamanlı olarak başlaması, tek bir infekte kişinin çok sayıda duyarlı kişiye virusu bulaştırabilmesinin sonucudur (Kesson 2007). İnfluenza viruslarının antijenik varyasyonlarının ve son epidemiyolojik özelliklerinin ortaya konduğu sürveyans verileri, her antijenik varyantın, dolaşımda olan bir önceki virusun yerine geldiğini göstermektedir. İnfluenza virus aktivitesinin mevsimsel özelliği ılımlı iklime sahip ülkelerde iyi gözlemlenmektedir. Bu ülkelerde grip epidemisinin, genellikle Aralık-Mart aylarında meydana gelmektedir. Solunum yolu virusları arasında, önemli derecede antijenik varyasyon gösteren tek virus İnfluenzadır. İnfluenza virusunda "drift" ve "şift" olmak üzere iki yüzey antijeninde, iki ana tip antijenik değişiklik görülür. Antijenik drift, İnfluenza A ve B viruslarında görülen HA ve NA'daki küçük değişikliklerle sonuçlanırken, antijenik şift sadece İnfluenza A virusunda meydana gelir ve gen segmentinin yer değiştirmesiyle oluşan büyük antijenik değişiklikler sonucu ortaya çıkar (Cox ve Kawaoka 1998, Cox ve Ziegler 2003).

1.1.1. Antijenik Drift

Antijenik drift, belli aralıklarla ortaya çıkan İnfluenza A ve B virus antijenik tipleri, insanlarda dönemsel ve bölgesel grip salgınlarına neden olmaktadır (Kesson 2007). İnfluenza A ve B viruslarının HA genlerinin izole edildiği tarihler ile evrim ağacındaki dizilişleri arasında, bir ilişkinin olduğunu anlaşılmıştır. Epidemiye neden olan insan İnfluenza A virusları arasında yapılan incelemelerde, bu viruslar arasındaki değişikliklerin en az iki antijenik bölgede meydana geldiği belirlenmiştir. İnsan İnfluenza A H1N1 ve H3N2 viruslarının HA'leri aynı hızda evrim geçirmektedir. HA, üç boyutlu yapısı sekans analizi yapılmış ve HA1'in A,B,C,D,E olmak üzere beş antijenik bölgeden oluştuğu anlaşılmıştır. Antijenik drift, HA'inin distal kısmında bulunan, bu antijenik bölgelerdeki aminoasitlerde nokta mutasyonu sonucu meydana gelir. Bu değişiklikler, önceki infeksiyonlarla oluşan antikorların bağlanmasını engellediğinden virus, konağı infekte eder. Antijenik drift esnasında, HA ve NA'ın aminoasitlerinin dizilişinde, %1'den az oranda değişiklik ortaya çıkmaktadır. Yeni antijenik tip ile eski izolatlar arasındaki antijenik farklılıklar, gelincik *(Mustela spp*) antiserumu ile tespit edilebilir. Antijenik drift, İnfluenza virusların NA'larında da benzer şekilde meydana gelir ve aminoasit dizilişinde farklılığa yol açar (Aslan 2006, Kesson 2007, Köksal 2010)

1.1.2. Antijenik Şift

Antijenik şift, sadece İnfluenza A viruslarında meydana gelir ve büyük antijenik değişikliklere neden olur. Antijenik şift, önceden dolaşımda bulunan izolatlardan immünolojik olarak farklı olan bir NA ve/veya HA sahip yeni bir alt tip İnfluenza virusunun, insanlarda görülmesidir. Antijenik şift meydana geldiği zaman, yeni suşun HA'inin daha önce dolaşımda olan suşların ilgili proteinlerinden, büyük oranda değişiklik gösterdiği saptanmıştır. Antijenik şiftler, düzensiz olarak görülen ve önceden engellenemeyen aralıklarla meydana gelen pandemilerden sorumludur (Cox ve Ziegler 2003). İnsanlarda yeni pandemik suşların, direkt transfer yoluyla geçtiğini ya da dolaşımda olan insan İnfluenza viruslarının kanatlıların İnfluenza viruslarıyla gen alışverişi yapması sonucu ortaya çıktığı gösterilmiştir. 1957'deki pandemik H2N2 Asya suşunun HA, NA ve PB1 genlerinin kanatlı virusundan, kalan diğer beş geninin ise insan H1N1 suşundan alınarak oluştuğu tespit edilmiştir (Wright ve Webster 2001, Cox ve Ziegler 2003).

İnsan ve domuz İnfluenza virusları çeşitli çalışmalarla genetik olarak aynı kökenli olduğu gösterilmiş ve domuz İnfluenza viruslarının insanlara belirli zaman aralıklarıyla aktarılmasının da, düşünüldüğünden daha sık olduğu gösterilmiştir. Pandemik virusların meydana çıkışının olası bir diğer yolu, yıllarca epidemiye yol açan fakat daha sonra saklı kalan ve pandemi oluşmasına kadar değişiklik göstermeyen virusların bulunmasıdır. 1977 Mayısında Kuzey Çin'de görülen ve 1950'de insan grip epidemisine neden olmuş olan virus genetik olarak tamamen identik olduğu saptanmıştır. Daha sonra bu virus, sonradan dünyanın geri kalanına da yayılmıştır. Söz konusu H1N1 virusunun 27 yıl boyunca dolaşımda görülmemesi, doğada donmuş olarak veya hayvan/insan genetik materyalinde tespit edilemeyen bir formda tutulduğu düşünülmüştür. Bu olasılıklardan en güçlü olanı, H1N1 virusunun soğukta donmuş olarak bir kaynakta saklandığı, daha sonra 1977 yılında tekrar insana geçiş yaptığı olasılığıdır (Wright ve Webster 2001, Cox ve Ziegler 2003, Aslan 2006).

1.2. Sınıflandırma

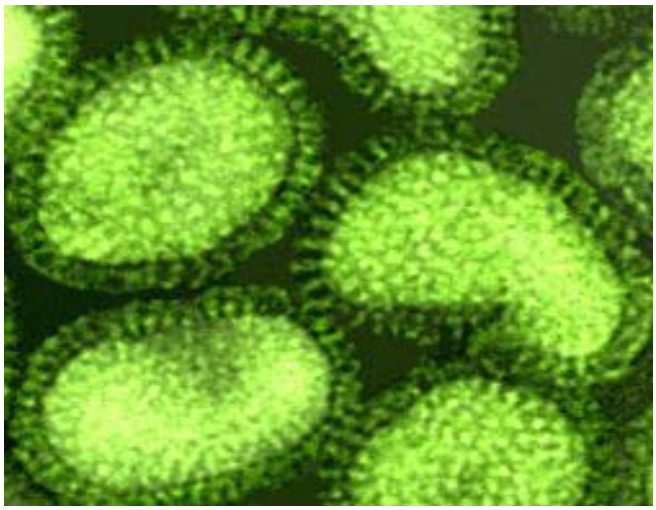
Orthomyxoviridae ailesinin üyeleri İnfluenza A, İnfluenza B, İnfluenza C virusleridir (Murray ve ark 2010). Nukleoprotein ve matriks proteinleri benzerdir. Hemaglutinin ve/veya nöraminidaz proteinlerinin farklılıkları ile birbirinden

ayrılırlar. Orthomyxovirusları zarflı, negatif polariteli, tek sarmallı, 80-120 nanometre çapında RNA virusudur. RNA segmentinin sayısı, cinslere göre farklılık gösterir. İnfluenza A ve B'de sekiz, İnfluenza C virusta yedi segment bulunur. İnfluenza A ve B, hemaglütinin (HA) ve nöraminidaz (NA) aktivitesine sahiptir. İnfluenza C'de ise NA yoktur fakat hem HA, hem de esteraz aktivisine sahip hemaglutinin–esteraz füzyon proteini (HEF) bulunur. İnfluenza A virusu, HA ve NA moleküllerinin antijenik özellikleri esas alınarak alt tiplere ayrılmış ve sınıflandırılmıştır. Günümüze kadar toplam 16 HA ve 9 NA alttipi tanımlanmıştır. Bunlar değişik kombinasyonlar halinde memelilerde bulunmaktadır (Cox ve Ziegler 2003, Murray ve ark 2010).

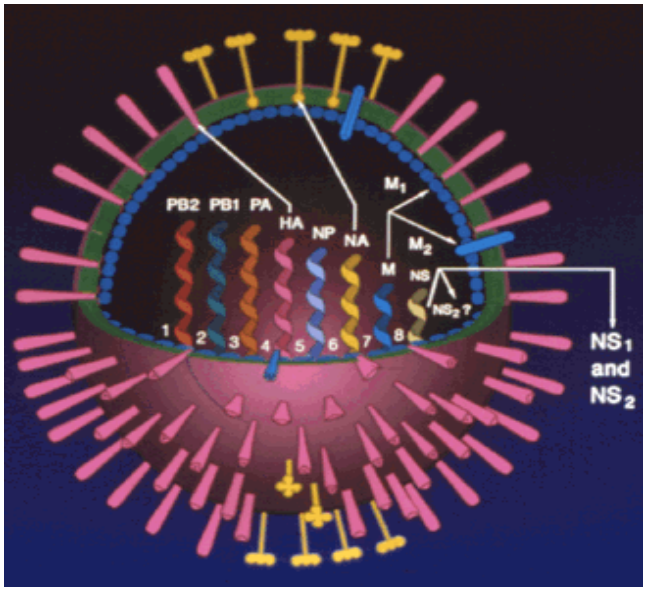
1.3. Morfoloji ve Genom Yapısı

İnfluenza virusunun elektron mikroskobu ile incelenmesinde, yaklaşık 120 nm çapında ve yuvarlak partiküller şeklinde görülmüştür (Şekil 1.1). İnsanlardan ilk izole edilen İnfluenza virusu ile, kültürde pasajdan sonra elde edilen virus morfolojik olarak farklılık göstermektedir. İnfluenza viruslarının, hücre kültürü veya embriyonlu yumurta pasajlarında genellikle yuvarlak morfoloji hakimdir. Morfolojik farklılığın oluşmasında matriks (M) geni başlıca belirleyici gendir (Wright ve Webster 2001).

İnfluenza viriyonun görümünde yüzeyinden dışarıya doğru ışınsal olarak dizilmiş uzantılar dikkat çeker (Şekil 1.2). İnfluenza tip A ve B viruslarının yapısının benzerdir fakat İnfluenza C virusunun yüzey glikoprotein yapısı farklıdır. İnfluenza C virusları, HEF olarak adlandırılan yüzey uzantısına sahiptir. İnfluenza A ve B viruslarının yüzeyinde yer alan HA uzantısı elektron mikroskobunda yuvarlak biçimde, NA uzantısı ise mantar şeklinde görülür. Lipid yapısındaki zarf içinde, M proteini bulunmaktadır. Matriks içinde RNA replikasyonundan sorumlu üç polimeraz proteini ve nükleokapsid protein ile ilişkili olan sekiz tek zincirli RNA molekülü bulunur. Virus tarafından sentezlenen yapısal olmayan 1 ve 2 proteinleri (NS1 ve NS2), virusla infekte hücrelerde bulunur. İnfluenza C virusu yedi RNA segmenti sahiptir ve yalnız bir yüzey glikoproteini bulundurur (Wright ve Webster 2001, Aslan 2006).



Şekil 1.1. İnfluenza virusunun elektron mikroskobundaki görünümü (Aslan 2006, Akarsu 2009)



Şekil 1.2. İnfluenza virusunun yapısı (Aslan 2006, Akarsu 2009)

1.4. Polipeptitler

İnfluenza A virusunda sekiz yapısal, bir yapısal olmayan; İnfluenza B virusunda dokuz yapısal, iki yapısal olmayan; İnfluenza C virusunda altı yapısal, üç yapısal olmayan protein vardır. Üç büyük RNA segmenti PB1, PB2 ve PA proteinlerini kodlamaktadır. Bu proteinler izoelektrik jelde hareket etme özelliklerine göre, bazik protein (PB1 ve PB2) ve asidik protein (PA) olarak sınflandırılmıştır.

NP tipe özgü antijenlerden biridir ve ribonükleoprotein (RNP) formunun oluşması için RNA ile etkileşen yapısal bir bileşendir. Bu protein İnfluenza A, B ve

C virusu için özgüldür. İnsanlarda İnfluenza virus alttiplerine karşı sitotoksik T lenfositleri oluşur. Bu lenfositlerin hedef aldığı ana antijenik yapı RNP'dir (Wright ve Webster 2001).

1.4.1. Hemaglütinin (HA) Proteini

HA, özelleşmiş sialik asit reseptörlerine tutunarak eritrositleri aglütine edebilme kabiliyetine sahiptir. HA'in, İnfluenza virusun replikasyon döngüsü esnasında önemli üç rolü vardır:

1-Hücre yüzeyindeki sialik asit reseptörleri ile etkileşir. Bunun sonucunda virionun hücreye tutunmasını gerçekleşir.

2-HA aracılığı ile virus endositoz yoluyla alındıktan sonra membranı füzyona uğrar ve hücre sitoplazması içine penetre olur, bunun sonucunda viral nükleokapsid sitoplazma içinde serbest kalır.

3-Nötralizan antikor oluşumuna neden olan bir antijendir. İnfluenza epidemileri, HA'in antijenik yapısındaki değişikliklerle ilgili olarak meydana gelir.

Membrana yapışmış ribozomlarda sentezlenen polipeptid infekte hücrenin endoplazmik retikulumunun lümenine taşınır. Bu glikoprotein, bir baş ve fibröz sap olmak üzere iki farklı yapıdan oluşmaktadır. Baş kısmı tamamen proteinden meydana gelir ve üzerinde A, B, C, D, E olmak üzere beş antijenik bölge bulunur (Kesson 2007).

1.4.2.Nöraminidaz (NA) Proteini

NA integral membran proteini, İnfluenza A ve B viruslarının tipe özgü bir diğer glikoproteinidir. Bu protein, baş ve sap bölgesinden oluşur. Baş bölgesi enzimatik aktivite gösterirken, sap bölgesi membrana tutunmuş yapıdadır. NA, değişime uğrayan önemli bir antijenik yapıdır. Bundan başka asetilnöraminil hidroliz aktivitesine sahiptir ve D-galaktoz ve/veya D galaktozamin ile sialik asit arasındaki α-ketosidik asit bağın kesilmesini kataliz eder. NA'ın ayrıca virusun, solunum yolu sisteminde bulunan müsin tabakasından geçişini sağlayarak hedef hücreye ulaşmasında rol alır (Wright ve Webster 2001).

1.4.3. M1ve M2 Proteinleri

M1, M2 ve NP proteinleri tip spesifiktir. Bu nedenle İnfluenza A'yı diğer tiplerden ayırt etmek için kullanılır. M1 proteinleri viriyonun içini kaplayarak diğer dış yapı elelmenlarının tutunmasını sağlar.

M1 Proteini, İnfluenza viruslarında bulunan, tipe spesifik ve fazla miktarda bulunan viriyon proteinidir. Elektron mikroskobu incelemesinde, M1 proteininin viral zarfta kalınlaşmaya yol açtığı ve lipid tabakayı değiştirdiği anlaşılmıştır. Sitoplazmada membran kısmı ile ilişkili olarak bulunan bu protein, birçok lipid bağlama bölgesi bulundurur. Nukleus ve sitoplazmada yerleşen M1 proteini, RNA transkripsiyonunu inhibe eder. Bu şekilde, yeni viral partiküllerin oluşmasının son aşamasına geçişini stimule ettiği düşünülmektedir (Cox ve Ziegler 2003).

Virusla infekte hücre yüzeyinde bol miktarda salınan integral M2 proteini, viriyonun az miktarda bulunan bileşenlerinden biridir. Bu protein virus replikasyonu için zorunlu değildir. Bu protein, membranlar içinde bir protein kanalı oluşturur, tabakaları kaldırır ve viral salınımı sağlar (Köksal 2010).

1.5. Replikasyon

İnfluenza virus, negatif sarmallı bir RNA virusudur. Replikasyon öncesi enzimlerin yapılabilmesi için, önce pozitif polariteli mRNA oluşturulması gerekir. İnfluenza A ve B virusleri, konak hücrenin glikoproteinleri veya glikolipidleri üzerinde bulunan sialik asit reseptörüne, HA glikoproteinleri ile bağlanır. Aynı bağlanma İnfluenza C viruslarında HEF ile sağlanır. Daha sonra, hücreye tutunmuş viriyon endositoza uğrar. Endozomun asidifikasyonu, aktive olmuş HA'in üç boyutlu yapısında modifikasyonlara neden olur ve proteinin hidrofobik füzyon başlatan bölgelerinin açığa çıkmasına neden olur. Viral zarf, endozomal membran ile birleşir. M2 proteini tarafından oluşturulan protein kanalları, NP ve M1 arasındaki bağlantıyı koparmak için zarf içeriğinin asidifikasyonunu başlatır ve sonuçta nukleokapsid kılıfının yırtılmasına ve sitoplazma içerisine atılmasına imkan sağlanır (Köksal 2010).

Konak hücrede, replikasyonda gerekli proteinlerin üretilmesi için öncellikle transkripsiyon gerçekleşir. RNA viruslarının çoğundan farklı olarak İnfluenza

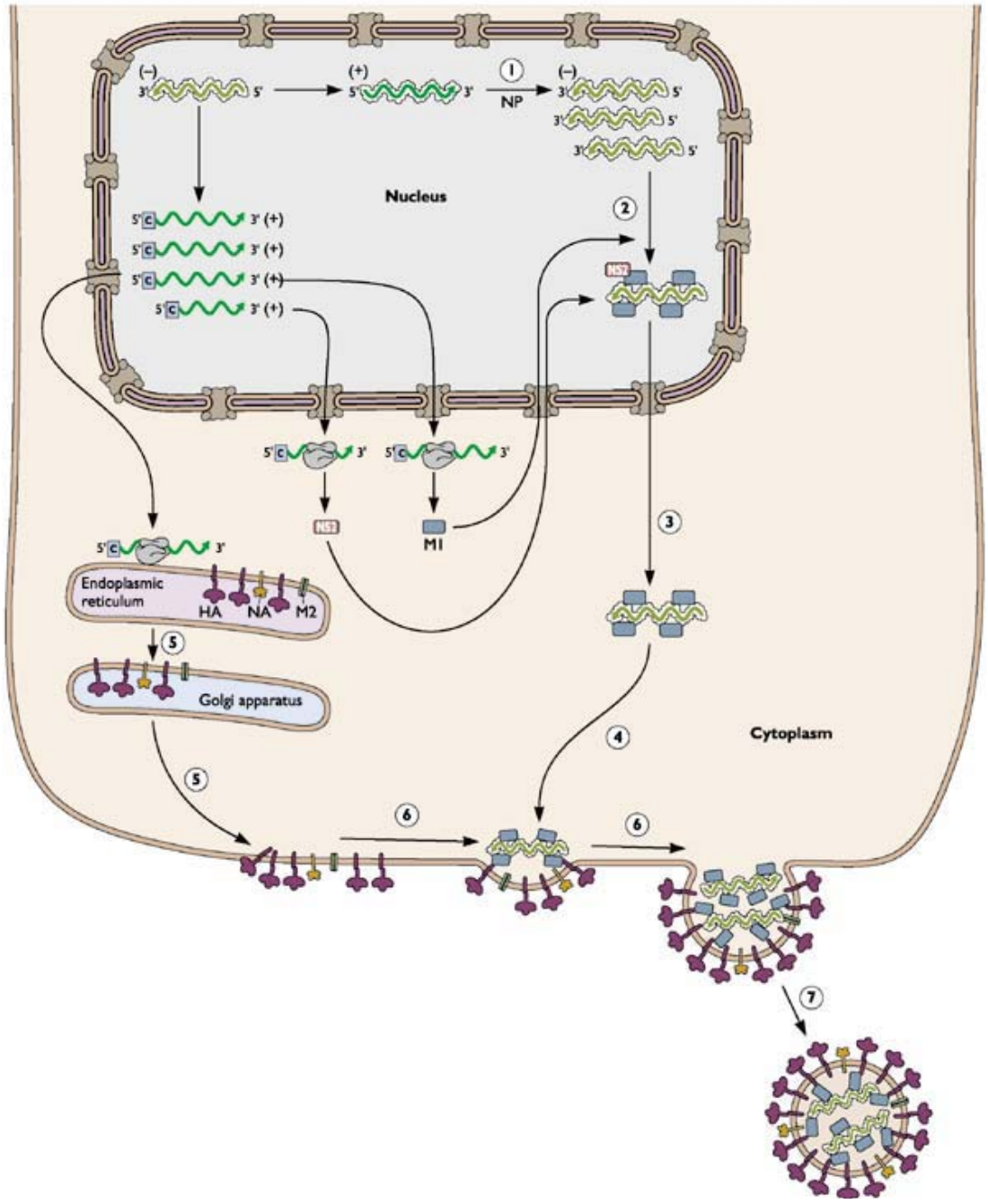
nükleokapsidi nükleusa göç eder ve mRNA'ya çevrilir. RNP konak hücre nukleusuna göç ettiğinde polimeraz kompleks (PA, PB ve PB2) hücresel RNA polimeraz II ile, primer mRNA transkripsiyonunu başlatır. İnfluenza A ve B virusunda genomun sekiz segmentinin translasyonu sonucu, 10 protein kodlanır; HA, NA, PB1, PB2, nükleoprotein, PA, M1,M2 ve iki NS proteini. Viral genomun replikasyonu, virus tarafından kodlanan aynı polimeraz proteinlerince tamamlanır. HA, NA ve M2 (İnfluenza B için NB proteini) proteinleri, plazma membranına beraber göç ederek diğer matriks proteini (M1) ile birleşirler. Sekiz RNA segmentinin de bölgeye gelmesiyle, tomurcuklanma işlemi başlar. Sonuç olarak NA, membran üzerindeki sialik asit reseptörlerinin yıkımını gerçekleştirir ve tomurcuklanma yoluyla virus, hücreyi terk eder (Wright ve Webster 2001, Cox ve Ziegler 2003) (Şekil 1.3).

1.6. İnfluenza Viruslarında Genetik

İnfluenza A virusunun HA ve NA genlerinde mutasyon sıklığı, replikasyon başına $1/10^5$ oranınındadır. Bu oran, antijenik drift görülmeyen Rhabdovirus ve Paramyxoviruse yakın bir orandır. İnfluenza A virus mutasyon oranının, bakteriyel DNA'daki görülen orandan daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. İnfluenza ve diğer RNA viruslarının, RNA polimerazının DNA polimerazdan tamir mekanizmasıyla düzeltme yeteneğinin daha az işlevsel olduğu düşünülmektedir. İnfluenza A viruslarının diğer RNA viruslarından mutasyon açısından farkı yoktur. Fakat oluşan mutasyonlar meydana gelen varyantlar için geniş bir kaynak oluşturmaktadır.

İnfluenza A virusları arasındaki RNA segment değişimi olduğu 1949'da gösterilmiştir. İnfluenza A,B ve C viruslarının yüksek sıklıkta reassortment özellik gösterirler. iki virus arasındaki RNA segmentlerinin değişimi, genetik reassortment yoluyla meydana gelir. Isıya duyarlı mutantlar kullanılarak, sekiz farklı reassortment grup tanımlanmıştır (Kesson 2007). İnfluenza A virüsü, farklı türlere özgü alt grupların birbirinden genetik materyal transferine açıktır ve böylece farklı bir virüs oluşmasına mümkün olur. Oluşan yeni virüs, insana özgü bir influenza virüsten gen alırsa, insandan insana bulaşma özelliği kazanabilir. Memeli ve kuş virüsleri için özgül hücre reseptörlerine sahip olduğu bilinen domuzlar, hem kuş hem de insan ve diğer memeli virüsleriyle oluşabilecek infeksiyonlara duyarlıdır. Bundan dolayı insan ve kuş virüslerine ait genetik materyalin birbirine karıştığı bir ortam hazırlayarak

yeni bir alt tipin oluşmasına neden olabilir (Wright ve Webster 2001, Cox ve Ziegler 2003, Akarsu 2009).



Şekil 1.3. İnfluenza virusunun replikasyonu (Aslan 2006).

İnfluenza virusları arasında, klasik rekombinasyon yoluyla iki parental virustan oluşan yeni RNA segmentinin meydana gelmesi sık değildir. Viral RNA segmentinin bir yapısı vardır ve bu RNA, polimerazın bir segmentten diğerine

atlamasıyla oluşmaktadır. Bir İnfluenza A virus suşunun HA geninin, konak hücrenin 28S ribozomal RNA'sıyla ilişkili olan 54 nükleotidlik bir insersiyon içerdiği gösterilmiştir (Aslan 2006, Kesson 2007).

1.7. Virus Çoğaltılması

Viral kültür, respiratuvar virusların tanısı için 1950lerden beri kullanılan bir yöntemdir. İnfluenza virusları, çeşitli primer hücre kültürlerinde ve embriyonlu tavuk yumurtasında üreyebilir. Virusun üretilmesinde ilk olarak embriyonlu yumurtada kullanılmıştır. Embriyonlu yumurtada çok miktarda virus elde edilebildiğinden, laboratuvar çalışmalarında ve aşı üretiminde günümüzde referans laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Aslan 2006, Smith ve ark 2007).

İnsandan alınan örneklerde virusun primer izolasyonu için, çoğunlukla hücre kültürü kullanılmaktadır. Bunlardan en sık kullanılanlar; primer maymun böbrek hücresi ve devamlı hücre kültürü olan Madin–Darby köpek böbrek hücresidir. İnsan İnfluenza A virus suşlarının bir kısmı ve kanatlı İnfluenza viruslarının çoğu, embriyonlu yumurtaların allontoik boşluğundan bol miktarda üretilebilir. Bazı İnfluenza A ve B virusların allontoik boşlukta çoğalması için, önce amniyotik boşluğa adapte edilmeli, daha sonra allontoik boşluğa ekimi yapılmalıdır. Bu kültür yöntemlerinde üreme ve virus replikasyonu, kültür sıvısındaki virula infekte hücrelerin eritrositleri aglütine etme özelliğiyle tespit edilir. Bazı İnfluenza virusları yumurtadaki ilk pasajda, kobay eritrositlerini tavuk eritrositlerinden daha yüksek titrede aglütine eder (Wright ve Webster 2001, Aslan 2006, Hossain ve ark 2010). İnfluenza virusları sitopatolojiye neden olarak çoğalırlar ve maymun, dana, hamster böbrek hücreleri ve insan solunum epitelinde plak meydana getirirler. İnfluenza viruslarının, tripsin varlığı olmaksızın tavuk embriyo fibroblastlarında deneysel olarak plak oluşturdukları görülmüştür. İnfluenza virus çalışmaları için, primer organ kültürleri de kullanılmaktadır. Afrika yeşil maymun böbrek hücreleri (Vero), birçok İnfluenza A ve B virusunun üremesi için uygundur (Aslan 2006, Hossain ve ark 2010).

1.8.Kanatlılarda İnfluenza Virusu

Kanatlıların İnfluenza virusları, hayvan ve insan sağlığını tehdit eden viruslar olarak zaman zaman endişeye neden olmaktadır. Son yıllarda kanatlıların İnfluenza virusları, özellikle yüksek patojenik H5N1 suşları olmak üzere, kuşlardan insana bulaşarak, insanlarda yüksek derecede morbidite ve mortaliteye neden olmuşlardır. Kanatlı hayvanları infekte eden İnfluenza A virusları, oluşturdukları infeksiyon şiddetine göre yüksek derecede patojen ve düşük derecede patojen olmak üzere iki gruba ayrılırlar; yüksek derecede patojen İnfluenza virusları, kuş sürülerinde ölümlere neden olur (Highly Pathogenic Avian İnfluenza, HPAI). Düşük derecede patojen İnfluenza virusları, daha çok yumurta üretimini etkileyip, orta şiddette solunum infeksiyonlarına neden olan viruslardır (Low Pathogenic Avian İnfluenza, LPAI) (Widjaja ve ark 2004).

İnfluenza virus partikülünün infeksiyöz hale gelebilmesi için, HA0 glikoproteininin konak hücre proteazlarıyla parçalanarak HA1 ve HA2 protein formlarının ortaya çıkması gerekir. LPAI virusların HA0 proteini, tripsin veya tripsin benzeri konak hücre enzimleri ile parçalanır. Bu işlem, konağın solunum ve sindirim sistemi yollarında meydana gelmektedir. Virulansı yüksek virusların HA'i, konak vücudunun tüm doku ve organlarında bulunan enzimlerle reaksiyona girmektedir. Bunun sonucunda viruslar, hayvanların tüm organlarında replike olur, böylece kanatlılar hayati organlarının hasara uğramasıyla ölür. HPAI ve LPAI viruslarının HA0 kesilme bölgelerindeki aminoasit dizileri karşılaştırıldığında LPAI virusların bu bölgede iki ana aminoasite, HPAI virusların ise bu bölgede çok sayıda tekrarlanan temel aminoasite sahip oldukları saptanmıştır. Bu farklı aminoasitlerin varlığı, çeşitli proteazlarca tanınmayı sağlamakta, bu da HPAI suşlarının yüksek virulansını açıklamaktadır.

İlk kuş gribi epidemisindan sonra korkulan durum, yüksek patojenik H5N1 İnfluenza A virusunun infeksiyon esnasında insandan insana geçiş özelliği kazandıracak şekilde mutasyona uğraması veya insan İnfluenza virusu ile koinfeksiyon esnasında, iki virus arasında bu geçişi sağlayabilecek gen alışverişinin meydana gelme ihtimalidir (Abdelwhab ve ark 2010). Bu değişikliklerle insandan

insana geçiş özelliğinin kazanılması durumunda yeni bir pandeminin ortaya çıkması düşük bir olasılık değildir (Webby ve Webster 2001).

1.9. Laboratuvar Tanısı

Tüm viruslarda olduğu gibi influenza viruslarının laboratuvar tanısında da en önemli işlem muayene maddesinin seçimi, alınması ve uygun koşullarda laboratuvara ulaştırılmasıdır. Muayene maddeleri hastalığın başlangıcında ateşli dönemde alınmalıdır. Memelilerde ve insanda virus izolasyonu için nazofaringial yıkantı sıvısı yahut aspirasyon sıvısı tercih edilir. Boğaz ve burundan eküvyon ile alınan sürüntü örnekleri de virus izolasyonu için kullanılır. En fazla tercih edilen muayene maddesi bronko alveoler lavaj sıvısıdır. Alt solunum yolu infeksiyonlarında virus izolasyonu için post mortem akciğerden alınan parça ya da akciğer biyopsisi en uygun örnektir. Hücre kültürü için nazofaringial sürüntü ucuna pamuk sarılmış rayon, dakron veya aliminyum eküvyon ile alınır. Tahta veya kalsiyum alginat içeren eküvyonlar tercih edilmez (Akarsu 2009).

İnfluenza virus infeksiyonlarında laboratuvar tanısı, hasta bireyin tedavisi ve salgınların yayılmasının kontrolünde önemli rol oynar. Ayrıca, bu viral infeksiyonun sebep olduğu morbidite ve mortalitenin nedenin saptanması açısından da önemlidir. İnfluenzanın laboratuvar tanısı için, birçok farklı laboratuvar testi mevcuttur (tablo 1.1, Çelebi 2008). Testin seçimi ve farklı tanı yöntemlerinin uygulanması, söz konusu laboratuvarın işlevi ile ilgilidir. CDC hangi testlerin ne amaçla yapılması gerektiği konusunda ve hangi laboratuvarda hangi test yapılması konusunda 2009 yılında öneriler yayınlamıştır (CDC 2009). Hızlı test gibi antijen tanı yöntemleri, ilaç ve infeksiyon kontrolünün söz konusu olduğu, bu yüzden de hızlı tanının önem taşıdığı birinci basamak sağlık kurumlarında uygulanır. Bu durumda önemli olan kullanılan testin duyarlılığının ve özgüllüğünün olabildiğince yüksek olmasıdır. İnfluenza virus sürveyansının gerçekleştirildiği bir referans laboratuvarında, virus izolasyonu için embriyonlu yumurta veya duyarlı bir hücre dizisinin kullanılır. Bu tür laboratuvarlarda üretilen suşların detaylı antijenik bilgisi için, bir dizi çalşma gerçekleştirilir. Bu laboratuvarlarda elde edilen veriler, dolaşımdaki viruslar ve bunlara karşı aşı hazırlanmasında önemlidir (Cazacu ve ark 2004, Aslan 2006).

1.9.1. Hücre Kültürü

İnfluenza virusları memeli doku hücrelerinde veya embriyonlu yumurtada çoğaltılarak antijenik özellikleri incelenebilir. İnfluenza virusları primer, diploid ve devamlı hücre kültürlerinde üretilebilir. İnsan İnfluenza A ve B virusları galaktoz α-2,6 sialik asit reseptörlerine, atların ve kuşların İnfluenza virusları ise α-2,3 sialik asit reseptörlerine afinitesi vardır.

Çizelge 1.1.İnfluenza tanısında kullanılan örnekler ve testler.

İnfluenza Tanı Testleri			
Yöntem	**İnfluenza tipleri**	**Uygun örnekler**	**Testin çalışma süresi**
Viral kültür	A ve B	Nazofarengiyal ve boğaz sürüntüsü, burun ve bronş yıkama suyu, burun aspiratı, balgam	5-10 gün
Hızlı testler	A ve B	Nazofarengiyal ve boğaz sürüntüsü, burun yıkama suyu, burun aspiratı, balgam	<30 dakika
EIA	A ve B	Nazofarengiyal ve boğaz sürüntüsü, burun ve bronş yıkama suyu	2 saat
PCR	A ve B	Nazofarengiyal ve boğaz sürüntüsü, burun ve bronş yıkama suyu, burun aspiratı, balgam	1-2 gün

İnfluenza viruslarını üretmek için en uygun hücre kültürü sistemi memeli epiteloid hücreleri, olarak bulunmuştur. Bunların arasında en yaygın kullanımı olan Madin-Darby Köpek Böbrek Hücresi olarak adlandırılan (*Madin-Darby Canine Kidney, MDCK*) diploid hücrelerdir. Morfolojik özellikleri açısından farklı olan çeşitli MDCK hücreleri kültürde kullanılmıştır (Mehlmann ve ark 2007, Rahman ve ark 2008). Primer maymun böbrek hücresi (PMKC) de İnfluenza A ve B viruslarının

izolasyonunda kullanılmaktadır. Vero hücrelerinin yüzeylerinde α-2,3 galaktoz bağlı sialik asit dominant olmasına rağmen, bu hücre dizisi de insan İnfluenza A ve B viruslarının üretiminde başarı ile kullanılmıştır. Bu hücrelerde elde edilen İnfluenza virus titresi, genel kullanımda olan diğer hücrelerden daha düşüktür. Primer tavuk embriyonu fibroblast hücresi, İnfluenza virus izolasyonun rutin tanısında kullanılmamasına rağmen uygun bir ortamdır (Çicek ve ark 2007, Rahman ve ark 2008).

Orthomyxovirusların replikasyonu için, hücre içine girdikten sonra HA glikoproteinlerinin parçalanması gerekmektedir. Böylece HA1 ve HA2 ortaya çıkar. Devamlı epiteloid hücre dizilerinde, hücre içi proteolitik enzimlerle bu parçalanma oluşmaz. Bu sebeple viral üremeyi arttırmak için, hücre kültürüne proteolitik enzim eklenir. Bu amaçla TPCK-tripsin *(1-tosylamide-2-phenylethyl chloromethyl ketone-treated trypsin, TPCK-trypsin),* fizyolojik ısıda daha stabil olması nedeniyle en çok tercih edilen proteazdır. Sığır ve dana serumunu, İnfluenza virusunun üremesini inhibe eder. İnfluenza viruslarının izolasyonunda problem yaşamamak için, şu noktalara dikkat etmek gerekir;

1-İnokülasyon öncesi MDCK hücreleri serumsuz vasatla yıkamaya tabi tutulur ve inokülasyon sonrası, serumsuz TPCK-tripsin içeren vasatla inkübe edilir. Vero hücreleri kullanılıyorsa, inokülasyon sonrasında her gün TPCK-tripsin ilave edilir.

2-Primer izolasyonda düşük ısıda inkübasyon, üremeyi arttırır.

3-Hücre kültürü plaklarına inokülasyon sonrasında santrifüj işlemini uygulanırsa, virusun hücreye tutunmasını ve hücre içine girmesini hızlandırarak üremeyi artırmaktadır (Zambon 1998).

1.9.2.İnfluenza Virusunun Embriyonlu Yumurtada Üretilmesi

İnfluenza virusunun üretilmesi için hastadan alınan örneğin, embriyonlu yumurtanın allantoik veya amniyotik boşluğuna ekimi yapılır. İnfluenza A ve B virusları için 10-11 günlük, İnfluenza C virusu için 8 günlük embriyonlu yumurta kullanılması en iyi sonucu verir. Yumurtalar inokülasyon sonrası 33-34°C'da, İnfluenza A ve B için 3 gün; İnfluenza C için 5 gün; kanatlıların İnfluenza virusu için 37 °C'da 3-4 gün inkübe edilmelidir. İnfluenza A ve B virusları yumurtanın allantoik boşluğunda, İnfluenza C virusu ise amniyotik boşlukta ürer. İnfluenza viruslerinin

bazı suşları hücre kültürü ve tavuk yumurtasında diğerlerine göre, daha yüksek miktarda üremektedir (Cox ve Ziegler 2003). Embriyonlu yumurtanın allantoik boşluğundan elde edilen virus miktarı, hücre kültürüne göre birim hacimdeki hemaglütinasyon ünitesi veya plak oluşturma ünitesine göre değerlendirildiğinde, daha yüksektir, fakat infekte hücre bazında hesaplandığında fark yoktur. MDCK hücrelerinden elde edilen insan İnfluenza A ve B virusleri, embriyonlu yumurtadan elde edilenlerden antijenik olarak yüksek benzerlik gösterir ve klinik örnekteki orijinal virus ile benzer özellikleri daha fazladır. Embriyonlu yumurtada hazırlanan virusun, orijinal virus izolatından antijenik olarak farklılık göstermemesi aşı üretiminde dikkat edilmesi gereken bir konudur. Embriyonlu yumurtada üretilen İnfluenza viruslarının varlığı, hemaglütinasyon testi ile gösterilir (Cox ve Ziegler 2003, Gharabaghi 2008).

1.9.3. Virus Üremesinin Gösterilmesi ve İdentifikasyonu

İnfluenza A virusları, İnfluenza B viruslarına oranla çeşitli memeli hücrelerinde daha düşük düzeyde üremektedir. İnfluenza A virusunun gösterdiği sitopatik etki (CPE), hücrelerin minimal dejenerasyonu ve yuvarlaklaşması şeklindedir. Ayırıcı tanı güçtür çünkü çoğu zaman CPE'yi saptamak çok zordur. Bazen CPE hiç görülmeyebilir, fakat 2-4 gün gibi kısa sürede görülmesi dikkat çekici olabilir. İnfluenza B virusunun hasta örneklerinden elde edilen şeklinde görülen CPE, çoğunlukla daha belirgindir. Mikroskopta ışığı kırar hale gelen hücreler yuvarlaklaşır ve dökülür. CPE'nin genellikle belirgin olmaması ve çoğu zaman görülmemesi nedeniyle virus üremesinin takibinde başka yöntemlere başvurulmasına neden olmuştur; bu yöntemler; hemaglütinasyon, hemadsorbsiyon ve immüno boyama yöntemleridir (Smith ve ark 2007).

1.9.4. Hemaglütinasyon ve hemadsorbsiyon:

Hemaglütinasyon ve hemadsorbsiyon teknikleri, hemaglütinasyon olayının keşfinden beri, İnfluenza virusunun tanısında kullanılmaktadır. İnfluenza A, B ve C virusları, bazı kanatlı ve memeli türlerinin eritrosit yüzeyindeki sialik aside bağlanarak, bu hücreleri aglütine etmesine dayanan hemaglütinasyon deneyinde, İnfluenza virusun varlığında eritrosit hücreleri kafes formunu alamaz. Hemadsorbsiyon deneyi, eritrositlerin virus infekte hücrelerin yüzeylerinde bulunan viral hemaglütininlere yapışması ile gerçekleşir. İnfluenza virus içeren vasata

eritrosit ilavesi hemaglutinasyona bağlı olarak gelişen jel benzeri kümeleşmelerin oluşumuna yol açar. Hemaglutinasyon ve hemadsobsiyon İnfluenza virus için spesifik değildir, parainfluenza ve diğer viruslarda bu özelliği gösterebilir (Köksal 2010).

Farklı türlerin eritrositlerini aglütine edebilme özelliği, İnfluenza virusların reseptör spesifitesini göstermektedir. Bu yöntem Paramiksoviruslar ile Ortomiksovirusların hücre kültüründeki varlığını tespit için, yaygın olarak birçok laboratuvarda kullanılmaktadır (Rahman ve ark 2008). Hemadsorbsiyondan sorumlu virusun identifikasyonu, spesifik nötralizan antiserumlarla hemadsorbsiyon inhibisyon testi yapılarak yada infekte hücrelerin immün boyanması ile meydana çıkarılabilir (Carraro ve ark 2007). İnfluenza virusunun identifikasyonu için kullanılan hücre kültür yönteminin bir olumsuz yönü, standart izolasyonun eldesi için 4-7 gün gibi uzun zamana ihtiyaç göstermesidir. Bu sebeple, hücre kültüründe viral antijen salınımını tespit için immüno boyama yöntemlerinin kullanıldığı hızlı kültür yöntemleri geliştirilmiştir (Cazacu ve ark 2004).

1.9.5. İnfluenzalarının antijenik tiplendirilmesi, hemaglütinasyon inhibisyon deneyi

İnfluenza A ve B viruslarının tipinin tayini ve İnfluenza A viruslarının antijenik tiplerinin tespiti, yeni izole edilen virusların tanımlanmasında ilk basamaktır. Bu da, hemaglütinasyon inhibisyon deneyi (HAI) ile yapılmaktadır. Gelincikten elde edilen ve yüksek özgüllük gösteren antiserumlar bu amaçla kullanılır. Elde edilen gelincik serumlarındaki inhibitörlerin yok edilmesi için, reseptörleri ortadan kaldıran enzim ile işleme tabi tutulur. Antijenik tiplere özgü gelincik serumları iki kat seri dilüsyona uğratılıp, 4 HA ünitesindeki virus suşu ve daha sonra % 0,8'lik kobay kanıyla inkübe edilir. İnhibisyonun hangi antikor titrelerinde oluştuğu incelenir. Standart tabloyla karşılaştırılarak izolatın hangi antijenik tip olduğu tespit edilir (Cox ve Ziegler 2003).

1.9.6. Hızlı Kültür Yöntemleri

Monoklonal antikorlarla CPE oluşumunu beklemeksizin, virusun ürediğinin tespit edilmesini sağlayan metodlar, virolojide her geçen artan oranda kullanılmaktadır. MDCK hücrelerinin kullanıldığı Shell vial ve plak yöntemleri En

diğer yöntemlere göre daha yaygındır. Her iki yöntemde de, işlemin duyarlılığını arttırmak için inokülasyon sonrası santrifüj işlemi uygulanır ve daha sonra fikse edilmiş hücreler, antikorlarla muamele edilir. Hızlı kültür yöntemleri, standart izolasyonla karşılaştırıldığında, %56-100 arası değişen duyarlılık gösterirler (Covalciuc ve ark 1999, Aslan 2006, Hurt ve ark 2007). Primer tanı için bu testlerin kullanımı hızlı ve kolaydır. Kısa zamanda sonuç alınabilir. Fakat izole edilen virusun detaylı antijenik analizinin yapılamaz.

1.9.7. İmmünofloresan Antikor Boyama Yöntemi (IFA)

Solunum yolu örneklerinde virusun direkt identifikasyonu için, IFA yöntemi kullanılabilmektedir. Bunun için nazofarinks aspirasyon mayisi, nazal yıkama, nazal sürüntü ve diğer solunum örnekleri kullanılabilir. Ticari monoklonal antikorlar, infekte hücrelerden bol miktarda salınan nükleoprotein (NP) ve M1 bölgelerine ya da HA proteinine karşı oluşturulmuştur. İndirekt ve direkt floresan yöntemlerinin duyarlılıkları benzerdir (Landry ve ark 2003, Roh ve ark 2008, She ve ark 2010). IFA tekniği ile yapılan çeşitli çalışmalarda izolasyon yöntemi ile karşılaştırılmış ve %50-90 arasında duyarlılık saptanmıştır (Liolios ve ark 2001). IFA deneylerinde klinik örneğin kalitesi sonucu değiştirmektedir ve nazofarinks aspirat örnekleri, daha iyi sonuç vermektedir. Bu testler çok sayıda örneğin bir arada çalışılabilmesi ve hızlı sonuç elde edilmesi gibi faydalarından dolayı tercih edilmekte ve hastanın tedavisinin planlanmasında faydalı olabilmektedirler. İmmun floresan mikroskop olan merkezlerde uygulanabilecek bir metoddur fakat sürveyans çalışmalarında kullanım alanları sınırlıdır (Cox ve Ziegler 2003, Lasala ve ark 2010).

1.9.8. Ticari Hızlı Tanı Testleri

İnfluenza A ile B virusları için geliştirilen hızlı enzim immüno assay testler hızlı tanı testleridir. İnfluenza virus infeksiyonuna karşı antiviral ilaçların varlığı, hızlı tanı testlerinin kullanımını artırmıştır. 15-20 dakika içinde sonuç veren ve İnfluenza A ile B virusları için geliştirilen hızlı testlerde, virus ile infekte 20 hücre yada 2.000 virus partikülü varlığında pozitif sonuç elde edilebilir (Chan ve ark 2002, Cox ve Ziegler 2003, Chen ve ark 2007). Hızlı tanı testlerinin duyarlılığı % 40-100, özgüllüğü ise %52-100 arasında değişmektedir (Weinberg ve ark 2005, WHO 2005, Principi ve ark 2009). Bu testlerin pozitif prediktif değerleri, influenza virusun görece olarak daha nadir görüldüğü grip sezonun başlarında düşük olabilir. Hızlı

testler klasik yöntemlerden daha düşük duyarlılığa ve spesifikliğe sahip olmalarıyla birlikte, hastaların tedavisinde hızlı sonuç sağladıkları için son zamanlarda kullanımları yaygınlaşmıştır (Boivin ve ark 2001, Cox ve Ziegler 2003).

1.9.9. Moleküler Yöntemler

Günümüzde birçok RNA virusunun tanısının moleküler yöntemlerle yapılabilmesi mümkün olmakla beraber, bu yöntemlerin İnfluenza gibi solunum viruslarının tanısındaki kullanımı yeni yeni artmaktadır. Son yıllarda klinik tanıyı koymak ve sürveyans sistemini desteklemek amacıyla, hızlı ve duyarlı yöntemler geliştirilmiş ve referans laboratuvarlarında kullanıma girmiştir. Hastaların tedavisine katkıda bulunacak nöraminidaz inhibitörlerinin bulunması, hızlı ve doğru sonuç sağlayan tanı testlerinin gerekliliğini arttırmıştır. İnfluenza virusunun tanısında çeşitli moleküler yöntemler kullanılmakla beraber, daha çok polimeraz zincir reaksiyon temelli yöntemler tercih edilmektedir. Bu yöntemlerin seçiminde; incelenen örnek sayısı ve özelliği, laboratuvarın zaman ve kaynak olanakları ile uzman laboratuvar çalışanlarının gerekliliği gibi pek çok faktörler önemlidir (Bellau-Pujol ve ark 2005, Beck ve ark 2010).

Moleküler hibridizasyon yöntemleri, yüksek duyarlılık sayesinde virolojide kullanım alanı artmaktadır. Bu yöntem kullanılarak, viruslar klinik örneklerden direkt olarak saptanabilmektedir. İnfluenza A virus RNA'sı hibridizasyon yöntemi kullanılarak, nazofarinks sürüntü örneklerinden %72 duyarlılıkla saptanabimektedir. Bununla birlikte moleküler hibridizasyon yönteminin rutinde kullanımı çok yaygın değildir. Son yıllarda geliştirilen ve İnfluenza viral RNA'sının saptanmasında daha az zaman gerektiren ve daha duyarlı yöntemler kullanılmaktadır (Ellis ve Zambon 2002).

İnfluenza virusların tip ve alttiplerinin tespiti için ve hızlı sonuç elde etmek amacıyla PCR metodları geliştirilmiştir. Bu testlerde, kültür veya klinik örnekten elde edilen viral RNA'dan cDNA elde etmek için, önce revers transkripsiyon işlemi gerçekleştirilir. Bu işlemde primer olarak bütün İnfluenza RNA'sının komplementeri olan üniversal primer veya spesifik primer tercih edilir. Üniversal primer kullanımının, viral RNA ve mRNA'dan cDNA'nın sentezlenmesi avantajı vardır. Bu

nedenle PCR ile çoğaltılmış hedef bölge sayısı artırılır (Schweiger ve ark, Liolios ve ark 2001, Liao ve ark 2009).

Hedef bölgeyi çoğaltmak için alternatif olarak, nested PCR kullanılabilir. İnfluenza A, B veya C virus infeksiyonlarının tipe özgü tanısı için, nükleoprotein ve matriks protein genleri seçilir. Bu bölgelerin değişim potansiyeli az olduğundan, yüksek derecede korunmuş bölgelerdir. İnfluenza A virus alt tipleri araştırıldığında, genellikle yüzey antijenlerini kodlayan genler hedef alan primerlerle çalışılır. 5' ucundaki 13 nükleotide ve 3' ucundaki 12 nükleotide komplementer olan primerlerin kullanıldığı multisegment PCR kullanılarak, bir reaksiyonda segmentlerin tamamı tespit edilebilmektedir. (Schweiger ve ark, Liolios ve ark 2001, Liao ve ark 2009).

İnfluenza virusların tanısı için multipleks PCR, PCR-enzyme immuno assay, NASBA gibi PCR yöntemlerinin yanı sıra real time PCR, microarray DNA gibi yeni geliştirilmekte olan diğer moleküler yöntemler de kullanılmaktadır (Stone ve ark 2004).

Yapılan moleküler yöntemler çalışmalarda, revers transkriptaz PCR (RT-PCR)'ın hasta tanısında doğru ve hızlı sonuç verdiği, İnfluenza vakalarının tespitinde kullanılan seroloji ve hücre kültür yöntemlerinden daha duyarlı bulunmuştur. RT-PCR yöntemi ile dolaşımda olan virusların identifikasyonu ve karakterizasyonu yapılabilmektedir. İnfluenza virus infeksiyon sürveyansı boyunca toplanan örneklerde RT-PCR izolasyon, EIA ve IFA gibi yöntemler ile karşılaştırılmıştır. Bu çalışmalardaki RT-PCR metodlarının sonuçları, RT-PCR'ın İnfluenza virus tespiti için kullanılan klasik yöntemlerden daha duyarlı olduğuna ortaya koymaktadır (Ellis ve Zambon 2002, Aslan 2006, Kim ve ark 2009). Moleküler metotların kullanımına laboratuvar ihtiyaçlarına göre yöneticileri kendi karar verir. Solunum yollarında infeksiyöz hastalıkların araştırılmasında**,** sıklıkla sorumlu infeksiyöz etkenin kültürle üretilmesindeki zorluklar bulunmaktadır. Bu nedenle solunum örneklerinde hastalık tanısı için moleküler tekniklerin kullanımı, salgınlarının izlenmesinde özellikle değerlidir (Kuypers ve ark 2006).

1.9.10. İnfluenza Virusunun Tanısında Real-Time PCR'ın Kullanımı

Real time PCR, moleküler teknolojide gelinen en önemli ve en son basamaktır. Bu metotta PCR ürünün çoğaltılması ile ortaya çıkan ürünün

gösterilmesi eş zamanlı olarak olmaktadır. PCR ürünü çoğaldıkça, floresan işaretli ürün ve sinyal artar ve bu artış, test çalışma esnasında cihaz ekranından takip edilebilir. Nükleik asitin çoğaltılması ve sinyal tespitinin beraber yapılması PCR sonrası işlemleri gerektirmediği için, nükleik asit tespiti için gerekli çalışma zamanını kısaltmıştır. TaqMan PCR teknolojisi İnfluenza A ve B virusların tanısı ve identifikasyonu için birçok çalışmada, kullanılmıştır. Bu çalışmalarda İnfluenza A ve B viruslarının M gen bölgesini veya İnfluenza A virusunun M gen bölgesiyle İnfluenza B'nin HA bölgesini hedefleyen primer ve problar kullanılmaktadır (Yoo ve ark 2007, Yang 2011). Toplumdan elde edilen örneklerde İnfluenza virusların tanısı ve sürveyansı için real time PCR uygulanmasına dair yapılan bazı çalışmalarda real time PCR, hücre kültüründen daha duyarlı bulunmuştur (Aslan 2006, Hwang ve ark 2010, Hymas ve ark 2010).

1.10. İnsanlarda Patogenez ve İmmunite

İnfluenza virusu alt ve üst solunum yollarında çoğaldığından virus bu organlarda saptanabilir. İnfluenza A virusu solunum sistemi boyunca patolojik değişiklikler yapmakta, ama en önemli patoloji, alt solunum yolunda görülmektedir. Virus replikasyonu, virus alınışından ortalama 48 saat sonra zirveye ulaşır, altı-dokuz gün sonra azalarak devam eder. Nazofarinks çalkantı sularının ml'sinde 10^3-10^7 $TCID_{50}$/mL (tissue culture infectious dose) gibi yüksek oranda virus titresi bulunan hastalarda, semptomatik infeksiyonun oluştuğu ve atılan virusun miktarı ile klinik cevabın şiddetinin paralellik oluşturduğu saptanmıştır. 10^3 TCID50/mL'den daha az virus atılımı olan kişilerde, asemptomatik infeksiyon ya da hafif üst solunum yolu infeksiyonu görülmüştür. İnfekte olan kişilerin sekresyonlarında birkaç gün boyunca viral antijen tespit edilebilmektedir fakat infeksiyonun ileri aşamalarında infeksiyöz virus saptanamamaktadır. En yüksek titre, hastalığın ilk günündeki burun yıkama suyunda ortalama 10^4 $TCID_{50}$/mL olarak bulunmuştur (Aslan 2006).

İnfluenza başlangıçta lokal üst solunum yolu infeksiyonlarına yol açar. Virus mukus sekrete eden silialı hücreleri ve diğer epitelyum hücreleri hedef alır ve öldürür. Sonuçta primer defans sisteminin kaybına yol açar. NA, mukusun sialik asit residuelerini parçalayıp dokuya bağlanmayı kolaylaştırır ve sonuçta infeksiyon gelişimine yardım eder. Hücrenin apikal yüzeyinden salınması ile akciğer içerisine hücreden hücreye temas yolu ile yayılım ve diğer konaklara bulaş başlar. Eğer virus

alt solunum yollarına yayılırsa bronşial ve alveolar epitelde hücre dökülmeleri görülür (Köksal 2010).

Işık mikroskobu ile yapılan incelemelerde, silli silidirik epitel hücrelerinde vakualizasyon, ödem ve sil kaybı görülmüştür. Semptomların başlangıcından sonra bir gün içinde, silli hücrelerin dökülmesi ve mukus üreten hücrelerin tek tabakalı hale dönüşümü izlenmiştir. Nötrofil ve mononükleer hücrelerin infiltrasyonu ile submukozal ödem ve hiperemi oluşur. Epitel ve mononükleer hücrelerde, daha az olarak da bazal hücre tabakasında viral antijene rastlanmaktadır. Primer viral pnömoni vakalar daha ciddi seyreder. Hiperemi ve alveolar duvardaki kalınlaşma ile karakterize ve tromboz, kapiler dilasyon ve mononükleer lökositlerin infiltrasyonunun izlendiği interstisyel bir pnömoni söz konusudur. İnfluenza virusuna özgü antijenler intraalveolar makrofajlar, tip 1 ve tip 2 alveolar epitel hücrelerinde görülür. Akciğer dokusunda hiyalin membran hastalığı, alveolar amfizem ve alveolar duvarda nekroz görüntüsü olabilir.

İnfluenza virusu hücre seviyesinde protein sentezini engellemekte ve apoptozisi tetiklemektedir. Bütünlüğü bozulmuş dokuların tamiri semptomların başlangıcından sonraki 3-5 gün içinde epitelyumun yenilenmesi ile başlar. Bu süreç boyunca, onarıcı ve yıkıcı olaylar eş zamanlı olarak meydan gelmektedir. Epitel nekrozun tamamen çözülmesi, yaşılarda tahminen bir ayı bulmaktadır (Aslan 2006, Köksal 2010).

İnfluenza virusları nazal yıkama sıvılarında görüldüğü zaman interferon ve sitokin cevabı en üst düzeye çıkar ve bu dönem hastalıkta ateşin görüldüğü dönemdir. İnfluenza virusları ile infeksiyon, hem virus-spesifik B hem de T hücre cevabına yol açar. T hücre cevabı iyileşme ve immunopatogenez için önemlidir. Bununla birlikte İnfluenza infeksiyonu makrofaj ve T-hücre fonksiyonunu bozar. Reenfeksiyona karşı korunma HA'ya karşı oluşan antikor cevabına bağlıdır fakat NA'ya karşı oluşan antikorlar da koruyucudur. Antikorlar, viral dış glikoproteinler HA ve NA'ın yanı sıra, tipe spesifik internal proteinler NA ve M1'e karşı da oluşur. HA'e karşı oluşan nötralizan antikorlar, İnfluenza infeksiyonundan koruyan bağışıklık elemanlarıdır. Sistemik immünite yanında mukozal bağışıklık da infeksiyona dirençte rol oynamaktadır (Cox ve Ziegler 2003). T hücre cevabı için hedef antijenler, HA'nın peptidleri olup, nükleokapsid proteinleri (NP, PB2) ve M1

proteinleri hedef alır. NP, PB2, M1 proteinleri İnfluenza A ve B için farklıdır ama bu virusların suşları arasında aynıdır. Bu nedenle T-hücre cevabı farklı suşlarla oluşabilecek infeksiyona karşı koruyucu immünite sağlayabilir (Köksal 2010).

1.11. Klinik Özellikler

İnfluenza A virusu ile oluşan infeksiyonlar, erişkinlerde asemptomatik infeksiyondan öldürücü seyredebilen pnömoniye kadar değişebilen tablolarla kendini gösterir (Hendly 2000). Hastalık, baş ağrısı, öksürük, yüksek ateş, miyalji, halsizlik ve iştahsızlık ile kendini gösteren bir tablo ile ortaya çıkar. Bazen miyalji ve ağrı, öksürükle beraber görülebilir. İnfeksiyonun en önemli belirtisi olan ateş, 38-40°C arasında seyreder. Ateş hastalığın ikinci ve üçüncü gününde genellikle azalır, nadiren altıncı güne kadar devam eder. Burun tıkanıklığı, sulu burun akıntısı ve hapşırma, sıklıkla görülür. Konjunktival inflamasyon ve aşırı gözyaşı ve farinks inflamasyonu bazen görülür. Bu esnada viral antijen, konjunktival hücrelerde ve salgılarda saptanırr. Ateş düştüğünde, solunum belirtileri ve semptomları daha da artabilir. Akciğerlerin dinleme bulgusunda nadiren ral ve hırıltı duyulmasına rağmen, göğüs radyografisi ve dinleme bulguları çoğunlukla normaldir. Öksürük, kuru veya balgamlı olabilir. Balgam mukoid özelliktedir bazen pürülan da olabilir. Hastalık sigara içenlerde daha ciddidir. İnfluenza virus bazen asemptomatik infeksiyonlar ve rinit ve/veya farenjit gibi hafif infeksiyonlar da oluşturabilir. Mukosilier tabakanın kaybı, sekonder bakteriyel infeksiyonlar için hazırlayıcı bir faktördür. Komplike olmayan İnfluenza infeksiyonlarında periferal küçük hava yolları etkilenir. Küçük ve büyük hava yollarındaki anormallikler, akut infeksiyon ve erken konvelasan dönem boyunca görülür. Bunun yanında komplike olmayan İnfluenza virus infeksiyonlarında ve kronik obstruktif akciğer hastalıklı kişilerde kalıcı hasarlara neden olmaktadır (Hendly 2000, Köksal 2010).

İnfluenza virus infeksiyonunun çocuklardaki klinik belirtileri yetişkinlerle benzerlik gösterir fakat bazı farklılıklar da bulunmaktadır. Çocuklarda ateş, daha yüksek seyretmekte ve bazen febril konvülziyon gelişmektedir. Pnömoni otitis media, krup, çocuklarda daha sık olarak oluşmaktadır. İnfluenza infeksiyonu nedeni ile hastaneye yatan çocukların 1/3ünde, otitis media görülmektedir. İnfluenza A virusun laringotrakeaobronşitin önemli nedenlerinden biridir. Krup, daha çok bir yaş altı çocuklarda meydana gelmektedir. İnfluenza A ve B virusları, çocuklarda ciddi alt

solunum yolu infeksiyonlarına neden olur. Özellikle çocuklarda karın ağrısı ve kusma gibi sindirim sistemi şikayetleri de görülebilmektedir (Hendly 2000, Leblebicioglu 2011).

1.11.1. İnfluenza Virus Pnömonisi

Primer virus pnömonisi sıklıkla yaşlı ve kardiopulmoner hastalığı gibi altta yatan başka bir hastalığı olanlarda görülmektedir. Fakat normal kişilerde ve hamile kadınlarda da görülmesi nadir değildir. Primer viral pnömoni, grip hastalığının başlamasından sonra birden ortaya çıkmakta, hızlı solunum sayısı, taşikardi, siyanoz, yüksek ateş ve hipotansiyonla birlikte görülmektedir. Hastalık bazı vakalarda hızlı ilerlemekte ve bir-iki günde ölümle sonuçlanmaktadır. Bu olgularda trakea ve bronşlardaki patolojik bulgular komplike olmayan hastalardakine benzerdir. Patolojik bulgular, alveollerde görülmektedir. Ayrıca bu bulgulara bir de bronşiolit eklenmektedir. Ölümle sonuçlanmayan vakalarda iyileşme, pnömoninin başlamasından sonra 5-16 gün içinde görülür. Bu vakalarda, arteriyal oksijen basıncındaki ve karbondioksitin diffüzyon kapasitesindeki azalmayla birlikte, interstisyel fibrosiz oluşabilmektedir. (Aslan 2006, Çelebi Ö 2008, Cox ve Ziegler 2003).

1.11.2. İnfluenza B ve C Virus İnfeksiyonları

İnfluenza B virusu, A virusuna benzer klinik tablolara neden olmaktadır. İnfluenza B virus infeksiyonlarında hastaneye yatış gerektiren ciddi kliniğe, A infeksiyonuna göre daha az rastlanmaktadır. İnfluenza B infeksiyonu, daha çok okul çağı çocuklarında ve adolesanlarda rastlanır ve epidemik formda görülür. Myozit ve gastrointestinal semptomlar, İnfluenza B virus infeksiyonlarında daha sık izlenmektedir. İnfluenza C virusu, sporadik alt ve üst solunum yolu infeksiyonlarına etkendir ve ciddi alt solunum yolu infeksiyonlarına nadiren neden olmaktadır. Genç erişkinliğe kadar bireylerin %96'sında İnfluenza C virusa karşı bağışıklık oluşur. İnfluenza C virus infeksiyonunda bazı sistemik semptomlar yanında, hafif nezle olabilmektedir (Aslan 2006, Cox ve Ziegler 2003).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu araştırmaya, Konya ilinde çeşitli Sağlık Ocakları ve Meram Tıp Fakültesi hastanesinin Göğüs hastalıkları, Çocuk hastalıkları, İnfeksiyon hastalıkları ve Kulak Burun Boğaz Kliniklerinden, 40'ı 2008-2009 kış sezonuna ait, 110'ı ise 2009-2010 sezonuna ait olmak üzere toplam 150 solunum yolu sürüntü örneği çalışmaya dahil edildi. Örneklerin çalışılmasında, İnfluenza viruslarının tespiti için; hızlı antijen testi, shell-vial hücre kültür yöntemi ve moleküler yöntemler kullanıldı. Bulunan sonuçlara göre testlerin duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer ve negatif prediktif değerleri hesaplanarak karşılaştırıldı.

2.1. Örneklerin Alınması ve İşlenmesi

İnfluenza virus izolasyonuna uygun ticari viral transport vasatları (Vircell, İspanya), örnek alımı yapılacak ilgili birimlere ulaştırıldı. Sağlık ocaklarında ve hastanede çalışan hekimler tarafından alınan 150 solunum örneği (nazal sürüntü, boğaz sürüntüsü), viral transport vasatına alındıktan sonra hastane dışından soğuk zincire uyularak, Hasta Bilgi Formu ile birlikte, Meram Tıp Fakültesi Merkez Mikrobiyoloji laboratuvarına ulaştırıldı. Hasta ile ilgili yaş, cins, boğaz ağrısı/yanması, burun akıntısı, öksürük, ateş varlığı gibi bilgiler ve örneğin alınma tarihi bilgi formuna kaydedildi. Hemen ulaştırılamayacak olan örnekler ise, en fazla beş gün +4 °C'da bekletildikten sonra laboratuvarımıza ulaştırıldı. Örneklerin alımı, şu şekilde yapıldı:

Burun sürüntüleri: Kuru bir eküvyon burun içine sokulup birkaç saniye bekletildikten sonra döndürme hareketiyle yavaşça döndürülerek çıkarıldı. Aynı eküvyonla diğer burun deliği içinde de aynı işlem uygulanarak, iki-üç ml viral transport vasatına konuldu. Eküvyon sapı kırılarak, tüp kapağı kapatıldı.

Boğaz sürüntüleri: Hastanın ağzı açtırılarak posterior nazofarenkse ve tonsillere bastırılarak sürüntü alınıp transport vasatına yerleştirildi. Örnekler +4°C'da, beş günden daha uzun bekletileceği durumda -70°C'de saklandı. 2 adet boğaz sürüntü örneği silgiç ile alındı. Birisi viral transport vasatına alınıp buzdolabında saklandı. Diğer sürüntü örneği hızlı antijen aranması için kullanıldı.

2.2.Hızlı Antijen Testi

Hızlı antijen testi olarak SD influenza antijen (Bioline, Standart diagnostic, Güney Kore) marka test kullanıldı. Bu test tüm hastalara aşağıdaki şekilde uygulandı:

1-Bütün klinik örnekler çalışma öncesi oda ısısına getirildi.

2-Reagent tüpünden ekstraksiyon solüsyonunu boşaltıp içindekilerin çözülmesi için karıştırıldı.

3-Hastadan alınan örnek bu solüsyonun içine batırıldı. Silgiç 3 defa baş kısmı yanlara bastırarak çevrildi.

4-Silgiç ekstraksiyon tüpü içinde 1 dakika bekletildi.

5-Silgiç ekstraksiyon tüpünün kenarlarına bastırarak çıkarıldı. Daha sonra silgiç tıbbi atık kutusuna atıldı.

6-Test stripini ekstraksiyon tüpüne ok yönünde ucu aşağı olacak şekilde yerleştirildi. Strip test tamamlanıncaya kadar hareket ettirilmeden bekletildi.

7-Sonuçlar 10. dakikada okundu. 10 dakikadan sonraki sonuçları dikkate alınmadı.

Değerlendirme:

Kontrol bandı C ve teste karşılık gelen A ve B antijenlerine karşılık gelen bantlar kırmızı olarak görülür. Tek bir bandın oluşması negatif (kontrol bandı), iki bandın oluşması pozitif olarak kabul edildi.

2.3.Hücre Kültürü (Shell Vial)

Hasta materyallerine, hücre kültürüne ekim ve diğer testler yapılmadan önce, aşağıdaki işlemler uygulandı:

1. Solunum örnekleri, eküvyon içeriğinin serbest kalması ve homojenizasyon için, vorteks cihazıyla karıştırıldı.

2. Eküvyon çubuğu, laminar akım kabininde tüp çeperine döndürülüp iyice bastırılarak sıvı içeriği boşaltıldıktan sonra çıkarılıp atıldı.

3. Yine steril ortamda, örnek materyali santrifüj tüpüne boşaltılarak 2000 rpm'de 10 dakika santrifüjde çevrildikten sonra üst sıvı, biri hücre kültürüne ekim ve diğeri moleküler testler için olmak üzere iki ayrı tüpe alındı.

İnfluenza viruslarının izolasyonu için, dünyada yaygın olarak kullanılan Madin-Darby Köpek Böbrek (MDCK) hücreleri içeren ticari shell-vial (Vircell,

İspanya) yöntemi kullanılmıştır. Bu hızlı kültür yöntemi, -70 °C'da donmuş halde bulunan hücrelerin çözülmesi, örneklerin hücrelere ekimi ve üremenin IFA ile gösterilmesi basamakları içerir. Hücre kültürü yönteminde tüm işlemler, laminar akım kabininde steril ortamda gerçekleştirildi.

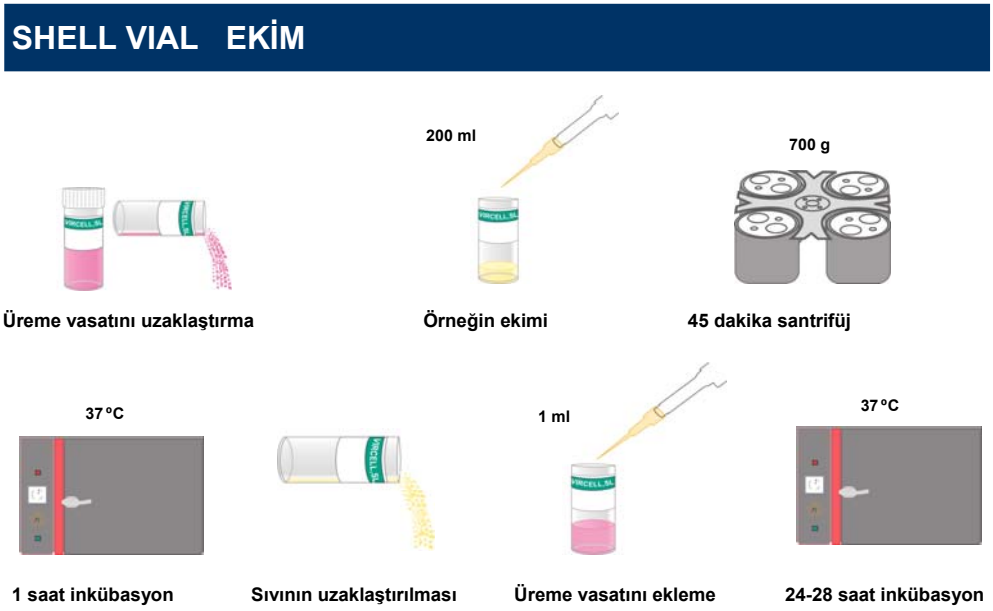
2.3.1.Shell-Vialin İnokulasyon İşlemleri (Şekil 2.1)

İşlemler şu sıra ile yapıldı:

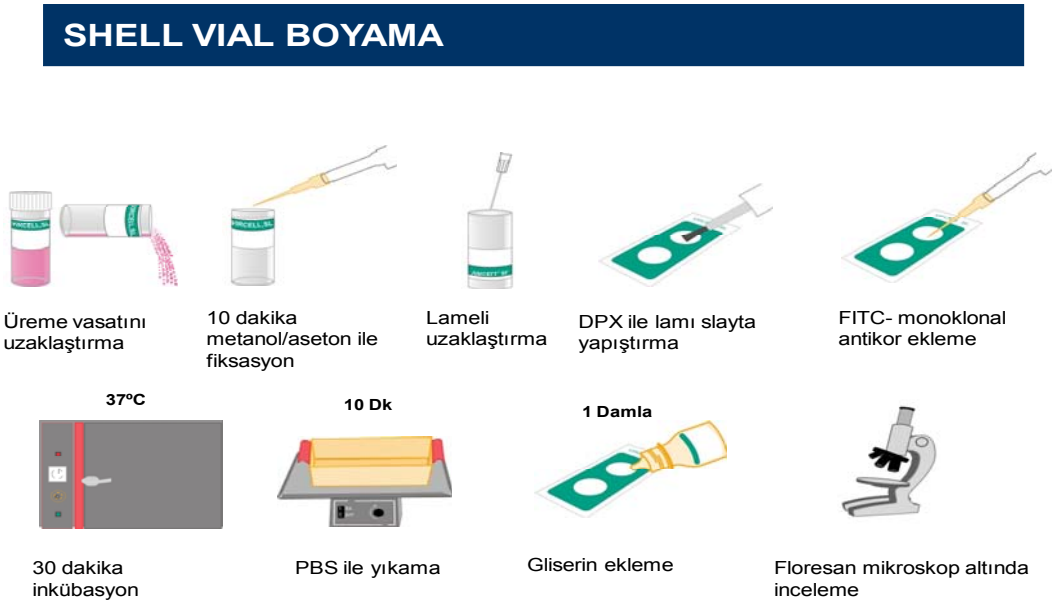
1. Hücre bulunduran vialler 37 °C'de en az 6-8 saat tutuldu.
2. Vial içindeki sıvı vasat uzaklaştırılıp 200 µl örnek eklendi.
3. Bu tüpler 700 g de 45 dakika örnekteki virusların hücrelere tutunması için santrifüj edildi.
4. 37 °C'lik inkubatörde 1 saat inkübe edildi.
5. İnokulum uzaklaştırılarak 1 ml Mininum Esential Medium (MEM) bulunduran % 2'lik Saline Fosfat Buffer (SFB) eklendi.
6. 37 °C'lik inkubatörde 24-48 saat inkübe edildi.

2.3.2.Shell-Vialin Boyama İşlemleri (Şekil 2.2)

1. İnoküle edilmiş vialler yeterli sürede inkübatörde tutulduktan sonra içindeki sıvı döküldü, ters çevrilerek kurutuldu.
2. Vialin tabanı kor haline getirilmiş enjektör iğnesi ile delinerek tabandaki lamelin çıkarılması sağlandı.
3. Hücrelerin üzerinde zar şeklinde tabaka oluşturduğu lamel, nazik bir şekilde forseps yardımı ile alınarak kurutma kağıdı üzerinde kurutuldu.
4. Hücre tabakası (ışıkta opak görünen tarafı) üst tarafa bakacak şekilde DPX yardımı ile lam üzerine yapıştırıldı. Pipet ucu ile hava bırakmamak için hafifçe bastırıldı.
5. Aseton bulunan şale içinde 10 dakika fikse etmek için tutulup çıkarıldı.
6. 25 µl FITC işaretli monoklonal antikor eklendi ve bütün yüzeye nazikçe yayılması sağlandı. Nemli kapaklı kutu içine yerleştirilerek 37°C'lik inkubatörde 30 dakika inkübe edildi.
7. PBS içine yerleştirilerek 10 dakika yavaş çalkalama yapıldı.
8. Kurutulup lam üzerine bir damla gliserin ile yapıştırılması sağlandı.
9. Floresan mikroskop ile 250 büyütme ile incelendi. Pozitif ve negatif kontrollere göre değerlendirme yapıldı.



Şekil 2.1. Shell-vialin inokulasyon işlemleri (Üretici firma önerilerine göre)



Şekil 2.2. Shell-vial yönteminde boyama işlemleri (Üretici firma önerilerine göre)

2.4.Multipleks PCR İşlemleri

Bu çalışmada Seeplex® RV15 ACE Detection kiti (Seegene, Güney Kore)

kitleri kullanıldı. İnfluenza A ve B virus yanında soğuk algınlığı etkeni diğer viruslar da çalışıldı. Örnekler oda ısısına getirilerek çözüldükten sonra hücre kültür ekimi yapılmadan iki tüpe ayrılarak bir adeti PCR için kullanıldı. Bu işlemler güvenlik kabini bulunan ortamda steril şartlara uyularak yapıldı.

2.4.1. RNA İzolasyonu (Ekstraksiyon İşlemi)

Viral Gene Spin ™ Viral DNA/RNA ekstraksiyon kit içeriği ;

1.Lysis Buffer 30 ml
2.Binding Buffer 40 ml
3.Washing Buffer A 30 ml
4.Washing Buffer B 10 ml (Konsantre, kit açıldığında 40 ml etanol eklenir)
5.Elusyon Buffer
6.Spin Columns 50 adet

1. Vortekslenerek karıştırılmış nazofaringal sürüntü materyalinden 150 µl alınarak 1.5 ml lik tüp içerisine aktarıldı. Örnek hacmi 150 µl den az ise steril distile su ile hacim 150 µl ye tamamlandı.
2. Tüp içerisine 250 µl Lysis Buffer eklendi. Lysis buffer partikülleşmiş ise 80 °C'de 10 dakika inkübe edildi.
3. Karışım 15 saniye vortekslendi.
4. Oda sıcaklığında (15-25 °C) 10 dakika inkübe edildi.
5. Karışım üzerine 150 µl başlangıç hacmi için 350 µl, 300 µl başlangıç hacmi için 700 µl Binding Buffer eklendi.
6. Karışım 5-10 saniye vortekslendikten sonra tüm içerik spin filtreye aktarılıp 13.000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi.
7. Santrifüj sonrası alt tüp dökülerek filtre aynı tüp içerisine yerleştirildi.
8. Kolona 500 µl washing Buffer A pipetlendi ve 13.000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi.
9. Santrifüj sonrası alt tüp dökülerek filtre aynı tüp içerisine yerleştirildi. Kolona 500µl Washing Buffer B pipetlenip 13.000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi.
10. Santrifüj sonrası alt tüp dökülerek filtre aynı tüp içerisine yerleştirildi ve kolon boş olarak 13.000 rpm de 2 dakika santrifüj edildi.
11. Santrifüj sonrası kolon yeni 1.5 ml'lik tüpe yerleştirilip kolonun merkezine gelecek şekilde 50 µl Elution Buffer eklendi.

12. Tüp oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi ve sonrasında 13.000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi.
13. Elüsyon (RNA) – 20 °C'de muhafaza edildi.

2.4.2.cDNA Sentezi

1 örnek için **;** 8 µl Total RNA

1 µl Random Hexamer (0.2 µg/µl)

3 µl DEPC-treated water

---

12 µl miksi hazırlandı ve ; 80 °C de 3 dakika, 4 °C de 2 dakika Thermal cycler cihazında inkübe edildi. İnkübasyon sırasında aşağıdaki miks hazırlanarak;

4 µl 5X RT Buffer

2 µl 10 mM dNTP

1 µl Rnase İnhibitor (20u/µl)

1 µl Reverse Transcriptase (200u/µl)

---

8 µl tüp içerisine pipetlendi. Toplam hacim 20 µl oldu. PCR cihazında aşağıdaki protokol ile cDNA sentez reaksiyonu gerçekleştirildi. 37 °C de 90 dakika, 94 °C de 2 dakika tutuldu. 4 °C ye gelince işlem tamamlandı ve ürünler – 20 °C de muhafaza edildi.

2.4.3.Multipleks PCR Aşaması

Kit İçeriği (RV15) **;**

5X RV15 ACE A PM : Primer miksi

5X RV15 ACE B PM : Primer miksi

5X RV15 ACE C PM : Primer miksi

2X Multiplex Master Mix : PCR miksi

8-MOP Solution : Kontaminasyon önleyici ajan

RV15 ACE A Marker : PCR A set DNA ladder

RV15 ACE B Marker : PCR B set DNA ladder

RV15 ACE C Marker : PCR C set DNA ladder

RV12 ACE PC: Pozitif kontrol

RV12 ACE NC: Negatif kontrol

İnfluenza A virus primeri, RV15 ACE B setinde olup, 206 bp büyüklüğündedir. İnfluenza B virus RV15 ACE C setinde olup 455 bp büyüklündedir.

Bu aşamada 1 örnek için; A/B veya C multipleks PCR miksleri için 2 adet 0.2 ml lik PCR tüpü işaretlenip aşağıdaki protokole göre PCR miksleri hazırlandı;

4 µl 5X RV12 ACE PM (A veya B)
3 µl 8-Mop Solusyonu
10 µl 2X Multiplex Master Mix
---
17 µl

Hazırlanan PCR mikslerine 3µl cDNA ürününden eklendi ve aşağıdaki protokole göre PCR işlemi gerçekleştirildi:

94 °C de 15 dakika -1 döngü
94 °C de 30 saniye -40 döngü
60 °C de 90 saniye - 40 döngü
72 °C de 90 saniye- 40 döngü
72 °C de 10 dakika- 1 döngü
Son basamak olarak, ürünler 4 °C'de saklandı.

2.4.4.Agaroz Jel Elektroforezi

2 gram agaroz ve 10 µl Sybr Safe solüsyonu 100 ml TBE tamponu içerisine eklenerek tamamen çözülünceye kadar kaynatıldı. 5 µl multipleks PCR ürünü, 1µl jel yükleme boyası ile karıştırılarak jele yüklendi. Her bir multipleks PCR, DNA ladderından da jele 5 µl yüklendi. 180 voltta 50 mA'de 30 dakika elektoroforez yapıldı. Görüntüler optik kamera yardımı ile bilgisayara aktarıldı. Sonuçlar bilgisayar yardımı ile DNA ladder lar ile karşılaştırılarak yorumlandı.

3.BULGULAR

Konya ilinde çeşitli sağlık ocakları ve Meram Tıp Fakültesinde polikliniğe müracaat eden ve yatan hastalardan grip benzeri şikayeti olan 150 hasta çalışmaya dahil edildi. Bunlardan 59'i yetişkin 91'ı çocuktu. Çocuk hastaların 48'si (%52,74) erkek, 43'ü(%47,26) kızlardan oluşmakta idi. Erişkin hastaların ise 25'i (% 42,37) erkek, 34'ü (%57,63) ise kadındı. Olguların yaş grupları ve cinsiyete göre dağılımı çizelge 3.1'de görülmektedir. Çocukların yaş ortalaması 11,08±2,43, erkek hastaların yaş ortalaması 32,42±4,81, kadın hastaların yaş ortalaması 38,23±4,54 olarak belirlendi.

Çizelge 3.1. Hastaların yaş grupları ve cinsiyetlerine göre dağılımı.

Yaş gurubu (yıl)	Erkek	Kadın	Toplam
0-5	21	20	41
6-10	14	13	27
11-18	13	10	23
Ara toplam (Çocuk)	48	43	91
19-29	4	13	17
30-39	7	8	15
40-59	7	9	16
60 ve üzeri	7	4	11
Ara toplam (yetişkin)	25	34	59
Toplam	73	77	150

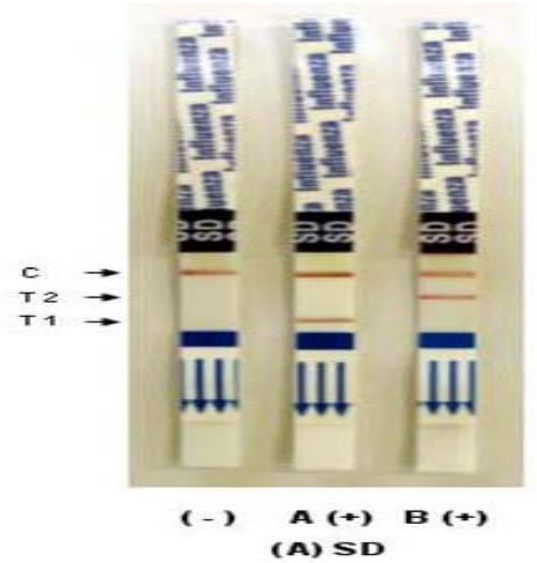
Araştırmaya dahil edilen 150 hastada burun akıntısı ve tıkanıklığı, boğaz ağrısı, ateş, öksürük gibi yakınmaları örnek alınmadan önce bilgi formuna kaydedildi. Bu hastalarda en fazla ateş ve öksürük şikayeti vardı. Bu şikayetlerin yaş guruplarına göre dağılımı çizelge 3.2'de verildi.

Hızlı antijen testi çalışılan 150 hastadan influenza A pozitif sonuç bulunan 31 hastadan 18'i erkek çocuk 11'i kız çocuk ve 2'si yetişkin ve kadındı. Fakat diğer testlerin de çalışıldığı hasta sayısı 130 olduğundan karşılaştırmada ve hesaplamalarda

aynı hasta gurubu alındı. Bu 130 hastadan influenza A pozitif sonuç bulunan 24 hastanın 13'ü erkek çocuk 9'u kız çocuktu. Sadece 2 yetişkin kadın hastada pozitiflik tespit edildi. Hızlı test çalışılan 150 hastadan influenza B pozitif sonuç bulunan 10 hasta bulunurken diğer testlerin çalışıldığı 130 hastada 9 pozitiflik saptandı (Şekil 3.1). Bu hastaların 3'ü erkek 5'i kız olmak üzere 8'i çocuk olup 1'i kadın hasta idi. Bu hastaların yaş ve cinsiyete göre dağılımı çizelge 3.3'de verildi.

Çizelge 3.2. Hasta yakınmalarının yaş gruplarına göre dağılımı.

Yaş gurubu	Ateş	Boğaz ağrısı	Burun akıntısı/ tıkanıklık	Öksürük
0-5	37	22	32	35
6-10	19	21	19	21
11-18	17	17	16	17
19-29	8	9	9	7
30-39	11	6	9	11
40-59	9	11	7	8
60 ve üzeri	3	4	4	3
Toplam	104	90	96	102

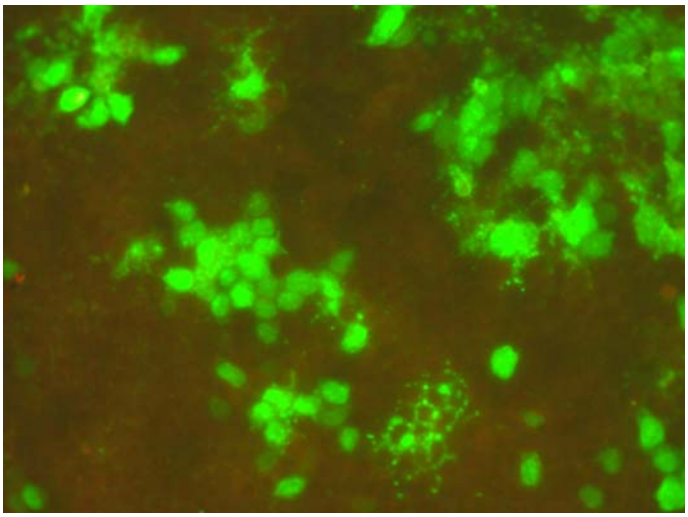


Resim 3.1.Hızlı antijen testinde negatif, İnfluenza A pozitif ve İnfluenza B pozitif görünüm.

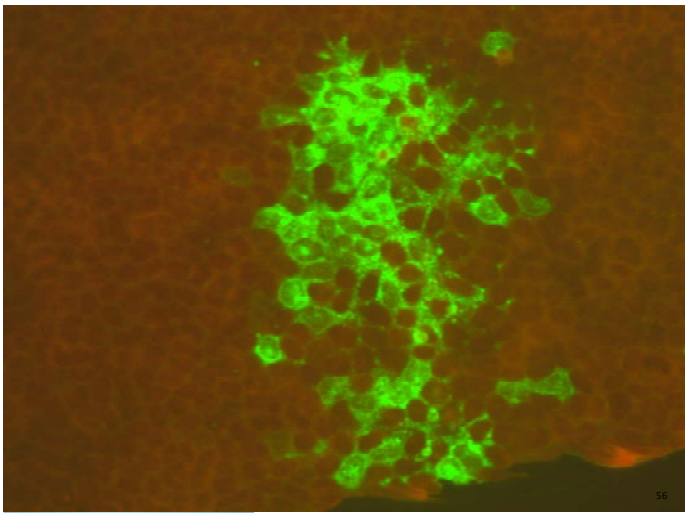
Çizelge 3.3. Hızlı antijen testi pozitif hastaların yaş ve cinsiyetlerine göre dağılımı.

Yaş gurubu	Erkek		Kadın	
	A Pozitif	B Pozitif	A Pozitif	B Pozitif
0-5	6	0	3	2
6-10	3	2	4	2
11-18	4	1	2	1
19-29	0	0	1	0
30-39	0	0	0	1
40-59	0	0	1	0
60 ve üzeri	0	0	0	0
Toplam	13	3	11	6

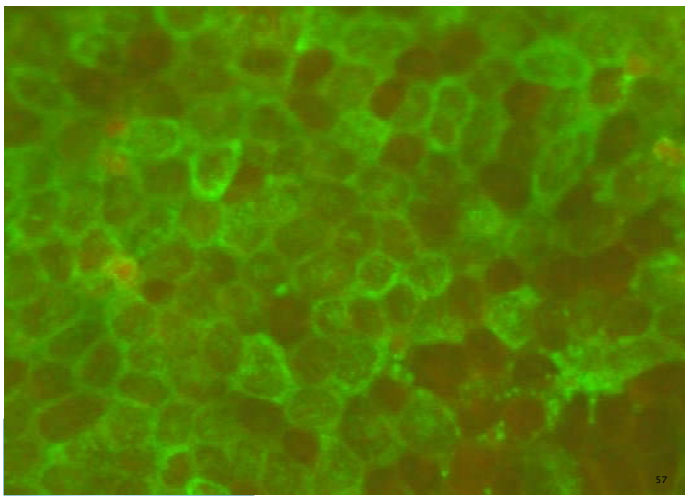
Hızlı antijen testi çalışılan bazı hastalardan viral transport vasatı olmadığından örnek alınamamıştır. Bu nedenle Shell-vial yöntemi ile çalışma 130 hastada yapıldı. Bu hastalardan 27'si çocuk, 1'i erkek 3'ü kadın olmak üzere toplam 31 hastada influenza A pozitif sonuç elde edildi (resimler 3.2, 3.3, 3.4). İnfluenza B çalışılan 130 hastada 8'si çocuk, 1'i erkek 1'ü kadın olmak üzere toplam 10 hastada pozitif sonuç elde edildi (resimler 3.5, 3.6, 3.7). Kültür yöntemi ile İnfluenza pozitif sonuçlarının yaş grupları ve cinsiyetlerine göre dağılımı çizelge 3.4'te gösterildi.



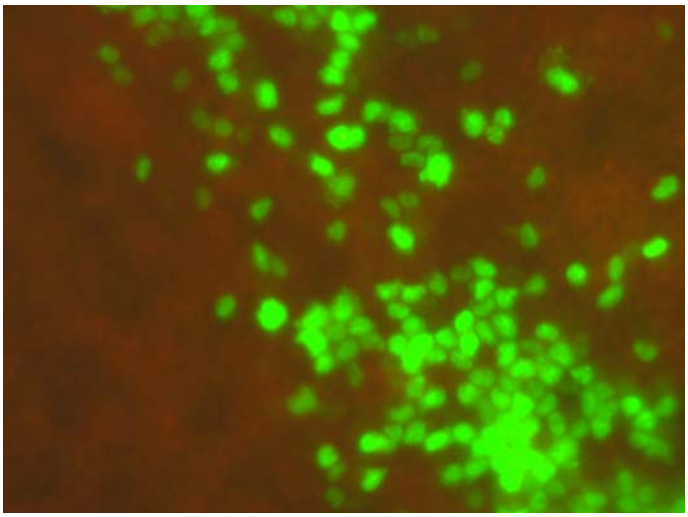
Resim 3.2.İnfluenza A pozitif hasta örneği (çalışmamızdan).



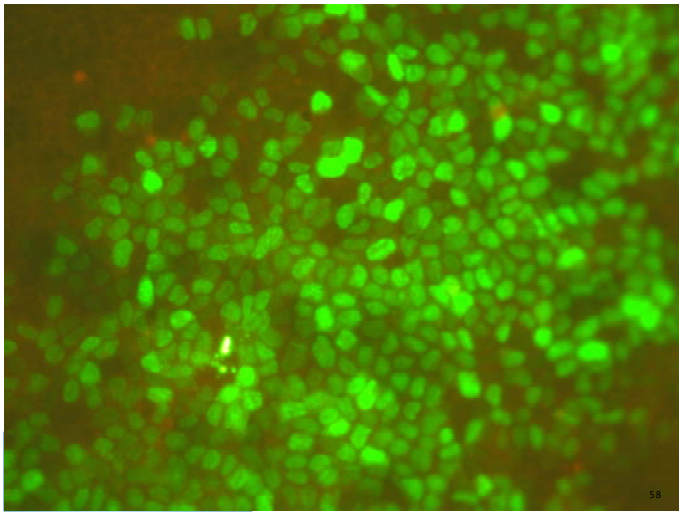
Resim 3.3. İnfluenza A pozitif hasta örneği (çalışmamızdan).



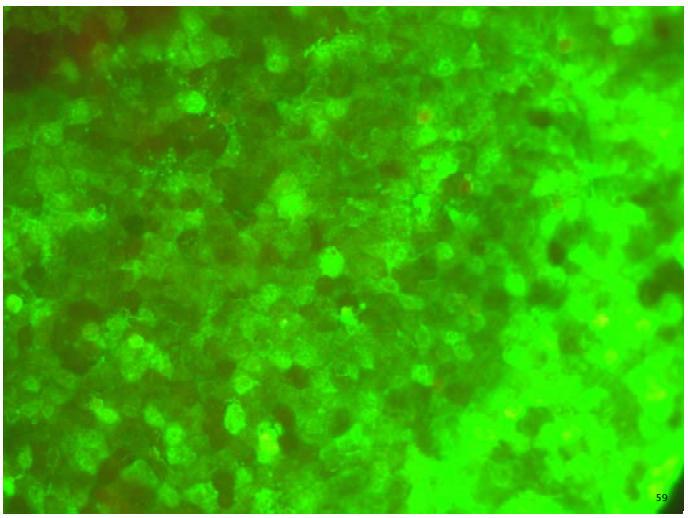
Resim 3.4.İnfluenza A pozitif hasta örneği (çalışmamızdan).



Resim 3.5.İnfluenza B pozitif hasta örneği (çalışmamızdan).



Resim 3.6.İnfluenza B pozitif hasta örneği (çalışmamızdan).



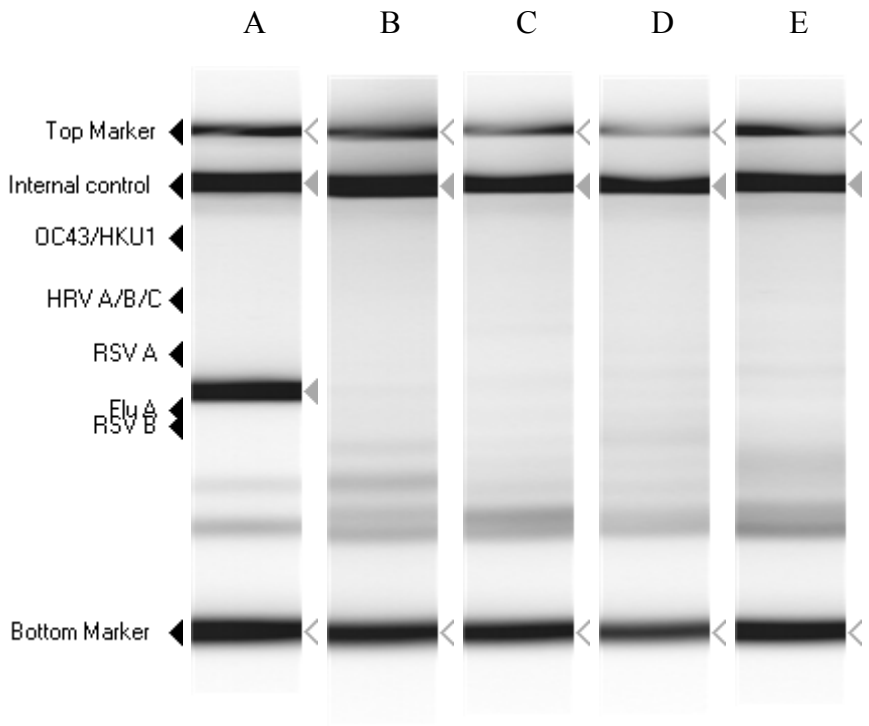
Resim 3.7. İnfluenza B pozitif hasta örneği (çalışmamızdan).

Çizelge 3.4.Kültür yöntemi ile influenza pozitif sonuçlarının yaş grupları ve cinsiyetlerine göre dağılımı.

Yaş gurubu	Erkek		Kadın	
	A Pozitif	B Pozitif	A Pozitif	B Pozitif
0-5	5	2	3	1
6-10	4	2	8	2
11-18	6	1	1	0
19-29	1	0	2	0
30-39	0	1	0	0
40-59	0	0	1	1
60 ve üzeri	0	0	0	0
Toplam	16	6	15	4

Araştırmamızda moleküler yöntem olarak multipleks PCR ile influenza A ve B varlığı çalışılmıştır. Hızlı antijen testi çalışılan bazı hastalardan viral transport vasatı olmadığından örnek alınamamıştır. Bu nedenle multipleks PCR yöntemiyle 130 hasta örneği çalışılmıştır. Bunlardan 24 hastada influenza A pozitif bulunurken, 4 hastada influenza B pozitif bulunmuştur (Resim 3.8). Hastaların yaş ve cinsiyetlerine göre dağılımı çizelge 3.5'de gösterilmiştir.

Farklı üç yöntemle influenza A ve B solunum yolu örneklerinde araştırılmış olup bunlardan shell-vial yöntemi, kültür ve immun floresan yöntemlerinin ortaklaşa çalışıldığı bir yöntemdir. Çalışmamızdaki pozitif bulunan ve karşılaştırmaya alınan testlerin sonuçları çizelge 3.6'da topluca verilmiştir. İnfluenza tanısında kullanılan testlerinin karşılaştırılmasında pozitif ve negatif testlerin sonuçları çizelge 3.7'de gösterilmiştir.



Resim 3.8. Multipleks PCR jel elektroforez görüntüsü (A. influenza A pozitif, B, C, D, E negatif).

Çizelge 3.5. Moleküler yöntem ile influenza pozitif sonuçlarının yaş grupları ve cinsiyetlerine göre dağılımı.

Yaş gurubu	Erkek		Kadın	
	A Pozitif	B Pozitif	A Pozitif	B Pozitif
0-5	4	0	3	1
6-10	3	1	4	0
11-18	2	1	3	1
19-29	0	0	0	0
30-39	1	0	3	0
40-59	1	0	0	0
60 ve üzeri	0	0	0	0
Toplam	11	2	13	2

Çizelge. 3.6. İnfluenza A ve B nin pozitif bulunduğu örneklerin çalışılan testlere göre dağılımı

Örnek no	Hızlı test		Shell-vial		PCR	
	A	B	A	B	A	B
1	+	-	-	-	+	-
2	-	-	+	-	-	-
3	-	+	-	++	-	+
4	-	+	-	+	-	+
8	+	-	+	-	+	-
17	-	+	-	+	-	+
18	-	+	-	++	-	+
19	-	+	-	+	-	-
20	-	+	-	+	-	-
33	-	-	+	-	+	-
38	-	-	+	-	-	-
41	-	-	+++	-	-	-
43	-	-	+	-	-	-
53	-	-	++	-	+	-
54	+	-	+	-	+	-
56	+	-	-	-	+	-
78	-	-	-	-	+	-
83	-	+	-	+	-	-
85	-	+	-	+	-	-
99	+	-	+	-	-	-
107	-	+	-	+	-	-
118	+	-	++	-	-	-
120	-	+	-	+	+	-
121	+	-	+++	-	+	-
123	+	-	+	-	+	-
125	+	-	+++	-	+	-
127	+	-	++	-	-	-
128	+	-	+++	-	+	-
129	+	-	+++	-	+	-
130	+	-	+++	-	+	-
131	+	-	+	-	-	-
132	+	-	+	-	+	-
133	-	-	++	-	+	-
134	+	-	+++	-	+	-
136	+	-	+++	-	+	-
137	+	-	++	-	+	-
138	-	-	+	-	-	-
140	+	-	++	-	+	-
142	+	-	+++	-	+	-
144	+	-	+	-	-	-
145	+	-	+	-	-	-
146	+	-	+	-	+	-
148	+	-	++	-	+	-
150	-	-	+++	-	+	-

Çizelge.3.7. İnfluenza tanısında kullanılan testlerinin pozitf ve negatif sayıları.

	Hızlı test		**Shell-vial**		**Multipleks PCR**	
İnfluenza tipi	A	B	A	B	A	B
Pozitif	24	9	31	10	24	4
Negatif	106	121	99	120	106	126
Toplam	130	130	130	130	130	130

İnfluenza tanısında hücre kültür yöntemi gold standart yöntem olduğundan bu üç metottan Shell-vial yöntemi standart alınarak diğer iki yöntemin tanı değeri araştırılmıştır. Hızlı antijen testinin ve multipleks PCR testlerinin sensitivite, spesifite, pozitif prediktif değer, negatif prediktif değeri çizelge 3.8'de verilmiştir.

Çizelge 3.8. Kültür metoduna göre hızlı antijen ve PCR testlerinin sensitivite, spesifite, pozitif prediktif değer, negatif prediktif değerleri.

	Hızlı antijen testi		PCR	
	İnfluenza A	İnfluenza B	İnfluenza A	İnfluenza B
Sensitivite (%)	77,41	90,0	77,41	40,00
Spesifite (%)	93,39	95,8	95,95	97,50
Pozitif Prediktif Değer (%)	80,00	64,3	85,71	57,14
Negatif Prediktif Değer (%)	93,13	99,1	93,13	95,12

İnfluenza tanısında multipleks PCR standart yöntem olarak alındığında, hızlı antijen testi ve Shell-vial testlerinin sensitivite, spesifite, pozitif prediktif değer, negatif prediktif değeri çizelge 3.9'de verilmiştir.

Çizelge 3.9. PCR metoduna göre hızlı antijen ve Shell vial testlerinin sensitivite, spesifite, pozitif prediktif değer, negatif prediktif değerleri.

	Hızlı antijen testi		Shell vial	
	İnfluenza A	İnfluenza B	İnfluenza A	İnfluenza B
Sensitivite (%)	83,33	100	82,60	100
Spesifite (%)	96,23	96,03	88,78	95,23
Pozitif Prediktif Değer (%)	83,33	44,44	61,29	40,00
Negatif Prediktif Değer (%)	96,23	100	95,95	100

4. TARTIŞMA

İnfluenza virus infeksiyonlarının tanısı ve identifikasyonu bir ülke ve bölge için özel önem taşımaktadır. Çünkü epidemi ve pandemi gibi salgınlar yaparak toplumun önemli bir kısmını etkileyebilmekte bazen de ölümlere neden olmaktadır. Bu gibi durumlarda hastalığın yayılımını engellemek ve solunum yolu semptomları olan hastaları tedavi etmek için hastalığın hızlı tanısı gerekmektedir. Sağlık ocakları ve hastanelere müracaat eden hastalarda hasta başında hızlı tanıya imkan vermesi nedeniyle hızlı antijen testleri hastalık tanısında faydalıdır. Bu sebeple birçok ticari hızlı testler geliştirilmiştir. Bu ticari kitler A ve B virusun varlığını 10-30 dakika içinde belirler. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), hızlı testlerin influenza tanısında yerinde ve doğru kullanımı için önerilerde bulunmuştur (WHO 2005). Buna göre İnfluenza virus sürveyansı yapılan bir ülkede influenza virus aktivitesinin düşük olduğu zamanlarda hızlı test ile alınan pozitif sonuçlar IFA, viral kültür veya PCR ile teyid edilmeli; yüksek influenza aktivitesinin olduğu dönemlerde ise, klinik tedavinin yönlendirilmesinde öncelikli olarak klinik ön tanı ve sürveyans verileri değerlendirilmelidir. Hızlı tanı ise sadece tedavi için acil sonuç gereken hastalarda kullanılmalıdır. İnfluenza sürveyansının yapılmadığı ülkelerde hızlı testin prediktif değeri bilinemeyeceği için, grip vakalarının tanısında kullanılması önerilmemektedir. Bu ülkelerde hızlı tanı testi ile elde edilen hem negatif hem pozitif sonuçların diğer testlerle teyid edilmesi, bunun yapılamadığı durumlarda ise örneklerin bir influenza referans laboratuvarına gönderilmesi tavsiye edilmektedir.

İnfluenza A ve B virusların tespitinde kullanılan başlıca hızlı testler BD Directigen Flu A, Flu OIA, QuickVue, BD Directigen Flu A+B, Zstat Flu, İnfluenza A/B Rapid test, Binax NOW Flu A ve B'dir. Bu testlerden BD Directigen Flu A+B, QuickVue ve Binax NOW Flu A ve B, SD Influenza Antigen İnfluenza A ile B viruslarının ayrımını yapabilen testlerdir. Hızlı sonuç vermesine rağmen, kullanılan kite ve örneklere göre çalışma zamanı değişmektedir. Çalışmamızda SD Influenza Antijen testi, hasta örneği alınırken çalışılmış ve kültür yöntemi ile çalışılan 130 örnekle karşılaştırılması yapılmıştır. 130 örneğin 24'inde (% 16,00) İnfluenza A pozitifliği saptanırken 9 (% 6,00) İnfluenza B virus pozitifliği elde edilmiştir. Buna göre testin duyarlılığı influenza A için % 77,41, özgüllüğü % 93,39, PPD'i % 80,0, NPD'i % 93,13 olarak hesaplanırken, influenza B için duyarlılık % 90,00, özgüllük % 95,83, PPD'i % 64,28, NPD'i 99,10 saptanmıştır. Hızlı testler ile ilgili

benzer bir çalışmada (Boivin ve ark 2001) FLU OIA testinin hücre kültürü ve RT-PCR standart alınarak yapılmış ve buna göre FLU OIA testinin duyarlılığı % 54,0, özgüllüğü % 74,1 olarak bulunmuştur. Aslan'ın (2006) yaptığı çalışmada FLU OIA testin duyarlılığı çok düşük (% 14,5) ve özgüllüğü % 100 bulunmuştur. Yine bu kit ile yapılan ve hasta başında kullanımının değerlendirildiği Thomas ve ark. nın (2003) yaptığı bir çalışmada, bu tür hızlı testlerin influenza tanısında ortalama 9 gün kazandırdığı ve aktivitesindeki artışta epidemi öncesi "erken uyarı" rolü oynayabilecekleri belirtilmiştir. EIA prensibi ile çalışan Directigen FLU A+B hızlı kitinin shell vial hücre kültürü ile karşılaştırıldığı bir çalışmada, kitin duyarlılığı, özgüllüğü, pozitif ve negatif prediktif değeri influenza A virusu için % 82,9, % 100, % 100 ve % 92,4; influenza B virusu için ise % 51,5, % 100, % 100 ve % 84,3 olarak bulunmuştur (Reina ve ark 2002). Bu sonuçlar Directigen Flu A+B testinin, influenza A virusunun rutin tanısında kullanılabileceğini, İnfluenza B virusu için ise duyarlılığın düşük bulunmakla beraber, hızlı testin tanıda faydalı olacağı sonucuna varılmıştır. Benzer başka bir çalışma 2003 yılında Dunn ve ark tarafından yapılmış ve önceki çalışmadan farklı olarak influenza A için aynı duyarlılıkta ve özgüllükte bulunmuşken (% 54,8 ve % 100), İnfluenza B için benzer duyarlılıkta (% 62,5, % 56) ve aynı özgüllükte (%99,6) bulunmuştur. Hızlı testlerle yapılan çalışmalarda duyarlılık ve özgüllük açısından geniş bir aralıkta değişmektedir.

İnfluenza A varlığını araştıran hızlı testlerde genellikle RNA segment 5'te bulunan 498 aminoasidlik nükleoproteine karşı geliştirilmiş monoklonal antikor bulunur (Yang ve ark 2008). Nükleoproteinin antijenik özgüllüğü, virusun taşıdığı genleri aldığı insan, kuş, domuz gibi canlı türleri ile ilişkilidir. Pandemik influenza A/H1N1 2009 önceki influenza A tiplerinden farklı olduğundan önceden üretilmiş kitlerle çalışıldığında hızlı testlerin sensitivitesi %10-69 arasında değişmektedir (Chen ve ark 2010). Düşük titredeki İnfluenza varlığı muhtemelen tespit edilememektedir. Bu amaçla Chen ve ark iki adet nükleoproteine karşı geliştirilmiş monoklonal antikor kullanarak hızlı tanı kiti geliştirmişler ve insan örneklerinde % 88,5 sensitivite ve % 99,3 spesifite elde etmişlerdir (Chen ve ark 2010).

Virus izolasyonu için solunum yolundan örnek alınması, virusla infekte hücrelerin, alınan örnek içinde bulunması ile sağlanabilir. Bunun için en uygun örnekler, yüksek hücre içerikleri nedeniyle nazofarinks yıkama ve aspirat sıvılarıdır.

Ama bu örneklerin alımı zor ve zahmetli olduğundan her zaman mümkün olmamaktadır. Hastaya sıkıntı vermemesi, özel bir tecrübe ve araç gerektirmemesi nedeniyle solunum viruslarının aranmasında burun ve boğaz sürüntüsünün kullanımı yaygındır (Esposito ve ark 2010). Bizim çalışmamızda da kolaylık nedeniyle bu örnekleme tercih edilmiştir. Aslan'ın (2006) yaptığı çalışmada burun sürüntüsünün % 58, boğaz sürüntüsünün ise % 54'ünde pozitiflik elde edilmiş ve her iki muayene örneğinde de benzer influenza virus pozitifliği saptanmıştır. Covalciuc ve ark (1999) yaptığı bir çalışmada boğaz sürüntüsü, nazal aspirat, nazofarinks ve tükürük örneklerinin karşılaştırılmış ve nazal aspirat ve nazofarinks sürüntüsü influenza virus tespitinde en uygun örnekler olarak bulunmuştur. Sürüntü örneğinin alınmasında kullanılan eküvyondaki pamuk, rayon ve plastikten yapılmış fırça tipindeki (flocked) maddeler, örneğe geçen virusla infekte hücre sayısını etkilemektedir (Daley ve ark 2006, Esposito ve ark 2010).

Dünyada çapında dolaşımda olan İnfluenza A/H1N1, H3N2 ve İnfluenza B virusları başlıca İnfluenza viruslarıdır. Bu viruslarda görülen küçük veya büyük çapta antijenik değişikliklerle epidemi ve pandemiler oluşur. İnfluenza sürveyansı yapılan bir laboratuarda hücre kültüründe izolasyon sonrasında dolaşımdaki İnfluenza virusların alttip ve antijenik tip tayinleri ile o sene görülen antijenik değişikliklerin tespiti yapılmaktadır. Bunun için her yıl Dünya Sağlık Örgütü tarafınan sürveyans laboratuarlarına dağıtılan ve özgül antijenik tiplendirmeye imkan veren gelincik serumlarının kullanıldığı hemaglütinasyon inhibisyon deneyi (HAI) uygulanmaktadır. Aslan'ın (2006) İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesinde yaptığı tiplendirme çalışmasında 54 İnfluenza A virus suşunun 24'ü HAI ile tiplendirilmiştir. 24 suşun ikisi (% 8) H3N2 anti-serumlarıyla, 22'si (% 92) H1N1 antiserumu ile reaksiyon vermiştir. Kasım 2007-Mayıs 2008 döneminde Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Ulusal İnfluenza Laboratuvarında yapılan surveyans çalışmasında 73 (% 6,3) İnfluenza A H1N1, 115 (% 9,9) İnfluenza A H3N2, 88 (% 7,6) İnfluenza B saptanmıştır. Konya bölgesinden alınan 73 örnekte, 2 İnfluenza A H1N1, 4 İnfluenza A H3N2, 1 İnfluenza B saptanmıştır.

İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesinde yapılan çalışmada influenza virusunun klinik sürveyansında klinik ön tanıyı değerlendirmek için çeşitli semptomlar ve virus izolasyonu arasındaki ilişki incelenmiştir. 2004-2005 sezonunda İnfluenza virus

açısından pozitif bulunan 55 vakanın 47'sinde (% 86) yüksek ateş, 45'inde öksürük (% 82), 39'unda (% 71) burun akıntısı, 30'unda (% 55) halsizlik, 19'unda başağrısı (% 35), 16'sında (% 29) kas ağrısı, üçünde kulak ağrısı (%5); 2005-2006 sezonunda ise 30 İnfluenza pozitif vakanın 20'sinde (% 67) yüksek ateş, 30'unda öksürük (% 100), üçünde burun akıntısı (% 10), yedisinde (% 23) başağrısı görülmüştür. Bizim çalışmamızda kültür yöntemi ile A veya B pozitif bulduğumuz 41 hastadan 30 (% 73,17)'unda ateş saptanırken, 32 (% 78,04)'sinde boğaz ağrısı, 27 (% 65,85)'sinde burun akıntısı ya da tıkanıklığı tespit edilmiştir. Aslan'ın (2006) yaptığı çalışmada influenza virus pozitif bulunan vakalarda en sık karşılaşılan semptomların çocuk hastalarda yüksek ateş, öksürük, burun akıntısı, halsizlik olduğu, yetişkinlerde ise benzer klinik tabloların görüldüğü fakat burun akıntısına daha az rastlandığı saptanmıştır. Bu çalışmada ayrıca influenza virusu izolasyonlarının yaş gruplarına dağılımı incelenmiş ve 2004-2005 sezonunda en yüksek izolasyonun 0-4 (% 46) ve 5-14 yaş grubunda (% 48); 2005-2006 sezonunda ise en yüksek izolasyonun 15-59 (% 57) yaş grubunda olduğu görülmüştür. Bizim çalışmamızda ise influenza A Shell vial kültür yöntemi ile sık 6-10 yaş gurubunda 12/31 (% 38,7) pozitif bulunurken, influenza B yine 6-10 yaş arası en sık 4/10 (% 40,00) bulunmuştur. Hızlı antijen testine göre ise influenza A en sık 0-5 yaş gurubunda pozitif saptanırken 9/24 (%37,5), influenza B 6-10 yaş gurubunda 4/9 (%44,44) rastlanmıştır. Bizim çalışmamızda hastalık semptomlardan en sık boğaz ağrısı, daha sonra ateş tespit edilmiştir.

Grip etkeni olan influenza virüs A, B ve C tipleri, farklı klinik tablolarla insanlarda hastalık yaparlar. İnfluenza A ve influenza B hemen hemen her yıl salgınlar yapmaktadır. İnfluenza C ise hafif tablolu ve seyrek görülen hastalıklara neden olur. Bu üç tipin arasında daha sık ve daha ciddi klinik tablolara sebep olan tip, influenza A tipidir. İnfluenza A tipi hemen hemen her yıl yeni varyasyonlarla toplumu infekte etmektedir. İnfluenza A virüsünün ciddi problemlere sebep olan en önemli özelliği, farklı tiplere özgü alt grupların, birbirinden genetik materyal alış verisine açık olmasıdır. Oluşan yeni virüs insana özgü bir virüsten gen alırsa, insandan insana bulaşma özelliği de kazanabilir. Bu genetik ve buna bağlı antijenik değişim son derece ciddi problemlere neden olmaktadır (Cazacu ve ark 2004). Bu nedenle dolaşımdaki viruslar toplum sağlığı açısından sürveyans çalışmaları ile takip edilmektedir.

Sürveyans çalışmalarında kullanılan standart laboratuvar metotları, hücre kültüründe veya embriyonlu yumurtada virusun izolasyonu ve moleküler yöntemlerdir. Genellikle sonucun elde edilmesi için diğer testlerden daha uzun bir sürenin gerektiği bu standart yöntemlerde, virus üremesinin kontrolü için CPE araştırılması, hemaglütinasyon ve hemadsorbsiyon yöntemleri; identifikasyon için ise IFA veya ELISA deneyleri uygulanmaktadır (Boivin ve ark 2001). IFA ve hızlı test gibi antijen tanı yöntemleri ise, ilaç kullanımı ve infeksiyon kontrolünün söz konusu olduğu durumlarda ve hızlı tanının önem taşıdığı birinci ve ikinci basamak sağlık kurumlarında kullanılır (Booth ve ark 2006). Bu kadar yaygın olabilen ve epidemi, pandemi gibi salgın yapabilen bir virus infeksiyonun tanısı her düzeydeki sağlık kuruluşunda önem kazanmaktadır. Hasta tedavisi ve profilaksisinde nöraminidaz inhibitörlerinin kullanılabilmesi için, hızlı ve güvenilir sonuç veren testler özellikle üçüncü basamak hastaneler için şarttır. Antijen saptayan mevcut hızlı testlerin göreceli olarak düşük duyarlılığa sahip olmaları, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek olup çabuk sonuç elde edilen testlere olan gereksinimi arttırmıştır. Bu nedenle, çeşitli moleküler yöntemler geliştirilmiştir. Daha çok PCR temeline dayanan bu yöntemler ile influenza virusu tespitinde artan oranda kullanılmaya başlanmıştır (Wei ve ark 2006). Son zamanlarda geliştirilen PCR çeşitlerinden biri olan ve bir seferde birçok solunum yolu viral etkenlerinin araştırılabildiği multipleks PCR primerleri geliştirilerek kullanıma girmiştir.

Çalışmamızda multipleks PCR'ın İnfluenza virus infeksiyonundaki tanı değerini belirlemek amacıyla 2008-2010 yılları arasındaki iki sezonuna ait toplam 130 solunum yolu örneği PCR ve hücre kültürü ile çalışılarak, bu yöntemlerin duyarlılık ve özgüllükleri karşılaştırılmıştır. Karşılaştırmada hücre kültürü yöntemi diğer bir çok çalışmada olduğu gibi altın standart kabul edilmiştir (Booth ve ark 2006, Çicek ve ark 2007, Hurt ve ark 2007, Roh ve ark 2008, Kim ve ark 2009). Çalışmamızda, 31 influeza A hücre kültür pozitifliği bulunurken multipleks PCR ile sadece 24 adet pozitiflik bulunmuş ve sensitivite %77,41, spesifite % 95,95 pozitif prediktif değer % 85,71, negatif prediktif değer % 93,13 bulunmuştur. İnfluenza B için bu değerler sırası ile % 40,00, % 97,50, % 57,14 ve % 95,12'dir. Bu testin İnfluenza B tanısı için sensitivitesi ve pozitif prediktif değeri düşük bulunsa da diğer

parametreler yüksek bulunduğundan bu testin tanı değeri rutin tanıda kullanılmasına imkan verecek kadar iyidir.

Epidemi ve pandemi esnasında İnfluenza infeksiyonunun hızlı tanısı önem kazanmaktadır. Bu durumda kullanılmak üzere moleküler tanı yöntemleri geliştirilmiştir. 2009 pandemik A H1N1 virus tanısı için Dong ve ark (2010) multifloresan Real-time RT-PCR geliştirerek hızlı tanı için kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Yine Weili ve ark (2010) pandemi esnasında geliştirdikleri Real-time RT-PCR'ın DSÖ'nün önerdiği primer ve problara göre daha iyi sonuç verdiğini ifade etmişlerdir. Pandemik İnfluenza A /H1N1 2009 tanısı için Choi ve ark (2010) ları bir çok farklı metodu karşılaştırmışlar ve multipleks RT-PCR ve hızlı antijen testinin sensitivitesini Real-time RT-PCR'dan önemli derecede az bulmuşlardır.

Üst solunum yolları infeksiyonlarının en sık nedeni viruslardır. Viruslar üst solunum yollarında % 90'lara varan bir oranda etken olabilmektedir. Yetişkin yaş grubunda rinovirus başta olmak üzere, koronavirus, adenovirus, influenza A/B, para influenza virus, RSV üst solunum yolu infeksiyonlarının en sık saptanan etkenleridir (Hendly ve ark 2000). Ülkemizde değişik bölgelerde İnfluenza sıklığını araştıran çalışmalar yapılmıştır. Yılmaz ve arkadaşlarının 2002 yılında Trabzon'da IFA yöntemi ile solunum viruslerini araştırdıkları çalışmasında influenza virus A % 4.2 ve influenza virus B % 45,8 olarak bildirmişlerdir (Yılmaz ve ark 2002). 1994 yılında, Yarkın ve arkadaşlarının Adana'da pediatrik yaş gurubunda viral solunum yolu infeksiyon etkenlerini araştırdıkları çalışmada influenza A virus sıklığını % 2.4 ve influenza B virus sıklığını % 9.9 saptamışlardır (Yarkın ve ark 1994).

İnfluenza A H5N1 kanatlılarda salgın yaptığı 2005 yılında, insanlarda infeksiyona neden olarak ölümlere neden olmuş ve epidemi hatta pandemiye neden olabileceği düşünülmüştü. Bu sırada moleküler yöntemle hızlı tanı çalışmaları önem kazanmıştı. Multipleks PCR yöntemleri, tek bir patojendeki veya birden fazla patojendeki birden fazla gen ya da gen segmentinin tespiti için, tek bir çoğaltma reaksiyonunun kullanıldığı yöntemlerdir. Çeşitli primer setlerin bir arada kullanıldığı bu yöntemlerle, klinik örneklerde farklı solunum viruslarının aranmasının yanı sıra, İnfluenza A ve İnfluenza B viruslarının tespiti de gerçekleştirilmektedir. Grip infeksiyonunun semptomları ile soğuk algınlığı semptomları birbirine benzerdir. Fakat soğuk algınlığında ateş daha nadir ve semptomlar hafiftir. Tanı amaçlı

laboratuvarlarda grip ve soğuk algınlığı etkenlerini beraber araştırma eğilimi mevcuttur. Bu sebeple multipleks PCR yöntemi kullanılmakta solunum yollarında en sık görülen 12-15 virus arasından pozitif olanlar saptanmaktadır. Çin'de Wu ve ark (2008) larının yaptığı bir çalışmada multipleks real time RT-PCR ile İnfluenza A ve tanısı ve H5N1alt tip tanısının tek bir tüpte yapılması amaçlanmış ve yapılan çalışmada 189 örnek moleküler ve konvansiyel kültür yöntemi ile kıyaslanmıştır. Bunlardan kültürde 46 pozitiflik bulunurken real time RT-PCR ile 81 pozitif bulunmuştur. Araştırmacılar multipleks real time RT-PCR yönteminin konvansiyonel kültür yönteminden daha duyarlı olduğu sonucuna varmışlardır (Wu ve ark 2008). 2006 yılında Seul'de yapılan bir çalışmada 101 solunum yolu örneği ile yapılan bizim çalışmamıza benzer bir çalışmada influenza A ve B için hücre kütürü ve aynı ticari marka multipleks PCR sonuçları karşılaştırılmış ve %88,7 uyumlu bulunmuştur (Kim ve ark 2009). Bu çalışmada bizim çalışmadan farklı olarak diğer solunum yolu virusları da hücre kültüründe üretilerek kıyaslamaya dahil edilmesi çalışmamıza göre bir üstünlük olmuştur. Yapmış olduğumuz çalışmada hızlı antijen testleri de çalışılmış olması da bizim çalışmamızın bir üstünlüğü olmuştur.

Schweiger ve ark (2000) ları fluorojenik bazlı PCR yöntemi ve hücre kültüründe izolasyon yöntemini uygulayarak, her iki tekniğin sonuçlarını kıyaslamışlardır. PCR yönteminde, İnfluenza virusun M proteinini sentezleyen gen bölgesini tespit eden primer-prob kullanılmıştır. Hücre kültürü için MDCK hücreleri kullanılmış ve ekim sonrası günlük CPE araştırması, hemaglütinasyon ve hemadsorbsiyon yöntemleri virus üremesini tespit için uygulanmıştır (Schweiger ve ark 2000). Bu çalışmada 1997-1998 kış sezonunda gelen 705 örneğin 195(% 28)'inde PCR ile pozitiflik elde edilmiş, 101 (%18) örneğin ise hücre kültüründe izolasyonu yapılmıştır. 1998-1999 kış sezonunda incelenen 1840 örneğin 525(% 29)'inde PCR ile İnfluenza virusu tespit edilirken, yalnız 281 örnekte (%15) izolasyon tespit edilmiştir. Bu duruma göre TaqMan PCR yöntemi, hücre kültürü ile izolasyon yönteminden daha duyarlı bulunmuştur. Bu sebeple bazı araştırmacılar hücre kültürü ile beraber PCR'ı gold standart olarak kullanılmasını önermişlerdir (Lialo ve ark 2009).

Koenig ve ark (2003) ları İnfluenza A ve B viruslarının solunum örneklerinden tespiti için, kullandıkları multipleks PCR yönteminde, virusun her iki

tipi için de M ve HA gen bölgelerine ait iki farklı primer seti kullanmışlardır. M ve HA primerleriyle aynı sonuçlar alınmış ve her iki primer seti ile de % 38,1 oranında İnfluenza A ve B pozitifliği saptanmıştır. Ayrıca örnekler dört farklı hücre kültürüne ekilerek 37°C'da inkübe edilmiş, virus üremesini kontrol için yapılan CPE incelemesinde negatif bulunan örneklere iki hafta sonra hemadsorbsiyon uygulanarak, İnfluenza virus araştırılmıştır. Bu yöntemle izolasyon oranı % 13,4 olarak saptanmış ve PCR pozitif, kültür negatif bulunan örnek sayısı 24 iken, kültür pozitif, PCR negatif örnek bulunmadığı; virus izolasyonu yapılan tüm örneklerin PCR yöntemiyle de tespit edildiği bildirilmiştir (Koenig ve ark 2003). Bizim çalışmamızda kültür negatif iken PCR pozitif örnek sayısı İnfluenza A'da 4 ve İnfluenza B'de 3'tür. Kültür pozitif iken PCR negatif örnek sayısı İnfluenza A'da 11 ve İnfluenza B'de 6'dır.

Solunum yolu patojenleri ile meydana gelen infeksiyonların, biribirinden ayrımı zordur. Bu yüzden İnfluenza benzeri hastalıklı (*Influenza-like illness*, *ILI)* bireylerden elde edilen örneklerden, İnfluenza virusu açısından negatif bulunmuş olanların, diğer solunum viruslarını içerme olasılığı yüksektir. Bu viral etkenlerin, aynı solunum örneklerinde tek bir reaksiyonla taranması zaman kaybını önlemesinin yanı sıra, ekonomik açıdan da maliyeti düşürmektedir. İnfluenza A ve B viruslarına ek olarak RSV (Respiratuvar Sinsityal Virus)'un A ve B alttiplerinin tek bir reaksiyonda tespit edildiği modifiye bir multipleks PCR çalışmasında, İnfluenza virus kültürü ile multipleks PCR arasında korelasyonun iyi olduğu ve ayrıca uygun primerler kullanıldığında, klinik örneklerdeki mikst infeksiyonların bu PCR yöntemi ile kolayca saptanabildiği tespit edilmiştir (Stockton ve ark 1998, Roh ve ark 2009).

Son yıllarda moleküler tanı tekniklerinde çok büyük gelişmeler kaydedilmiştir. Moleküler yöntemlerin gelecekteki uygulama alanı epidemiyolojik ve klinik olarak benzer çok sayıda patojenin tek bir test ile saptanabildiği ve karakterize edilebildiği multipleks tespit sistemlerin yaygınlaşması olacaktır (Kim ve ark 2009). Replike olmayan virusların tespiti ve çok düşük miktarda infeksiyöz virus içeren örneklerin incelenmesi açısından PCR teknikleri oldukça yararlı olmakla beraber antijen tespiti ve hücre kültüründen daha yüksek maliyet gerektirmektedir. Bu sorunun PCR'ın multipleks şeklinde uygulanması ile büyük ölçüde azaltılacaktır (Pregliasco ve ark 1998, Aslan 2006). PCR yöntemlerinin çok duyarlı yöntem olması

yanında yoğun emek gerektiren işlemleri söz konusudur. Bu yüzden moleküler yöntemlerin daha yaygın kullanım alanı bulması, klinik laboratuarlarda rutin uygulanabilmesi ticari kitlerin yaygınlaşması ve örnek sayının artmasına bağlıdır. Nükleik asit deneyleri genellikle birkaç etapta gerçekleştirilir ve her işlemde potansiyel hata kaynağı oluşabilir. İnsan hatası her basamakta meydana gelebilir. Bu durum, basamakların bazılarının ya da hepsinin otomotize edilmesiyle iyileştirilebilir. Real time PCR yöntemleri büyük ölçüde bu olanağı sağlamaktadır.

Bir çalışmada çok sayıda örneğin bir arada çalışıldığı düşünüldüğünde, İnfluenza sezonu esnasında zaman kaybını önlemek ve kontaminasyondan kaynaklanan yalancı pozitiflikleri engellemek için gerekli önlemlerin alınmasının önemi ortaya çıkmaktadır. Bu tür yalancı pozitifliklerin elimine edilmesi için, sürüntü örneklerinin viral transport besiyerinden çıkarılması işleminden başlayarak, RNA ekstraksiyonu, cDNA sentezi, PCR karışımının hazırlanması ve çoğaltma prosedürü olmak üzere PCR işleminin her aşamasında kontaminasyon riski olabilecek nedenlerin ortadan kaldırılması ve işlemlerin dikkatle gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Real time PCR yöntemlerinde, PCR sonrası işlem gerekmediğinden PCR sonrası kontaminasyonun söz konusu olmaması, real time PCR yöntemlerinin diğer PCR yöntemlerinden avantajlı olmasını sağlamaktadır (Aslan 2006). İnfluenza virusunun tanısı için yapılan çok sayıda çalışmada agaroz jel analizi, prob hibridizasyon, nested PCR, multipleks PCR ve PCR-ELISA gibi farklı moleküler teknikler geliştirilmiştir. Bu çalışmaların çoğunda bu tekniklerin birbirleriyle ve hücre kültüründe izolasyon gibi standart yöntemler ile karşılaştırılması yapılarak, duyarlılık ile özgüllükleri incelenmiştir. İstanbul Tıp Fakültesinde yapılan çalışmada hücre kültürünün duyarlılığı % 86,6, özgüllüğü % 100; in-house PCR'ın duyarlılığı %76,6, özgüllüğü %100 bulunmuştur (Aslan 2006).

Hücre kültürü ve PCR yöntemleriyle yapılan bazı çalışmalarda, hücre kültüründe izolasyonun çeşitli faktörlere bağlı olduğu, bu sebeple yöntemin PCR yönteminden daha az duyarlı bulunmasına neden olduğu belirtilmektedir (Kesson 2007, Lialo 2009). Toplanan örneklerin laboratuvara gönderilmesinde soğuk zincir koşullarına uyulmaması, alındıktan sonra geciktirilerek laboratuvara ulaştırılması ve örneklerin klinik belirtilerin başlamasından itibaren ilk üç gün içinde alınmaması klinik örnekteki infeksiyöz partikül varlığını olumsuz yönde etkileyen faktörlerdir.

Bu durum, hücre kültüründe virus izolasyonun azalmasına neden olabilmektedir. Ayrıca örnek alımında kullanılan eküvyonların doğru seçilmesi (rayon veya dakron uçlu, plastik ya da alüminyum saplı eküvyon kullanılması gibi) ve örneğin alındığı viral transport besiyerinin özelliği (serumsuz, nötral pH, protein stabilitesini sağlamak için jelatin veya sığır albümini, bakteri üremesini engellemek için antibiyotik içermesi gibi) önemli noktalara dikkat edilmelidir (Aslan 2006). Bu yüzden hücre kültürü yönteminin duyarlılığının tespit edilip diğer yöntemlerin duyarlılıkları ile karşılaştırılmasında, bu faktörlerin de göz önünde bulundurulması gerekmektedir. Çalışmamızda örnek alımı ticari viral transport vasatı kullanılmış ve transport ile ilgili soğuk zincir şartlarına uyulmuştur. Çalışma yapıldıktan sonra da 31 influenza A ve 10 influenza B shell vial kültür sisteminde üretilmiş ve gösterilmiştir. Bu sebeple üremeyi engelleyen herhangi bir faktör olmadığı düşünülmüştür.

İnfluenza virusların rutin tespitinin yanı sıra antijenik özelliklerinin tayini ve epidemik suşlarda görülen antijenik değişikliklerin ortaya konması için, virusun hücre kültürü veya embriyonlu yumurtadan izolasyonu gerekmektedir. Embriyonlu yumurtadan izolasyon, daha çok referans laboratuvarlarında ve aşı üretimi yapılan merkezlerde uygulanmaktadır. Hücre kültürü için ise yaygın olarak MDCK hücreleri kullanılmakla beraber, RhMK *(Rhesus Monkey Kidney Cells)*, A549, Mv1Lu *(Mink Lung Cells)*, MRC-5 (*Human Lung Embriyonated Cells*), Vero *(Green Monkey Continuous Cells)* ve LLC-MK2 *(Rhesus Kidney Continuous Cells*) gibi farklı hücreler de kullanılmaktadır (Huang ve ark 2000). İnfluenza virus izolasyonu için çalışmamızda kullanılan shell-vial sisteminde bulunan MDCK hücreleri, birçok çalışmada diğer hücre çeşitleri ile birlikte uygulanmış ve birbirlerine olan üstünlükleri değerlendirilmiştir. MDCK hücresinin, Vero ve MRC5 hücreleri ile karşılaştırıldığı bir çalışmada MDCK hücreleri %100 duyarlılıkta saptanırken, Vero hücrelerinin duyarlılığı %71,4, MRC5 hücrelerinin duyarlılığı ise ancak % 57,1 olarak tespit edilmiştir (Reina ve ark 1997).

İnfluenza virusunun hücre kültürüne ekimi sonrası, invert mikroskopta virus üremesinin kontrolü için CPE araştırılması, hemaglütinasyon ve hemadsorbsiyon yöntemleri tek başına veya beraber kullanılmaktadır. İnfluenza virusların birçoğunda CPE belirgin değildir veya hiç oluşmaz. Bu yüzden İnfluenza virus çalışmalarının

çoğunda CPE araştırmasının yanı sıra belirli aralıklarla hemaglütinasyon veya hemadsorbsiyon yöntemleri de uygulanmaktadır. Bu yöntemlerden bir veya ikisi ile virus varlığı saptanan kültürlerde teyid edilmesi ve identifikasyonu için, IFA ve ELISA kullanılmaktadır. IFA ve ELISA deneyleri ile direkt virus tespiti ve identifikasyonu da yapılabilmektedir (Liolios ve ark 2001). Çalışmamızda da shell-vial kültür sonrasında virus varlığının tespiti ve identifikasyonu, IFA yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamızda elde edilen bulgular değerlendirildiğinde, multipleks PCR tekniğinin İnfluenza ve diğer solunum yolu viruslarının tanısında kullanılabileceği kanaatine varılmıştır. Ayrıca antijenik özelliklerinin değerlendirilmesi için kültürde izolasyonu şart olan İnfluenza virusların hücre kültür tekniği ile optimal duyarlılıkta izolasyonu ve tespiti için örneklerin uygun koşullarda alımı, transportu, doğru hücre seçimi, virus titresinin yüksek eldesini sağlayan çeşitli işlemlerin uygulanması, kültür sonrası identifikasyon için duyarlı yöntemin uygulanması gereklidir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Ülkemizde sonbahar–kış mevsiminde çok yaygın olarak görülen ve epidemiler yapan influenza virusu bu çalışma çerçevesinde bölgemizde ilk kez iki yıllık sürede örnek toplanarak ticari hücre kültür sistemi ile üretilerek tanısı konmuştur.

2. Hücre kültür sistemi standart alınarak hızlı antijen testi ve moleküler yöntemle influenza araştırılımış tanı değeri için sensitivite, spesifite, pozitif prediktif değer ve negatif prediktif değer hesaplanmıştır.

3. Hızlı İnfluenza A testi için bu değerler sırasıyla % 77,41, % 93,39, % 80,00, % 93,13 bulunurken İnfluenza B için % 90,00, % 95,83, % 64,28, % 99,10 bulunmuştur.

4. Multipleks PCR yönteminin İnfluenza A için sensitivite, spesifite, pozitif prediktif değer ve negatif prediktif değerleri sırasıyla % 77,41, % 95,95, % 85,71, % 93,13 ve İnfluenza B için % 40,00, % 97,50, % 57,14, % 95,12 bulunmuştur.

5.Buna göre laboratuvar imkanları sınırlı sağlık kuruluşlarında hızlı test ile tanı, daha gelişmiş 2. ve 3. basamak sağlık kuruluşlarında PCR ile influenza tanısı yapılmalıdır.

6. Real time PCR ve/veya ticari veya in house hücre kültürü ile influenza her yıl surveyans için seçilen bazı referans merkezlerde araştırılmalıdır.

7. Bölgesel merkezlerde alınan örneklerle influenza viruslarının değişimi takip edilmelidir. Toplanan örnekler referans laboratuvarda ulusal suş tiplerini belirlemede ve aşı oluşturmak için kullanılma imkanı sağlayabilir.

8. Gerek tanı laboratuvarları, gerekse referans laboratuvarları, İnfluenza virusların tanısı için kendi koşul ve amacına uygun laboratuvar metotlarını seçip, bu metotları belli standartları oluşturarak laboratuvarda kullanmalıdır.

9. İnfluenza tanısının doğru şekilde konulması gereksiz antibiyotik tedavisini engellemesi açısından önemlidir.

6. ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Konya Bölgesinde Grip Hastalığı Etkeni İnfluenza Viruslerinin Farklı Yöntemlerle Araştırılması

Mehmet Özdemir

Viroloji Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA-2011

İnfluenza virusları, özellikle yaşlılarda ve altta yatan bir hastalığı olan kişilerde yüksek morbidite ve mortalite sebebidir ve mevsimsel epidemilere neden olur. Bu viruslar bütün dünyada solunum yolu hastalıklarının önemli bir nedenidir. Bu çalışmada Konya bölgesinde solunum yolları hastalık semptomları olan hastalarda farklı yöntemlerle İnfluenza varlığı araştırılması amaçlanmıştır. Bu sebeple Kasım 2008- Şubat 2010 ayları arasında Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi hastanesinin çeşitli klinik ve polikliklerinden ve çeşitli Sağlık Ocaklarından nazofaringeal ve boğaz örnekleri toplandı. Bu örneklerde hızlı tanı testi, viral kültür (shell-vial) ve multipleks PCR tanı yöntemleri ile İnfluenza A ve B virusları araştırılmıştır. Bu dönemde İnfluenza benzeri semptomları olan 150 hastadan hızlı tanı testi yapılmış ve bunlardan 130 örnek alınarak -70 °C'de virus izolasyonu ve multipleks PCR çalışılıncaya kadar saklanmıştır. Biriktirilen örnekler dekontaminasyon işlemi yapıldıktan sonra, shell-vial kültür yöntemi ve multipleks PCR yöntemi ile eş zamanlı çalışıldı. Shell-vial kültür yöntemi standart test alınarak İnfluenza A ve B için diğer testlerin tanı değerleri hesaplandı. Buna göre hızlı testin sensitivite, spesifite, pozitif prediktif değer ve negatif prediktif değeri İnfluenza A için sırasıyla % 77,41, % 93,39, % 80,00, % 93,13 bulunurken İnfluenza B için % 90,0, % 95,8, % 64,3, % 99,1 bulunmuştur. Multipleks PCR testinin İnfluenza A için sensitivite, spesifite, pozitif prediktif değer ve negatif prediktif değeri sırasıyla % 77,41, % 95,95, % 85,71, % 93,13 ve İnfluenza B için % 40,00, % 97,50, % 57,14, % 95,12 bulundu.

Shell-vial ticari kültür sistemi ile 48 saat gibi kısa bir sürede sonuç alınabilmesi bölgesel tanı laboratuvarlarında rutin tanıda kullanılabilmesi imkanı verebilir. Hızlı tanı testleri diğer testlerin uygulanamadığı durumlarda birinci ve ikinci basamak sağlık kuruluşlarında kullanılabilir. Moleküler testler üçüncü basamak sağlık kuruluşlarında ve referans laboratuvarlarda kullanılabilecek testlerdir.

Anahtar Sözcükler: İnfluenza; Hızlı test; PCR; Tanı; Virus izolasyonu

7. SUMMARY

Investigation of the influenza viruses which cause flu disease by different methods in Konya region

Influenza viruses cause seasonal epidemics associated with high morbidity and mortality, especially affecting those with underlying medical conditions and the elderly. Influenza virus infections are an important cause of respiratory disease worldwide. In this study it is aimed to investigate influenza viruses by different methods in symptomatic patients in Konya region. For this aim, nasopharyngeal and throat swab samples were collected from clinics and outpatient clinics of Meram Medical Faculty Hospital of Selcuk University and different health care centers during in November of 2008 and February of 2010. Rapid antigen test, shell vial cell culture test and PCR tests were studied for İnflueza A and B. In this period rapid antigen test was applied to 150 symptomatic patients and one sample was taken for other tests and kept at -70°C until it was tested for viral isolation and multiplex PCR from 130 patients. After decontamination samples were studied by shell vial culture system and multiplex PCR at the same time. Virus culture test was taken as gold standart and calculated the diagnostic values of other two tests for İnfluenza A and B. In results; sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value of rapid test of influenza A and B were 77,41 %, 93,39 %, 80,00 %, 93,13 % and 90,00 %, 95,83 %, 64,28 %, 99,10 % respectively. Sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value of multiplex PCR test of influenza A and B were 77,41 %, 95,95 %, 85,71 %, 93,13 % and 40,00 %, 97,50 %, 57,14 %, 95,12 % respectively.

Obtaining rapid results within 48 hours made shell vial culture system available for routine usage in regional diagnostic laboratory. Rapid antigen detection tests can be valuable tools for the management of influenza in both first and secondary health centers, especially when other viral studies are unavailable. Molecular diagnostic methods must be performed in tertiary health centers and reference laboratory.

Key Words: Influenza; Diagnosis; PCR; Rapid test; Virus isolation

8. KAYNAKLAR

1.Abdelwhab EM, Erfan AM, Grund C, Ziller M, Arafa AS, Beer M, Aly MM, Hafez HM, Harder TC. Simultaneous detection and differentiation by multiplex real time RT-PCR of highly pathogenic avian influenza subtype H5N1 classic (clade 2.2.1proper) and escape mutant (clade 2.2.1 variant) lineages in Egypt. Virology Journal 2010; 7:260-7.

2.Akarsu DÇ. Yöremizde Üst Solunum Yolları Enfeksiyonlu Hastalara Ait Nazal Sekresyonların İnfluenza ve Avian influenza Yönünden incelenmesi. Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü (Doktora Tezi): 2009:10-29.

3.Aslan SS. İnfluenza Virusunun Tanısında Hücre Kültürü, Hızlı Test, Real Time PCR Yöntemlerinin Karşılaştırılması ve İzole Edilen Virusların Tiplendirilmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü (Doktora Tezi): 2006:7-50.

4.Beck ET, Jurgens LA, Kehl SC, Bose ME, Patitucci T, LaGue E, Darga P, Wilkinson K, Witt LM, Fan J, He J, Kumar S, Henrickson KJ. Development of a rapid automated influenza A, influenza B, and respiratory syncytial virus A/B multiplex real-time RT-PCR assay and its use during the 2009 H1N1 swine-origin influenza virus epidemic in Milwaukee, Wisconsin. J Mol Diagn 2010;12(1):74-81.

5.Bellau-Pujol S, Vabret A, Legrand L, Dina J, Gouarin S, Petitjean-Lecherbonnier J, Pozzetto B, Ginevra C, Freymuth F. Development of three multiplex RT-PCR assays for the detection of 12 respiratory RNA viruses. J Virol Methods 2005;126: 53–63.

6.Boivin G, Hardy I, Kress A. Evaluation of a rapid optical immunoassay for influenza viruses (FLU OIA test) in comparison with cell culture and reverse transcription-PCR. J Clin Microbiol 2001; 39**:** 730-2.

7.Booth S, Baleriola C, Rawlinson WD. Comparison of two rapid influenza A/B test kits with reference methods showing high specificity and sensitivity for influenza A infection. J Med Virol 2006; 78**:** 619-622.

8.Carraro E, Neto DF, Benfica D, SittaPerosa AH, Granato CFH, Bellei NCJ. Applications of a duplex reverse transcription polymerase chain reaction and direct immunofluorescence assay in comparison withvirus isolation for detection of influenza A and B. Diagn Microbiol Infect Dis 2007; 57: 53–57.

9.Carhan A, Altaş AB, Albayrak N, Uyar Y. Influenza surveillance results in 2007-2008 winter season in nine provinces of Turkey. Mikrobiyol Bul 2009 ;43(2):235-41.

10.Cazacu AC, Chung SE, Greer J, Demmler GJ. Comparison of the Directigen Flu A+B membrane enzyme immunoassay with viral culture for rapid detection of Influenza A and B viruses in respiratory specimens. J Clin Microbiol 2004; 42**:** 3707–10.

11.CDC:Interim Recommendations for Clinical Use of Influenza Diagnostic Testing During the 2009-2010 Influenza Season (cited Jan10 2011). Available from URL: http://www.cdc.gov/h1n1flu/diagnostic_testing_clinicians_qa.htm#c.

12.CDC: Role of Laboratory Diagnosis. Centers for Disease Control and Prevention Influenza Flu Homepage. (cited Jan10 2011). Available from URL: http://www.flu.gov/professional/federal/pandemic-influenza.pdf.

13.Chan EL, Brandt K, Horsman GB. Comparison of Chemicon SimulFluor Direct Fluorescent Antibody Staining with Cell Culture and Shell Vial Direct Immunoperoxidase Staining for

Detection of Herpes Simplex Virus and with Cytospin Direct Immunofluorescence Staining for Detection of Varicella-Zoster Virus. Clin Diagn Lab Immunol 2001;8(5):909-12.

14.Chan KH, Maldeis N, Pope W, Yup A, Ozinskas A, Gill J, et al. Evaluation of the Directigen Flu A+B test for rapid diagnosis of infl uenza virus type A and B infections. J Clin Microbiol 2002; 40**:** 1675–80.

15.Chen Y, Xu F, Gui X, Yang K, Wu X, Zheng Q, Ge S, Yuan Q, Yeo AE, Zhang J, Guan Y, Chen H, Xia N. A rapid test for the detection of influenza A virus including pandemic influenza A/H1N1 2009. J Virol Methods 2010 ;167(1):100-2.

16.Choi YJ, Nam HS, Park JS, Kim HJ, Park KB, Jeon MH, Kim CJ, Hwangbo Y, Park KS, Baek KA. Comparative analysis of the multiple test methods for the detection of Pandemic Influenza A/H1N1 2009 virus. J Microbiol Biotechnol 2010; 20(10): 1450–6.

17.Cox NJ, Kawaoka Y. Orthomyxoviruses: Influenza. In: Mahy BWJ, Collier L, editors: Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections. New York: Oxford University Pres: 1998. p. 385–433.

18.Cox NJ, Ziegler T, İnfluenza Viruses. In: Muray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Yolken RH, editors: Manual of Clinical Microbiology. First ed.Washington: ASM Press; 2003. p. 1360-7.

19.Covalciuc KA, Webb KH, Carlson CA. Comparison of four clinical specimen types for detection of influenza A and B viruses by optical immunoassay (FLU OIA test) and cell culture methods. J Clin Microbiol 1999; 37**:** 3971-4.

20.Çicek, Gulen F, Karatas E, Demir E, Tanac R, Bacakoglu F, Bilgic A. Comparison of the "ProDect BCS RV CHIP" assay with the combination of shell vial cell culture and immunofluorescence antibody test for the detection of respiratory viruses. J Virol Methods 2007;143: 161–8.

21. Çelebi Ö. Yöremizde Gribal Enfeksiyonlu Hastaların Üst Solunum Yolu Örneklerinde influenza Virus Araştırılması. Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü (Doktora Tezi): 2008:4-16.

22.Daley P, Castriciano S, Chernesky M, Smieja M. Comparison of flocked and rayon swabs for collection of respiratory epithelial cells from uninfected volunteers and symptomatic patients. J Clin Microbiol 2006;44(6):2265-7.

23. Dong H, Zhang Y, Xiong H, Yan A, Ding G, Chen Y, Xie L, Chen J, Zhang G, Hao P, Cong L, Lu Y, Che X, Wang X, Li Y, Yuen KY, Zhao G, Jin W. Detection of human novel influenza A (H1N1) viruses using multi-fluorescent real-time RT-PCR. Virus Res 2010; 147(1):85-90.

24.Dunn JJ, Gordon C, Kelley C, Carroll KC. Comparison of the Denka-Seiken INFLU A.B-Quick and BD Directigen Flu A+B kits with direct fluorescentantibody staining and shell vial culture methods for rapid detection of influenza viruses. J Clin Microbiol 2003; 41**:** 2180-3.

25.Ellis JS, Zambon MC. Molecular diagnosis of influenza. Rev Med Virol 2002; 12**:** 375-89.

26.Esposito S, Molteni CG, Daleno C, Valzano A, Cesati L, Gualtieri L, Tagliabue C, Bosis S, Principi N. Comparison of nasopharyngeal nylon flocked swabs with universal transport medium and rayonbud swabs with a sponge reservoir of viral transport medium in the diagnosis of paediatric İnfluenza. J Med Microbiol 2010; 59: 96–9.

27.Gharabaghi F, Tellier R, Cheunga R, Collins C, Broukhanski G, Drews SJ, Richardson SE. Comparison of a commercial qualitative real-time RT-PCR kit with direct immunofluorescence assay (DFA) and cell culture for detection of influenza A and B in children. J Clin Virol 2008;42:190–3.

28.Harper SA, Fukuda K, Uyeki TM, Cox NJ, Bridges CB; Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), Centers for Disease Control and Prevention (CDC).Prevention and control of influenza. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). MMWR Recomm Rep 2005;54:1-40.

29.Hendly JO. The common cold. In: Goldman L, Bennet JE, editors. Cecil Textbook of Medicine, 21st edition, Philadelphia, WB Saunders Co, 2000: 1790-3.

30.Hossain MJ, Perez S, Guo Z, Chen LM, Donis RO. Establishment and characterization of a Madin-Darby canine kidney reporter cell line for influenza A virus assays. J Clin Microbiol 2010;48(7):2515-23.

31.Hurt AC, Alexander R,Hibbert J,Deed N,Barr IG. Performance of six influenza rapid tests in detecting human influenza in clinical specimens. J Clin Virol 2007;39: 132–5.

32.Hymas WC, Mills A, Ferguson S, Langer J, She RC, Mahoney W, Hillyard DR. Development of a multiplex real-time RT-PCR assay for detection of influenza A, influenza B, RSV and typing of the 2009-H1N1 influenza virus. J Virol Methods. 2010;167(2):113-8.

33.Hwang Y, Kim K, Lee M. Evaluation of the Efficacies of Rapid Antigen Test, Multiplex PCR, and Real-time PCR for the Detection of a Novel Influenza A (H1N1) Virus. Korean J Lab Med 2010;30:147-52.

34.Kesson AM. Mini-symposium: microbiological diagnostic procedures in respiratory infection respiratory virus infections. Paediatr Respir Rev 2007; 8: 240–8.

35.Kim SR, Ki CS, Lee NY. Rapid detection and identification of 12 respiratory viruses using a dual priming oligonucleotide system-based multiplex PCR assay. J Virol Methods 2009;156: 111–6.

36. Koenig M, Kosha S, Hickman M, Heath D, Riddell S, Aldous W. Detection of influenza virus from throat and pharyngeal swabs with a nested duplex light cycler RT-PCR. Diagn Microbiol Infect Dis 2003; 46**:** 35-37.

37.Köksal F. Ortomiksovirusler. In: Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA, editors. Tıbbi Mikrobiyoloji . 6. Baskı, Ankara: Atlas Kitapçılık; 2010. p.583-9.

38.Kuypers J, Wright N, Ferrenberg J, Huang ML, Cent A, Corey L, Morrow R. Comparison of Real-Time PCR Assays with Fluorescent-Antibody Assays for Diagnosis of Respiratory Virus Infections in Children. J Clin Microbiol 2006; 44(7): 2382–8.

39.Landry ML, Ferguson D. Suboptimal Detection of Influenza Virus in Adults by the Directigen Flu A-B Enzyme Immunoassay and Correlation of Results with the Number of Antigen-Positive Cells Detected by Cytospin Immunofluorescence. J Clin Microbiol 2003;41(7): 3407-9.

40.Lasala PR, Bufton KK, Ismail N, Smith NB. Prospective comparison of R-mixTM shell vial system with direct antigen tests and conventional cell culture for respiratory virus detection. J Clin Virol 2007;38:210–6.

41.Leblebicioglu H. Pediatric Influenza: Differential Diagnoses & Workup. (cited Feb 10 2011). Available from URL: http://emedicine.medscape.com/article/972269-diagnosis.

42.Liao RS, Tomalty LL, Majury A, Zoutman DE. Comparison of Viral Isolation and Multiplex Real-Time ReverseTranscription-PCR for Confirmation of Respiratory Syncytial Virus and Influenza Virus Detection by Antigen Immunoassays. J Clin Microbiol 2009; 47(3): 527–32.

43.Liolios L, Jenney A, Spelman D, Kotsimbos T, Catton M, Wesselingh S. Comparison of a multiplex reverse transcription-PCR-enzyme hybridization assay with conventional viral culture and immunofluorescence techniques for the detection of seven viral respiratory pathogens. J Clin Microbiol 2001; 39**:** 2779-83.

44.Mehlmann M, Bonner AB, Williams JW, Dankbar M, Moore CL, Kuchta RD, Podsiad AB,Tamerius JD, Dawson ED, Rowlen KL. Comparison of the MChip to Viral Culture, Reverse Transcription-PCR,and the QuickVue Influenza A-B Test for Rapid Diagnosis of Influenza. J Clin Microbiol 2007; 45(4): 1234-7.

45.Ogilvie M. Molecular techniques should not now replace cell culture in diagnostic virology laboratories. Rev in Med Virology 2001; 6**:** 351-4.

46.Pregliasco F, Mensi C, Camorali L, Anselmi G. Comparison of RT-PCR with Other Diagnostic Assays for Rapid Detection of Influenza Viruses. J Med Virol 1998; 56:168–73.

47.Principi N, Esposito S. Antigen-Based Assays for the Identification of Influenza Virus and Respiratory Syncytial Virus: Why and How to UseThem in Pediatric Practice. Clin Lab Med 2009;29:649–60.

48.Rahman M, Vandermause MF, Kieke BA, Belongia EA. Performance of Binax NOW Flu A and B and direct fluorescent assay in comparison with a composite of viral culture or reverse transcription polymerase chain reaction for detection of influenza infection during the 2006 to 2007 season. Diagn Microbiol Infect Dis 2008;62: 162–6.

49.Reina J, Fernandez-Baca V, Blanco I, Munar M. Comparison of Madin-Darby canine kidney cells (MDCK) with a green monkey continuous cell line (Vero) and human lung embryonated cells (MRC-5) in the isolation of influenza A virus from nasopharyngeal aspirates by shell vial culture. J Clin Microbiol 1997; 35: 1900-1.

50.Roh KH, Kim J, Nam MH, Yoon S, Lee CK, Lee K, Yoo Y, Kim MJ, Cho Y. Comparison of the Seeplex Reverse Transcription PCR Assay with the R-mix Viral Culture and Immunofluorescence Techniques for Detection of Eight Respiratory Viruses. Annals of Clinical & Laboratory Science 2008;38(1):41-6.

51.Schweiger B, Zadow I, Heckler R, Timm H, Pauli G. Application of a fluorogenic PCR assay for typing and subtyping of influenza viruses in respiratory samples. J Clin Microbiol 2000; 38**:** 1552-8.

52.She RC, Taggart EW, Petti CA. Comparison of 10 Indirect Fluorescent Antibodies to Detect and Type Influenza A Specimens. Arch Pathol Lab Med. 2010;134:1177–80.

53.Smith M, Beynon KA, Murdoch DR, Jennings LC. Comparison of the NOW Influenza A&B, NOW Flu A, NOW Flu B,and Directigen Flu A+B assays, and immunofluorescence with viral culture for the detection of influenza A and B viruses. Diagn Microbiol Infect Dis 2007;57: 67–70.

54. Stockton J, Ellis JS, Saville M, Clewley JP, Zambon MC. Multiplex PCR fortyping and subtyping influenza and respiratory syncytial viruses. J Clin Microbiol 1998; 36: 2990-2995.

55.Stone B, Burrows J, Schepetiuk S, Higgins G, Hampson A, Shaw R, Kok T. Rapid detection and simultaneous subtype differentiation of influenza A viruses by real time PCR. J Virol Methods 2004; 117**:** 103-12.

56.Scuffham PA, West PA. Economic evaluation of strategies for the control and management of influenza in Europe. *Vaccine* 2002; 20: 2562-2578.

57.Thomas Y, Kaiser L, Wunderli W; EISS Task Group on Near Patient Test.The use of near patient tests in influenza surveillance: Swiss experience and EISS recommendations. Euro Surveill 2003;8(12):240-6.

58.Yarkın F, Alhan E, Kibar F, Karabay A, Köksal F. Pediatrik populasyonunda viral alt solunum yolu enfeksiyonlarının insidansı. 25.Türk Mikrobiyoloji Kongresi Kitabı: p 225, 21-25 Ekim 1994, Antalya.

59.Yang G, Erdman DE, Kodani M, Kools J, Bowen MD, Fields BS. Comparison of commercial systems for extraction of nucleic acids from DNA/RNA respiratory pathogens. J Virol Methods 2011;171:195–9.

60.Yang M, Berhane Y, Salo T, Li M, Hole K, Clavijo A. Development and application of monoclonal antibodies against avian influenza virus nucleoprotein. J Virol Methods 2008;147: 265–74.

61.Yoo SJ, Kuak EY, Shin BM. Detection of 12 Respiratory Viruses with Two-set Multiplex Reverse Transcriptase-PCR Assay Using a Dual Priming Oligonucleotide System. Korean J Lab Med 2007;27:420-7.

62.Webby RJ, Webster RG. Emergence of influenza A viruses. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 2001; 356:1817-28.

63.Wei HL, Bai GR, Mweene AS, Zhou YC, Cong YL, Pu J, Wang S, Kida H, Liu JH. Rapid detection of avian influenza virus A and subtype H5N1by single step multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction. Virus Genes 2006 32:261–7.

64.Weinberg A, Mettenbrink CJ, Ye D, Yang CF. Sensitivity of diagnostic tests for influenza varies with the circulating strains. J Clin Virol 2005;33:172–5.

65.WHO recommendations on the use of rapid testing for influenza diagnosis on July 2005. (cited Jan10 2011). Available from URL: http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/RapidTestInfluenza_web.pdf

66.Widjaja L, Krauss SL, Webby RJ, Xie T, Webster RG. Matrix gene of influenza a viruses isolated from wild aquatic birds: ecology and emergence of influenza a viruses. J Virol 2004; 78**:** 8771-9.

67.Wright PF, Webster RG. Orthomyxoviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE, editors: Fields Virology, 3th ed. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins; 2001. p. 1533-79.

68.Wu C, Cheng X, Heb J, Lv X, Wang J,Deng R, Long Q, Wang X. A multiplex real-time RT-PCR for detection and identification of influenza virus types A and B and subtypes H5 and N1. Journal of Virological Methods 2008; 148: 81–88.

69.Wu W, Kang X, Bai Z, Liu L, Li J, Wu X, Sun H, Hu T, Yang M, Wang P, Liu L, Yang Y, Di B, Chen W. Detection of pandemic influenza A/H1N1/2009 virus by real-time reverse transcription polymerase chain reaction. J Virol Methods 2010;165(2):294-6.

70. Zambon M. Laboratory Diagnosis of Influenza. In: Nicholson KG, Webster RG, Hay AJ, editors. Textbook of Influenza. Oxford: Blackwell;1998. p. 291-313

10. ÖZGEÇMİŞ

Araştırmacı tez sahibi, 1967 yılında Aydın ilinin Çine ilçesinde doğdu. İlkokul, ortaokul ve liseyi bu ilçede tamamladı. Tıp eğitimini Selçuk Üniversitesi Tıp fakültesinde tamamlayarak 30.06.1993 tarihinde mezun oldu. 1 Ekim 1993'de Zonguldak Ereğli Devlet Hastanesinde acil hekimi olarak göreve başladı. Daha sonra Ankara Hasköy Sağlık Ocağına atandı. 1994 yılının Temmuz-Aralık ayları arasında Ankara Valiliğinde çalıştı. Sağlık Bakanlığı ve UNICEF işbirliği ile düzenlenen "Anne Sütü ile Beslenmede Danışmanlık ve Bebek Dostu Hastaneler" projesinde Ulusal değerlendirme ekibi üyesi olarak çeşitli illerde kısa süreli çalıştı. Başbakanlık Devlet Personel Başkanlığına daire tabibi olarak atandı ve 2000 yılı Nisan dönemi Tıpta Uzmanlık Sınavında Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim dalında uzmanlık eğitimini kazandı. 5 Ekim 2000 tarihinde araştırma görevlisi kadrosunda göreve başladı. 06.07.2004 tarihinde "Dispeptik hastalarda Helicobacter pylori infeksiyou tanısında Helicobacter pylori gaita antijeninin tanı değerinin diğer yöntemlerle karşılaştırarak incelenmesi" konulu uzmanlık tezini vererek Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji uzmanı oldu. 14 Şubat 2005 tarihinde Sağlık Bilimleri Enstitisünde Viroloji doktorasına başladı. 15.09.2004-20 Mart 2006 tarihleri arasında Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji anabilim dalında uzman ve bu tarihten sonra öğretim üyesi olarak çalışmaktadır. Meram Tıp Fakültesi Hastanesinde, Hastane enfeksiyon Komitesi üyeliği ve Kan Alma Sorumuluğu, Mikrobiyoloji Merkez Laboratuvarında Moleküler Mikrobiyoloji ve İmmun Floresan birim sorumluğu, Meram Tıp Fakültesinde Yönetim Kurulu üyeliği ve Klinik Araştırmalar Etik Kurulu üyeliği yapmaktadır. Evli ve 3 çocuk babasıdır.