

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SOLUNUMSAL PATOJEN VİRUSLAR VE İNFLUENZA A
H1N1(DOMUZ GRİBİ)'NİN MULTİPLEX PZR YÖNTEMLERİ
İLE TANISI**

Bio. Kübra ÇALIŞKAN ERYEĞEN

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Doç. Dr. Mustafa ALTINDIŞ

**Bu Tez Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu
Tarafından 10.TIP.04 Proje Numarası İle Desteklenmiştir.**

Tez No: 2011 - 015


2011 – Afyonkarahisar

KABUL ve ONAY

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıbbi Mikrobiyoloji Programı
çerçevesinde yürütülmüş bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi
olarak kabul edilmiştir.
Tez Savunma Tarihi: 30.05.2011


Doç. Dr. Mustafa ALTINDIŞ
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Jüri Başkanı


Doç. Dr. Hasan Hüseyin ÇİFTÇİ
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Üye


Prof. Dr. Rıza DURMAZ
Kırıkkale Üniversitesi
Üye

Mikrobiyoloji ve Klinik mikrobiyoloji anabilim dalı Dahı Yüksek Lisans Programı
öğrencisi Kübra ÇALIŞKAN ERYEGEN'nin Solunumsal patojen viruslar ve
influenza a H1N1(Domuz Gribi)'nin multiplex PZR yöntemleri ile tanısı başlıklı tezi
10.05.11 günü saat 14:00'da Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin
ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.



Prof. Dr. İsmail BAYRAM
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez konusunun seçimi, planlanması ve yürütülmesi aşamasında engin bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Mustafa ALTINDIŞ'e, yetişmemde emeği geçen diğer bölüm hocalarım Doç. Dr. İhsan Hakkı ÇİFTÇİ, Doç. Dr. Orhan Cem AKTEPE, Doç. Dr. Zafer ÇETİNKAYA ve Yrd. Doç. Dr. Özlem MİMAN'a

Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı Yüksek Lisans öğrencileri Bio. Teyde ÇALIŞKAN, Bio. Davut ÇUFALI, Bio. Hatice DECDELİ ve Bio. Ebru KIRAÇ, Doktora öğrencisi Emine DURHAN, mikrobiyoloji biriminde çalışan tüm biyolog ve laborant arkadaşlara;

Hayatım boyunca desteklerini hep yanımda hissettiğim sevgili anneme, babama ve kardeşime, benden anlayış ve sevgisini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili eşim Hakan ERYEĞEN'e, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca; tez çalışmamı 10.TIP.04 no'lu proje ile destekleyen Afyon Kocatepe Üniversitesi Rektörlüğü'ne teşekkür ederim.

Bio. Kübra Ç. ERYEĞEN

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
TABLolar DİZİNİ	vi
GRAFİK DİZİNİ	vi

1. GİRİŞ	1
1.1. İnfluenza viruslar	2
1.1.1. Morfoloji ve genel özellikler:	2
1.1.2. İnfluenza viruslerinin replikasyonu.....	5
1.1.3. İnfluenza virus tipleri ve isimlendirme	7
1.1.4. İnfluenza viruslerinde antijenik değişim	8
1.1.4.1. Antijenik sürüklenme (drift).....	9
1.1.4.2. Antijenik kayma (shift)	10
1.1.5. Epidemiyoloji.....	11
1.1.5.1. Epidemik İnfluenza	12
1.1.6. Klinik belirti ve bulgular	15
1.1.6. İnfluenza Viruslarında Tanı	15
1.1.6.2. Embriyonlu Yumurtada Virus İzolasyonu	16
1.1.6.3. Hücre kültüründe Virus İzolasyonu	17
1.1.6.4. Serolojik tanı	17
1.1.6.5. Moleküler yöntemler	17
1.2. Parainfluenza viruslar	18
1.2.1. Morfoloji ve genel özellikler.....	18
1.2.2. Epidemiyoloji.....	19
1.2.3. Hastalıklar ve Klinik Bulgular	20
1.2.4. Patogenez	20
1.2.5. Tanı	20
1.2.5.1. Direkt inceleme	21
1.2.5.2. Serolojik Yöntemler	21
1.2.5.3. Virus İzolasyonu	21
1.2.6. Tedavi ve Korunma.....	21
1.3.1. Morfoloji ve genel özellikler.....	22
1.3.2. Sınıflandırma	22
1.3.3. Antijenik yapı	24
1.3.4. Laboratuvar tanısı	24
1.3.4.1. Antijen tayini.....	25
1.3.4.2. Virus izolasyonu	25
1.3.4.3. Serolojik tanı	26
1.3.4.4. Moleküler yöntemler	26
1.4. Respiratuar sinsityal virus (RSV)	28
1.4.1. Morfoloji ve genel özellikler.....	28
1.4.2. Antijenik yapı	29
1.4.3. Epidemiyoloji.....	29
1.4.4.2. Hücre Kültürü.....	30

1.4.4.3. Moleküler yöntemler	30
1.4.5. Patogenez	31
1.4.6. Direnç	33
1.4.7. Tedavi	34
1.4.8. Korunma	35
1.5. Rinoviruslar	37
1.5.1 Morfoloji ve Genel Özellikleri	37
1.5.2. Antijenik Yapısı	38
1.5.3. Yaptığı Hastalıklar ve Klinik Bulgular	38
1.5.4. Patogenez ve İmmünite	38
1.5.5. Laboratuvar Tanısı	39
1.5.5.1. Örnek alınması ve muhafazası	39
1.5.5.2. Virus İzolasyonu	39
1.5.5.3. Viral Antijenin Gösterilmesi	39
1.5.5.4. Serolojik Tanı	40
1.5.6. Epidemiyoloji	40
1.6. Metapneumovirus	41
1.6.1. Morfoloji ve Genel Özellikleri	41
1.6.2. Yaptığı Hastalıklar ve Klinik Bulgular	42
1.6.3. Epidemiyoloji	43
1.6.4. Laboratuvar tanısı	44
1.6.5. Tedavi	44
1.7. Koronavirüsler	44
1.7.2. Sınıflandırma	45
1.7.2.1. SARS-koronavirüs	45
1.7.2.2. Koronavirüs NL63	47
1.7.2.3. Koronavirüs HKU1	47
1.7.3. Replikasyon	47
1.7.4. Patogenez	48
2.GEREÇ VE YÖNTEM.....	49
2.2. Örneklerin toplanması	49
2.3. Ekstraksiyon Aşaması	50
2.3.1. cDNA eldesi	51
2.3.2. PZR Aşaması	51
2.3.3. Jel hazırlanması	52
2.3.4. Elektroforez aşaması	52
3. BULGULAR.....	53
4.TARTIŞMA	57
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	62
ÖZET	63
SUMMARY	64
KAYNAKLAR.....	65
EK 1	76

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

aa	Aminoasit
cRNA	Complete RNA
DID	Double Immundifuzyon
DNA	Deoksiribonükleik asit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EIA	Enzyme Immun Assay
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
HA	Hemaglutinin
HEF	Hemaglutinin Esteraz Füzyon Proteini
hMPV	Human metapneumo virus
HN	Hemaglütinin-Nöraminidaz
IFA	Immun Florasan Antikor
KB	Kompleman birleşmesi
KOAH	Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı
L	Büyük protein
M	Matriks proteini
mRNA	mesajcı RNA
NA	Nöraminidaz
NEP	Nüklear Eksport Protein
nm	nanometre
NP	Nükleoprotein
NS	Yapısal olmayan protein
P	Polimeraz fosfoprotein
PA	Polimeraz Asidik
PB	Polimeraz Bazik
PIV	Parainfluenza virus
PRMK	Primer Rhesus Maymun Böbrek Hücre Kültürü
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RIA	Radyoimmunassay
RNA	Ribonükleikasit
RNP	Ribonükleoprotein
RSV	Respiratuvar sinsitiyal virüs
RT	revers transkripsiyon
S-OIV	Swine-Origin Influenza Virus
SRD	Single Radial Diffussion
ÜSYE	Üst Solunum Yolu Enfeksiyonu
vRNA	Viral RNA
WHO	World Health Organization
IBH	Influenza Benzeri Hastalık

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 İnfluenza virusunu yapısı.....	3
Şekil 1.2. İnfluenza viruslerinin replikasyonu.....	6
Şekil 1.3. İnfluenza viruslarının isimlendirilmesi.....	8
Şekil 1.4. Parainfluenza virusunun yapısal şekli.....	19
Şekil 1.5. Metapneumovirus'un şematik görünümü.....	42
Şekil 1.6. Sars-Corona virusun yapısı.....	46

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1.1. İnfluenza tip A viruslerinin gen segmentleri ve kodladıkları proteinler...	4
Tablo 1.2. İnfluenza viruslarının karşılaştırılması.....	7
Tablo 1.3. Adenoviridae ailesinin sınıflandırılması.....	23
Tablo 2.1. Thermal cyler sıcaklık siklusu.....	52
Tablo 3.1. Virusların cinsiyete göre dağılımı.....	55
Tablo 3.2. Hastaların başvuru şikayetlerine göre dağılımı.....	57

GRAFİK DİZİNİ

Grafik 2.1. Cinsiyet dağılımı (%).....	50
Grafik 3.1. Yaş ve cinsiyet dağılımı.....	54
Grafik 3.2. Solunumsal örneklerden multiplex PZR yöntemiyle saptanan viruslar...	55
Grafik 3.3. Saptanan virusların aylık dağılımı.....	56

1. GİRİŞ

Solunum yolu enfeksiyonları tüm enfeksiyonlar arasında en sık görülen hastalıklar arasında yer alır. Araştırmalar solunum yolu enfeksiyonlarının iş gücü kaybı ve tedavi maliyeti ile ekonomiyi etkileyen hastalıklar arasında ilk sıralarda olduğunu göstermektedir (Aymard ve ark., 1999).

Çok sayıda ajanın (virus, bakteri ve mantar) saldırısına mağruz kalan solunum sistemimizde enfeksiyonların yaklaşık üçte ikisinden viruslar sorumludur. Günümüzde solunum yolları enfeksiyonlarına sebep olan 200'den fazla virus tanımlanmış olup, bu etkenlerin ayrıca hastane enfeksiyonlarına yol açabildikleri gibi immün yetmezlikli hastalar ile küçük çocuklarda morbidite ve mortaliteye sebep olmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO-World Health Organization) verilerine göre her yıl beş yaş altı çocuklarda akut solunum yolu enfeksiyonuna bağlı dört milyon ölüm görülmektedir. Bu enfeksiyonlara sebep olan viral ajanlardan Influenza (A ve B) virusları, Parainfluenza (1-3), Respiratory Syncytial Virus ve Adenoviruslar; çocuklar ve erişkinlerde ağır seyreden hastalıkların büyük çoğunluğundan sorumlu tutulmakta ve özellikle; paranazal sinüs, burun, kulak, farinks ve nazofarinks bölgesini kapsayan üst solunum yolu enfeksiyonları (ÜSYE)'na neden olmaktadır. (Aymard ve ark., 1999; Raphael ve ark., 1991).

Etkenler arasında yer alan Influenza virusu'nun neden olduğu enfeksiyon grip olarak isimlendirilmektedir. Toplumda hızla yayılması ve ölümcül pandemilere yol açması nedeniyle de bir önem kazanmaktadır. 1930'lu yıllara kadar etiyojisi bilinmeyen grip tablosundan Influenza virusu'nun sorumlu olduğu ilk olarak Smith ve arkadaşlarının etkeni izole etmesi ile mümkün olmuştur. (Smith ve ark. 1936) Daha sonraki dönemlerde Influenza virusu'nun A, B, C olmak üzere 3 antijenik tipi saptanmış ve serolojik yöntemlerin, hücre kültür yöntemlerinin uygulamaya girmesi

ile Influenza viruslarının araştırılması hız kazanmıştır. (Gwaltney, 2000; Graham et al. 1990)

Çalışmaya infant ve çocuklar; erişkinlerden de özellikle altta yatan hastalığı olan immunosupresifler, Kronik Obstruktif Akciğer Hastalığı(KOAH) olanlar, astımlılar ve pnömoni düşünülen bireyler dahil edilmiştir. Solunumsal viral patojenlere kısa sürede, erken tanı koymak amacıyla (respiratory syncytial virus-RSV, influenza A ve B virus, parainfluenza virusI-III, human metapnomovirus) nazofaringeal örneklerle multiplex PZR yöntemi uygulanmıştır.

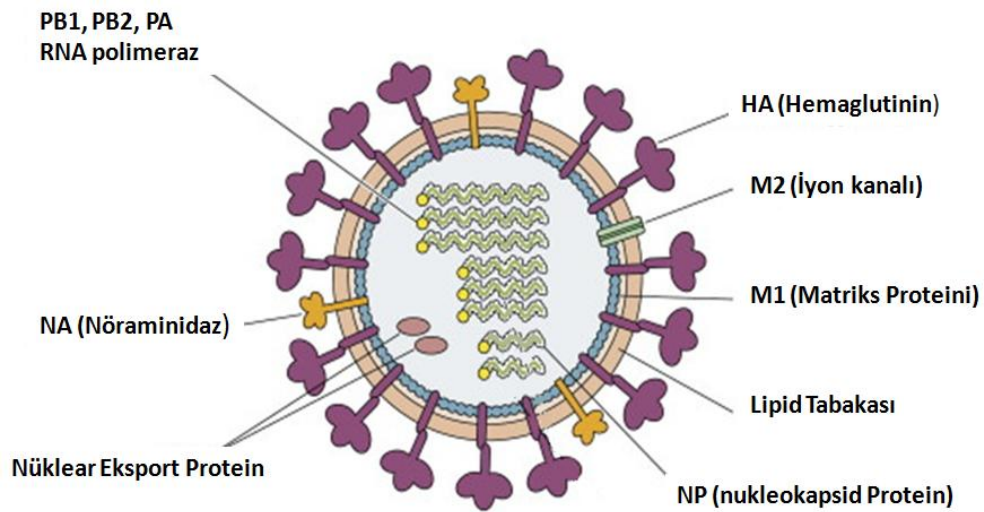
1.1. İnfluenza viruslar

Influenza (grip) akut, bulaşıcı ve karakteristik olarak epidemiler ile görülen ateş, öksürük, baş ağrısı, halsizlik ve kas ağrıları ile seyreden viral hastalık olup, tüm yaş gruplarını etkiler. Bu hastalıkta epidemiler, genellikle 1-3 yıl arayla görülürken, pandemiler seyrek görülür. Pandemi ve epidemi oluşturması, pulmoner komplikasyonlar sonucunda ölüme yol açması ile diğer solunum yolu viruslarından ayrılır. Hirsch, 1173-1875 tarihleri arasında 299 influenza epidemisi gördüğünü bildirmiştir. İlk pandemi 1580 yılında Avrupa, Asya ve Doğu Afrika'da görülmüştür. En büyük pandemi 1918-1919 yılları arasında görülmüş İspanyol gribi diye adlandırılan (influenza A/ H1N1) salgın milyonlarca insanın ölümüne sebep olmuştur (Patterson, 1986). Yine 21. Yüzyılın ilk pandemisi olarak, 2009 yılı şubat-mart aylarında Meksika'da ortaya çıkan, nisan ayında Amerika Birleşik Devletleri'nde tanımlanan ve hızla dünyaya hızla yayılan 'domuz kaynaklı influenza A (H1N1)' virusu tarafından gerçekleştirilmiştir (Taubenberger ve ark., 2009).

1.1.1. Morfoloji ve genel özellikler:

Orthomyxoviridae ailesinden, zarflı, negatif polariteli, tek sarmallı, 80-120 nanometre çapında RNA virusudur. Nükleokapsid ve matrix proteinlerine göre

Influenza A, B, C olmak üzere üç antijenik tipi vardır. Yapısında hemaglütinin (HA) ve nöraminidaz (NA) olarak adlandırılan zarf glikoproteinleri bulunur. HA virusun hücreye bağlanmasında, NA ise; mûsin tabakayı uzaklaştırarak bu bağlanmayı kolaylaştırmada rol alır. Influenza A virusları HA ve NA glikoproteinlerine göre alt tiplere ayrılırlar. İnsanda üç tip HA (HA-1, 2, 3) ve iki tip NA (NA-1, 2) saptanmıştır. Influenza B ve C'nin HA ve NA alt tipleri yoktur (Badur, 2007; Tumpey, 2005; WHO, 2005).



Şekil 1.1 Influenza virusunu yapısı (www.virology.ws/influenza-virion.jpg'den alınmıştır)

Negatif polariteli tek iplikli sekiz parçadan (influenza tip C'de yedi parça) oluşan RNA, dokuz yapısal [polimeraz bazik (PB)2, PB1, polimeraz asidik (PA), nükleoprotein (NP), matriks proteini (M)1, M2, hemaglütinin (HA), nöraminidaz (NA), nüklear eksport protein (NEP)] ve bir yapısal olmayan protein (NS1) kodlar (Brooks ve ark., 2007).

Virion içindeki her bir negatif tek iplikli RNA parçası, NP ve üç alt üiteden (PB2, PB1, PA) oluşan RNA polimeraz ile ilişkidir. Bu yapı virusun ribonükleoprotein (RNP) yapısını oluşturur (Şekil 1.1). PB1, PB2, PA ve NEP (NS2) proteinleri RNA transkripsiyonu ve replikasyondan sorumludur. Viral zarfın altında yer alan M1, virionun yaklaşık %40'ını oluşturur ve viral partikülün morfogenezinde rol alır. Virusun iyon kanalı proteini olan M2, endozom

membranyla füzyonu ve viral nükleik asitlerin sitoplazmaya geçişini sağlamaktadır (Brooks ve ark., 2007). Zarf üzerinde yer alan iki önemli glikoproteinden birisi olan HA, konak hücre yüzeyindeki sialik asit reseptörlerine bağlanmadan, diğeri olan NA ise olgunlaşma sırasında sialik asidi parçalayarak virusun infekte hücre yüzeyinden serbestleşmesinden sorumludur. HA, NA ve M2 transmembran proteinleridir ve zarfın lipid kısmına gömülü olarak bulunur. HA ve NA glikoproteinleri, gerek influenza viruslerinin genetik çeşitliliğini gerekse konak immün yanıtını belirleyen antijenlerdir (Brooks ve ark., 2007; <http://pathmicro.med.sc.edu/>).

Tablo 1.1. İnfluenza tip A viruslerinin gen segmentleri ve kodladıkları proteinler

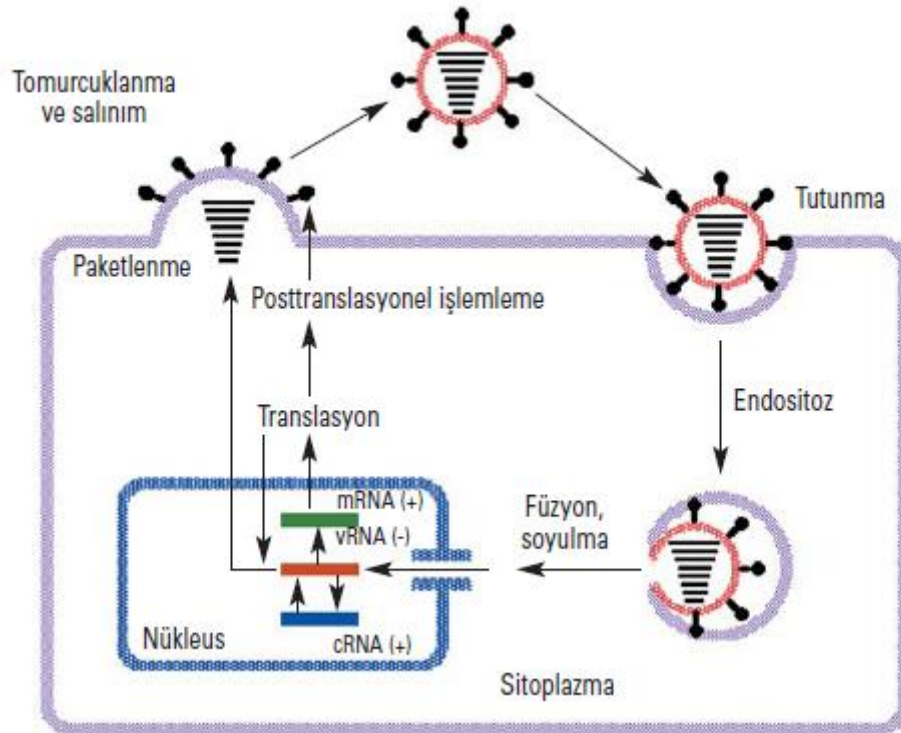
RNA Segmenti	Boyut (nükleotid)	Protein		Fonksiyon
		Simge	Açık adı	
1	2341	PB2	Polimeraz bazik 2	RNA transkriptaz; "cap" bağlanma
2	2341	PB1	Polimeraz bazik 1	RNA transkriptaz; elongasyon
3	2233	PA	Polimeraz asidik	RNA transkriptaz; proteaz aktivitesi
4	1778	HA	Hemaglutinin	Sialik aside tutunma; viral zarf-endozom membranı füzyonu
5	1565	NP	Nükleoprotein	Genomun yapısal komponenti, viral RNA'nın nüklear/sitoplazmik transportu
6	1413	NA	Nöraminidaz	Sialik asidin parçalanması, virusun hücreden salınımı
7	1027	M1	Matriks proteini	Virionun major komponenti; viral morfogenez
		M2		İyon kanalı proteini; virusun soyulması; paketlenme
8	890	NS1	Yapısal olmayan Protein	RNA transportu, "splicing", translasyon; interferon sentezinin baskılanması
		NEP (NS2)	Nüklear eksport protein	Progeni nükleokapsidlerin sitoplazmaya taşınması

1.1.2. Influenza viruslerinin replikasyonu

Influenza viruslerinin replikasyonu, RNA virusü olmalarına karşın hücre çekirdeğinde meydana gelmektedir. Tutunma, viral HA'nın konak hücre yüzeyindeki sialik aside (N-acetyl neuraminic acid) bağlanmasıyla olur ve virus, reseptöre bağlı endositozla hücre içine alınır. Endozom içindeki asidik ortamda (pH 5) HA monomerleri tripsin benzeri enzimler yardımıyla HA1 ve HA2 polipeptidlerine parçalanır. Bu kesim HA'nın konformasyonel değişikliğe uğramasına yol açar ve HA2'nin füzyon fonksiyonunu aktive eder. Böylece viral zarf ile endozom membranının kaynaşması ve nükleokapsidin sitozole geçişi gerçekleşmiş olur (Şekil 1.2). Bunun yanında asidik pH ile aktive olan M2 proteininin de, virion içine proton girişini sağlayarak M1'in parçalanmasında ve soyulma olayında rol alır (Brooks ve ark., 2007).

Viral RNP'lerin hücre çekirdeğine taşınması, sahip oldukları özel nüklear translokasyon dizileri ile gerçekleşir. Nükleusa giren gen segmentlerinin transkripsiyonu, RNA polimeraz kompleksi (PB2, PB1, PA) tarafından yapılır (Brooks ve ark., 2007; <http://pathmicro.med.sc.edu/>). Ancak ilk olarak bu kompleksin, hücresel RNA polimeraz II enzimi tarafından metillenerek aktive edilmesi ve konak hücre mRNA'sının 5' ucundaki "cap" bölgesini primer olarak kullanması gereklidir. Bu nedenle influenza virusleri, viral mRNA transkripsiyonu yapabilmek için çekirdeğe gereksinim duyarlar. Negatif iplikli viral RNA'lardan iki tip pozitif polariteli RNA transkripsiyonu yapılabilen, bunlardan poliadenillenmiş transkriptler, mRNA olarak işlev görürken, poliadenillenmemiş cRNA'lar (complete RNA) progeni viral RNA (vRNA) için kalıp görevi görürler. Sitoplazmaya taşınan mRNA'lardan erken proteinlerin translasyonu gerçekleşir ve sentezlenen yüzey proteinleri (HA, NA, M2) golgiye girerek glikozillenir ve hücre membranına taşınır. Diğer taraftan PA, PB1, PB2 ve NP proteinleri çekirdeğe geri dönerek cRNA'lardan vRNA ipliklerinin transkripsiyonunu gerçekleştirir. Yeni sentezlenen negatif ipliklerin çoğu vRNA'yı oluştururken, bazıları da tekrar mRNA sentezine katılır (Şekil 1.2). Çekirdeğe geri dönen M1 proteini yeni sentezlenen negatif ipliklere bağlanarak viral mRNA sentezini durdurur, NS2 proteini (NEP) progeni (yeni

sentezlenen) nükleokapsidlerin çekirdekten sitoplazmaya taşınmasında rol alır (Brooks ve ark., 2007). Sitoplazmaya geçen nükleokapsidler hücre yüzeyine doğru taşınır ve daha önceden hücre membranına entegre edilmiş olan HA ve NA ile birlikte paketlenerek tomurcuklanmayla hücreden çıkar (Osterholm, 2005).



Şekil 1.2. İnfluenza viruslerinin replikasyonu
(<http://www.microbiologybytes.com/virology/Orthomyxoviruses.html>'den uyarlanmıştır.)

Bu safhada NA, hücre membranındaki sialik asit ünitelerini parçalayarak HA'nın sialik aside yapışıp kalmasını önler ve virusun salınmasını kolaylaştırır. Virusun hücreden serbestleşmesinden sonra da NA'nın fonksiyonu devam etmekte ve solunum yolu mukozasında bulunan sialik asit moleküllerinin parçalanmasına yol açarak virusun epiteli kaplayan mukopolisakkaridlerin içinden geçişini sağlamaktadır (Brooks ve ark., 2007).

Virus hücrelerde lizise yol açmamakla beraber, normal hücresel makromolekül sentezinin bozulması sonucu hücre ölümüne neden olmaktadır. Paketlenme işlemi sırasında, virion içine girecek olan sekiz adet RNA segmentinin doğru olarak

seçilmesinde, viral RNA'nın kodlama yapmayan 3' ve 5' bölgelerindeki "cis-acting" sinyallerinin rol oynadığı, ancak yine de paketlemenin rastgele olduğu düşünülmektedir (<http://pathmicro.med.sc.edu/>). Buna göre; virion içine ortalama 11-12 segment yerleşmekte, ancak sadece doğru sekiz parçanın olduğu virionlar enfeksiyöz olmaktadır ki bu da oluşan viral partiküllerin sadece %10'unun enfeksiyöz olduğunu göstermektedir (Dürdal Us, 2010).

1.1.3. İnfluenza virus tipleri ve isimlendirme

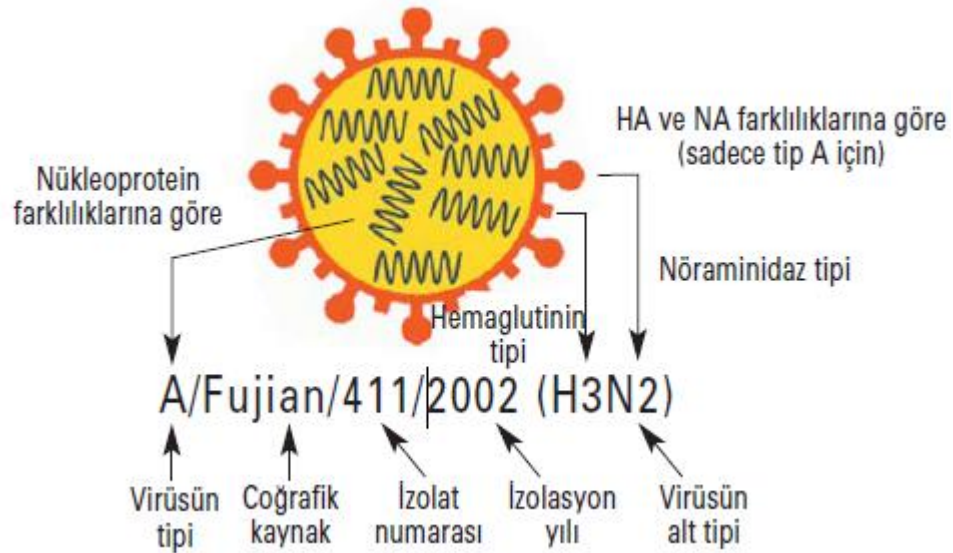
İnfluenza virusleri NP ve M proteinlerindeki antijenik farklılıklara göre tip A, tip B ve tip C olmak üzere üç tipe ayrılır (Tablo 1.2). Bu tipler arasında çapraz reaksiyon mevcut değildir. Yüzey glikoproteinlerindeki (HA ve NA) antijenik farklılıklara göre ise alt tiplendirme yapılır. Alt tipler sadece A tipi için geçerlidir.

Tablo 1.2. İnfluenza viruslarının karşılaştırılması

	İnfluenza A	İnfluenza B	İnfluenza C
Genetik Yapı	8 gen segmenti	8 gen segmenti	7gen segmenti
Yapı	10 viral protein M2 yapısı	11 viral protein NB yapısı	9 viral protein HEF yapısı
Konakçılar	İnsan, domuz, kuş, at	Sadece insan	İnsan, domuz
Epidemiyoloji	Antijenik şift ve drift	Sadece antijenik drift	Sadece antijenik drift
Klinik Özellikler	Pandemi	Epidemi/Endemi	Sporadik

Bugüne kadar kuşlarda 16 HA ve dokuz NA alt tipi tanımlanmışken, insana adapte olmuş üç HA (H1, H2, H3) ve iki NA (N1, N2) alt tipi mevcuttur (Brooks ve ark., 2007). İnfluenza viruslerinin alt tip çeşitliliği nedeniyle, isimlendirilmeleri Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından önerilen formüle göre yapılmaktadır. (Sullivan ve ark., 2010). Bu formülde; "virus tipi/orijin aldığı konak/orijin aldığı coğrafi bölge/izolat numarası/izolasyon yılı (tip A için HA ve NA alt tipleri)" belirtilmekte [örn. A/Avian/Hong Kong/1/97 (H5N1)], ancak insan izolatlarında

orijin aldığı konak belirtilmemektedir [örn. A/California/7/2009 (H1N1)] (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. İnfluenza viruslarının isimlendirilmesi (www.bing.com/health)

1.1.4. İnfluenza viruslerinde antijenik değişim

İnfluenza A ve B virusları 8 segmentli, influenza C virusu ise 7 segmentli genoma sahiptirler. Segmentler, en uzunundan başlayarak azalan uzunluklarına göre numaralandırılmışlardır. İnfluenza A viruslarında 1, 3, 4 ve 5 nolu segmentler birer protein kodlarlar: sırasıyla Polimeraz Bazik 2 (PB2), Polimeraz Asidik (PA), Hemaglutinin (HA) ve Nükleoprotein (NP) proteinleri. Segment 2 tüm influenza viruslarında polimeraz alt birimi olan PB1'i kodlar. Bazı influenza A viruslarının bu segmenti bir aksesuar protein olan PB1-F2'yi de kodlamaktadır. Bu 87 amino asitlik (aa) küçük protein pro-apoptotik etkinliğe sahiptir ve ne influenza B ne de influenza C viruslarında benzerine rastlanmaktadır. (Bouvier ve Palese, 2008). İnfluenza A virusunun 6, 7 ve 8. segmentleri, sırasıyla, Noraminidaz [NA], Matriks 1 [M1] ve Nonstruktürel protein 1[NS1] ile NEP/NS2 proteinlerini kodlarlar. İnfluenza A genomunda Matriks 2 [M2] iyon kanal proteini de 7 numaralı segmentte kodlanmaktadır. HA ve NA proteinleri glikoprotein yapısındadırlar ve viriyonun

yuzeyinde, konak hucreden turetilmiş kılıftan uzayan yuzeyel cıkıntılar halinde bulunurlar. Bir viriyonda HA sayısı yaklaşık 500 kadardır ve HA/NA oranı da kabaca 5/1 veya 4/1'dir.

Influenza A viruslarının en azından 18 memelide bulunabildiğine ilişkin kanıtlar elde edilmiştir (Gatherer, 2009). İnsanlarda çeşitli alt tipler (H1, H2, H3, H5, H7 ve H9) izole edilmekteyse de sadece 3 HA (H1, H2 ve H3) ile 2 NA (N1, N2) alt tipleri salgınlara (epidemilere) neden olmaktadır. İnfluenza A'nın iki alt tipi (H1N1 ve H3N2) ile influenza B insanlar arasında 1977'den bu yana mevsimsel olarak dolaşmaktadır. İnfluenza B ve C virusları için alt tipler tanımlanmamıştır. İnfluenza A viruslarında başat immunojenik proteinler virusun konak hucrelere girişini kolaylaştıran HA, progeni virusların enfekte hucrelerden salıverilmesini sağlayan NA ve replikasyonun gerçekleşebilmesi için viriyonun asidifikasyonundan sorumlu olan transmembran bir proton kanalı proteini M2'dir. HA proteinine karşı gelişen antikorlar influenza için en güçlü nötralizan antikorlardır ve enfeksiyon gelişimini önlerler. Buna karşılık NA proteinine karşı gelişen antikorlar enfeksiyonu önlemekte yetersiz kalsalar da hastalığın şiddetini ve suresini azaltırlar. Bu ikinciler noraminidaz inhibitörü antiviral ilaçların da hedefidirler. İnfluenza A viruslarına özgü M2 proteinlerine karşı gelişen antikorlar ise farklı alt tipten virusların enfeksiyonları arasında çapraz etkilidirler, ancak koruma düzeyleri düşüktür. Öte yandan, insanlarda homotipik antikorlar önemli düzeyde koruyucudurlar ve etkin koruma sağlarlar, oysa başka alt tiplerin HA ve NA'larına karşı gelişmiş (heterotipik) antikorlar ve hücresel bağışık yanıtlar uzun süreli bağışıklık oluşturmakta az etkilidirler. İnfluenza A virusları farklı mekanizmalar kullanarak devamlı olarak değişikliğe uğramaktadırlar. Bu mekanizmaları antijenik sürüklenme (*drift*), antijenik kayma (*shift*)'dır (Subbarao ve ark., 2006).

1.1.4.1. Antijenik sürüklenme (drift)

Influenza A ve B viruslarının evrimleşmesinde en önemli mekanizmalardan biri çok sayıda nokta mutasyona yol açabilen (yani antijenik değişmeye yol açabilen) bir

mekanizma olan, virus genomunun RNA segmentlerinin replikasyonu sırasında virus RNA polimerazının hata düzeltme (*proofreading*) yeteneğinin olmamasıdır. Dolayısıyla virusun her replikasyonunda virus genomunun çeşitli segmentlerinde nokta mutasyonlar oluşur. Bu mutasyonların büyük çoğunluğu nötraldir ve proteinlerin konformasyonunu etkilemezken kimi mutasyonlar, konak antikollarının bağlanmalarını etkileyecek şekilde virus proteinlerinde değişikliklere neden olurlar. Sonuç olarak, bir önceki dolaşan suşlara karşı gelişmiş ya da aşılama ile uyarılmış antikollar artık yeni, antijenik sürüklenmeye/değişmeye uğramış enfeksiyon etkeni virüslere karşı koruma sağlayamazlar. Yine, HA'daki antijenik sürüklenmenin (driftin) konak bağışıklık sistemi tarafından uygulanan seçilim basıncından kaynaklandığına ilişkin çok sayıda örnek vardır. Antijenik değişim influenza A ve B virüslerinin tüm suşlarında ortaya çıkmasına karşın gözlenen evrimleşme kalıpları influenza A'da alt tiplere göre değişmektedir. Örneğin influenza A (H1N1)'de drift varyantlar birçok soy hattıyla birlikte dolaşımda bulunurlar (influenza B virüsleri için de benzer bir durum söz konusudur); bu da eski suşların yeniden başlatıcı suş olarak ortaya çıkmasına olanak tanır. Oysa örneğin, influenza A (H3N2) virüslerinde yeni varyantlar genellikle eskilerin yerini almaktadırlar. Bir yıllık süre içerisinde H ve N aminoasit dizilerindeki mutasyon sıklığının % 1'den az olduğu hesaplanmaktadır ve oluşan antijenik farklılıkların serolojik testlerle (örneğin, hemagglutinasyon inhibisyon testi) saptanabilmesi 2-5 yıllık bir süreyi almaktadır. Sürekli antijenik değişim, mevsimsel influenza aşılıları içerisinde bulundurulacak virüslerin belirlenebilmesi için influenza virüslerinin sürekli izlenmelerini gerektirmektedir (Arias ve ark., 2009)..

1.1.4.2. Antijenik kayma (shift)

İnfluenza A (ve B) virüslerinin evrimleşmelerindeki bu ikinci mekanizma kaynağını virusun segmentli yapısından almaktadır. İki ya da daha fazla influenza virüsüyle enfekte bir konak hücresinde virus alt tiplerinin segmentleri arasında değişimler olur. Segmentlerin reasortmanı, yani viral gen segmentlerinin yeniden düzenlenmesi söz konusudur. Bu mekanizmanın en önemli sonucu yeni 51 influenza virus suşlarının

(alt tipler) ortaya çıkmasıdır ki bunlar influenza pandemilerine yol açabilirler. Örneğin, insan topluluklarının bağışık olmadıkları yeni PB1, H ve/veya N proteinlerinin bu yolla kazanılmaları 1957 ve 1968 pandemilerinin başlıca kaynağıdır. Farklı influenza A alt tipleriyle çoğul enfeksiyonlar sırasında görülebildiği gibi, bu mekanizma, örneğin, mevsimsel influenza virusları türümsülerinde kimi fenotipik (örneğin, antijen yapısı ya da ilac direnci) özelliklerin kazanılması ya da kaybedilmesinde de rol almaktadır (intrasubtipik reassortman) (Furuse ve ark., 2010). Öte yandan, 1918 İspanyol gribi etkeni influenza A (H1N1) örneğinde de görüldüğü gibi, zoonotik bir influenza virusunda insandan insana etkin bulaşma ortaya çıkaracak şekilde doğrudan mutasyonların bir sonucu olarak da antijenik kayma (*shift*) gelişebilmesi olabilmektedir (Morens ve ark., 2010).

1.1.5. Epidemiyoloji

İnfluenza virusü bütün dünyada her yaşta insanı etkisi altına alabilen, ciddi mortalite ve morbidite ile gidebilen enfeksiyonlara neden olur. Solunum yollarını tutan virusler arasında antijenik değişime uğrayabilen tek virustur (Treanor, 2005). İnfluenza, hastaların öksürme, hapşırma ve konuşma sırasında çevreye saçtıkları virus içeren küçük partiküllerin solunması ile bulaşır. Bulaşmış el ve cansız nesnelere temas sonucu da hastalık bulaşabilir ancak bu olasılık daha azdır. Çocuklar erişkinlere göre virusun yayılımına daha çok katkıda bulunmaktadır (Treanor, 2005). İnfluenza toplumda genellikle U tipi epidemik eğriye neden olur. Yani en yüksek atak hızı çocuklarda görülürken, mortalite oranı yaşlılarda ve özel risk gruplarında en fazladır. Her yıl okul öncesi ve okul çağı çocuklarının % 15 - 42'si influenza virusü ile enfekte olmaktadır. İnfluenza sezonu sırasında çocukların % 6 - 29'u influenza nedeniyle hastaneye başvururken; özellikle 2 yaş altı grupta hastaneye yatış oranı % 20'lere kadar çıkmaktadır (Rennels ve ark., 2002; White ve ark., 1999).

1.1.5.1. Epidemik İnfluenza

İnfluenza salgınının tek bir yerleşimde olması anlamına gelmektedir. Epidemiler ansızın başlar, 2 - 3 haftada en üst noktaya ulaşır ve 5 - 6 hafta devam eder (Aktaş ve ark., 1990). Epidemi çocuklarda solunum yolu enfeksiyonu nedeniyle okul devamsızlıklarının artması ile fark edilir. Bu olay epideminin ilk göstergesidir. Erişkinlerde aynı nedenle işe gelememe, pnömoni olgularında ve buna bağlı ölümlerde artma daha geç saptanan bir bulgudur. Epidemi ve pandemiler virusun sık rastlanan antijenik değişimlerine bağlı olarak, duyarlı kişilerin hastalanması sonucunda ortaya çıkar. Antijenik değişim influenza A'da sık 6 görülür. İnfluenza B ve C'de daha az oranda saptanır. Epidemiler kuzey yarımkürede Aralık - Nisan aylarında görülürken, güney yarımkürede Mayıs - Eylül aylarında meydana gelir. Bu mevsimsel değişikliğin nedeni açık değildir. Ancak uygun çevresel koşulların virusun devamlılığını sağlaması ya da kış aylarında ev içi geçişin artması değişikliğin sebebi olabilir (Turner ve ark. 2003; ACIP, 2004).

Epidemiler sırasında genellikle tek influenza suşu hakimdir. Ancak nadiren iki farklı suş veya iki farklı subtip eş zamanlı etkinlik gösterebilir. Araştırmalara göre suşlar arasında mortalite oranları açısından farklar bulunmaktadır. Örneğin H3N2 suşu ile oluşan epidemiler H1N1 suşu veya influenza B virusü ile oluşanlara göre daha yüksek mortalite oranları ile seyretmektedir (Treanor, 2005).

1.1.5.2 Pandemik İnfluenza

İnfluenza pandemileri, dünya çapında hızlı bir yayılım gösteren ve popülasyonun bağışık olmadığı yeni bir virusun ortaya çıkması ile meydana gelir. Epidemilerin aksine pandemiler her mevsimde görülebilir ve özellikle genç erişkinler olmak üzere her yaş grubunda yüksek mortalite hızı ile seyredebilir (Treanor ve ark., 2005; Killbourne ve ark., 1997).

1.1.5.3. Pandemik influenza A (H1N1) virusunun genetik orijini

Influenza A (H1N1) viruslerinin bilinen tarihi kökeni 1918 yılına dayanmaktadır. Kuş orijinli olduğu bilinen bu virus, türler arası geçiş için karmaşık engelleri aşarak insanları infekte etme yeteneği kazanmış ve 20. yüzyılın ilk ve en büyük pandemisine yol açmıştır. Yüksek mortaliteye yol açan 1918 pandemisinden sonra H1N1, insanlarda mevsimsel epidemiler oluşturmaya devam etmiş; 1957 yılında ise H2N2 olarak tanımlanan yeni bir alt tip ile yer değiştirmiştir. 1976 yılında yeniden ortaya çıkan A (H1N1), 1977 yılından beri, kimi zaman H3N2 alt tipinin dominant olduğu mevsimsel epidemiler yapmaya devam etmektedir (Sullivan ve ark., 2009; Chang ve ark., 2009).

Domuzlardan ilk kez 1930 yılında izole edilen influenza A (H1N1) virusunun ise antijenik olarak 1918 insan influenza A virusüne çok büyük benzerlik gösterdiği saptanmış ve aynı ortak atadan köken aldığı ifade edilmiştir. 1930'lu yıllardan 1990'lı yılların sonuna kadar domuz influenza A virusleri "klasik domuz influenza virusü" olarak anılmış ve bu virusler uzun süre antijenik stabilitelelerini korumuşlardır. Klasik domuz influenza virusü, 1998 yılında insan influenza A (H3N2) ve Kuzey Amerika kuş influenza (alt tipi bilinmiyor) virusleri ile genetik karışıma uğramış ve üçlü reasortan H3N2 domuz virusü ortaya çıkmıştır. Kuzey Amerika'da domuz popülasyonu arasında dolaşan üçlü re- asortan H3N2 alt tipi, yine 1998 yılında klasik domuz influenza virusü ile tekrar karışıma uğramış ve oluşan iki yeni domuz alt tipi (H1N1 ve H1N2) Asya'da domuz popülasyonu arasında dolaşıma girmiştir. Her ne kadar insan ve domuz H1N1 viruslerinin hepsi kuş kaynaklı ise de bunların evrimi farklı konak türlerinde gerçekleşmiştir (Sullivan ve ark., 2009; Sinha ve ark., 2009).

2009 pandemik influenza virusleri (S-OIV), daha önceden domuz veya insan influenza viruslerinde tanımlanmamış bir gen karışımı içermektedir. Yapılan çalışmalarında, S-OIV izolatlarının dört farklı alt tipin gen parçalarını içerdiği (dörtlü asortman) ortaya konmuştur (Itoh ve ark., 2009; Garten ve ark., 2009). Bu virusler, *PB2* ve *PA* genlerini Kuzey Amerika kuş virusünden; *PB1* genini insan H3N2

virusunden; *HA (H1)*, *NP* ve *NS* genlerini klasik domuz virusunden; *NA (N1)* ve *M* genlerini ise Avrasya kuş-benzeri domuz virusunden almıştır. S-OIV suşları, diğer pandemik virusler arasında antijenik olarak klasik domuz influenza A (H1N1) serotipine en fazla benzerlik gösteren viruslerdir. Ancak 2009 S-OIV suşlarının ortaya çıkışı, modern virolojide daha önce benzeri görülmemiş bir olay olarak kabul edilmektedir (Sullivan ve ark., 2009). Bu virus, yeni bir alt tipin klasik tanımı olan "dünya popülasyonunun çoğunda ya da hiçbirisinde daha önce enfeksiyon oluşturmamış olma" özelliğine uymamaktadır. H1N1 virusleri 1977 yılından beri sürekli dolaşımdadır ve 1956 yılından önce doğan birçok kişi H2N2 öncesi dönemde H1N1 serotipleri ile karşılaşmıştır. S-OIV ayrıca klasik drift tanımına da uymamaktadır; zira bu virus, dolaşımdaki insan orijinli H1N1 virusleri ile direkt bir evrimsel ilişki göstermemektedir. Benzer olarak şift tanımı da 2009 yılı H1N1 virusüne tam olarak uygulanamamaktadır. Zira H1 ve N1 antijenlerinde bütünüyle gerçekleşen bir değişim söz konusu değildir. S-OIV HA antijeninin, mevsimsel insan influenza A (H1N1) sero- tipinin HA antijeni ile arasında sadece %20 oranında farklılık olduğu belirtilmektedir (Sullivan ve ark., 2009; Igarashi ve ark., 2010).

S-OIV suşlarının her bir gen segmenti arasında saptanan %99.9'luk dizi homolojisi, türler arasındaki geçişin yakın zamanda ve tek bir defada olduğunu düşündürmektedir. Ancak yine de S-OIV'nin, günümüzde dolaşımda olan mevsimsel H1N1 virusleri ile çok düşük oranda antijenik çapraz reaktivite gösterdiği bir gerçektir. Bu durumun, insan suşlarının, domuz suşlarına göre immün seleksiyon yönünden çok daha ağır bir baskı altında olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. İlginç olarak çocuk ve genç erişkinlerde S-OIV suşlarına karşı çapraz reaksiyon veren antikorlar mevcut değilken, 60 yaşın üzerindeki bireylerin %30-40'ında çapraz reaksiyon veren antikorlar tespit edilmiştir (Katz ve ark., 2009; Hancock ve ark., 2009; Chang ve ark., 2009). 1950'li yıllardan önce insanlar arasında dolaşımda olan H1N1 virusleri, antijenik olarak klasik domuz H1N1 viruslerine dolayısıyla da S-OIV suşlarına bugünkü mevsimsel H1N1 serotiplerinden çok daha fazla benzerlik göstermektedir. Dolayısıyla o dönemde mevsimsel insan H1N1 virusleri ile infekte olan kişiler S-OIV'ye karşı çapraz koruma sağlayan antikorlara sahiptir. Influenza viruslerinin NA ve M proteinleri, klinikte kullanılan iki önemli antiviral ajan için

(sırasıyla; amantadin/rimantadin ve oseltamivir/zanamivir) hedef teşkil etmektedir. Bu gen parçalarını Avrasya domuz virusundan alan S-OIV suşları da, tıpkı ataları gibi oseltamivire duyarlı, amantadine dirençli olma özelliği göstermektedir (Chang ve ark., 2009).

1.1.6. Klinik belirti ve bulgular

Titreme ile yükselen ateş, baş ağrısı, miyalji, halsizlik, iştahsızlık, fotofobi ve balgamsız öksürük sık saptanan semptomlardır. Göz hareketleriyle ağrı saptanması tipik bir bulgudur. Ayrıca gözlerde yanma ve yaşarma da görülebilir. Ateş 38°C üzerinde olup genellikle 2 - 5 gün sürer. Ayrıca boğaz ağrısı ve boğazda yanma, burun akıntısı ve tıkanıklığı, ses kalınlaşması ve kuru öksürük saptanabilir. Öksürük 4 - 7 gün devam edebilir (Smith ve ark., 1998). Fizik muayenede hastalar septik görünümde, yüz kırmızı, cilt sıcak ve nemlidir. Konjunktivalar, burun ve boğaz hiperemiktir. Sağlıklı erişkinlerde influenza hafif hastalık tablosu şeklinde veya asemptomatik geçirilebilir (Smith ve ark., 1998).

Küçük çocuklarda genellikle farenjit, eritem, tonsillerin büyümesi, kusma gibi belirtiler görülebilir. Krup özellikle influenza A enfeksiyonlarında sadece çocuklarda görülen bir tablodur. İshal ve karın ağrısı özellikle B tipi influenzada ve çocuklarda sıktır (Smith ve ark., 1998).

1.1.6. Influenza Viruslarında Tanı

Influenza testleri için uygun örnekler nazofarengiyal veya boğaz sürüntüsü, burun yıkama suyu, burun veya bronş aspiratı ve balgamdır. Laboratuvar tanısı hastalığın başlangıcından 1-2 gün önceden 1-2 gün sonraya kadar mümkündür. Bununla birlikte hastalığın başlangıcından 7 gün sonraya kadar da virus üretilebilir.

1.1.6.1. Virusun tanısı için örneklerin toplanması ve saklanması

Tüm virusların laboratuvar tanısında olduğu gibi en önemli işlem örneğin alınması, uygun koşullarda laboratuara ulaştırılmasıdır. Virus izolasyonu için örnekler hastalığın ilk üç günü içinde, ateşli dönemde alınmalıdır. Memeli İnfluenza A virusları solunum yolu kolumnar epitel hücrelerinde replike olur, primer bulaşma yolu solunum sekresyonları ile olur. Virusun izolasyonu için materyal olarak boğaz ve burun yıkama sıvısı ve sürüntüleri kullanılır. Sürüntüler steril eküvyonlar ile alınır. Burun veya boğazda çubuk üzerine sarılmış olan pamuklu kısım ile materyal alınacak bölge kuvvetlice ovularak eküvyon içerisinde taşıma vasatı olan tüpe daldırılır. Sürüntü ve çalkantı şeklinde toplanan örnekler buzdolabında (+4°C'de) maksimum 4 güne kadar tutulabilir. Ama izolasyon yapılacak laboratuara en kısa sürede ulaştırılması tanı açısından en uygun yöntemdir. Örnekler uzun süre saklanacaksa -70 °C'de tutulması uygun olur (Heikkinen ve ark., 2002). Serolojik tanı için birisi hastalığın başlangıcında diğeri ise bundan 15-20 gün sonra olmak üzere iki kan numunesi alınır. Serumlar ayrıldıktan sonra -20 °C'de muhafaza edilir (Rowe ve ark., 1999)

1.1.6.2. Embriyonlu Yumurtada Virus İzolasyonu

Influenza virusunun izolasyonu embriyonlu yumurta ve hücre kültürlerinde yapılır. Embriyonlu yumurta İnfluenza A ve B viruslarının izolasyonu için örnekler 11 günlük embriyonlu yumurtanın ilk üretim için amniyotik sıvısına ekim yapılır. Aynı zamanda daha sonraki üretimleri için allontonik sıvıya ekim uygun olmaktadır. Ekim yapılan yumurtalar üç gün süre ile 38 °C'de inkübe edilip bu süre sonucunda bu sıvıları alınıp hemagglütasyon uygulanarak tanıya gidilir (Alymova ve ark., 1998).

1.1.6.3. Hücre kültüründe Virus İzolasyonu

Influenza A ve B virusları primer rhesus maymun böbrek (PRf hücreleri) veya Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) hücre kültürlerinde ürer. Influenza virusları hücre kültürlerinde ürer ancak sitopatik etki yapmazlar. Virusun üreyip üremediği Enzyme Immunoassay (EIA), Floresan Antikor (FA), hemadsorbsiyon gibi yöntemlerle saptanır. Kültürler -70°C'de dondurularak saklanır (Ruest ve ark., 2003).

1.1.6.4. Serolojik tanı

Enfeksiyonun serolojik tanısı akut devrede ve 2-3 hafta sonra alınan kan örnekleri arasında görülen dört kat veya daha fazla antikor artışı saptanması ile yapılır. Bunun için en çok Hemagglütinasyon İnhibisyon testi uygulanır. Ayrıca kompleman birleşmesi (KB), Double Immundiffusion (DID), Single Radial Diffusion (SRD) testleri de uygulanabilir. Son yıllarda Influenza hemagglütinine oluşan antikorları saptamada Enzyme Immunoassay (EIA) tekniği kullanılmaktadır. Bu tekniğin avantajı IgA, IgG ve IgM antikorlarını göstermesi olmuştur (Rowe ve ark., 1999).

1.1.6.5. Moleküler yöntemler

Solunum sekresyonlarında virus genetik maddesinin nükleik asit hibridizasyon veya polimeraz zincir reaksiyonu ile gösterilmesi mümkündür. Reverse transkriptaze (RT) PZR influenza virus RNA'yi saptanmasında kullanılan duyarlı ve özgül bir yöntemdir. Virusun tiplendirilmesi ve subtiplendirilmesinde kullanılmaktadır. İFA ve kültür sonuçları arasında tereddüt olduğunda önerilmektedir (Li ve ark., 2001).

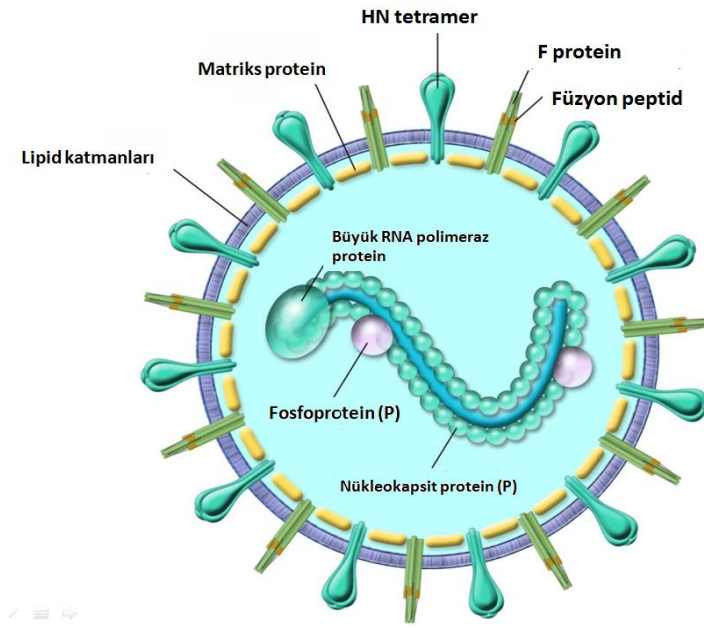
1.2. Parainfluenza viruslar

1.2.1. Morfoloji ve genel özellikler

İlk olarak 1955 yılında krup hastalığı olan (laringotrkeobronsit) yeni doğanlardan izole edilmiştir. Hücre kültürlerinde tipik sinsityal sitopatik etki gösterdiği görülmüştür. Paramiksovirusların yapısal özelliklerine sahip olan ajan, 150–200 nm çapında, pleomorfik bazen filamentoz morfolojidedir. Negatif polariteli, lineer tek zincirli zarflı RNA virusleridir (Chotpitayasunondh ve ark., 2005).

Orthomyxovirus ailesine benzer olmalarına karşın, daha büyük olmaları ve genetik maddenin segmentsiz olması ile farklılık gösterirler. Parainfluenza virus genomu 6 tanesi yapısal olan, 8–9 protein kodlayabilmektedir. Virusun yapısal olmayan proteinleri infekte hücrelerde bulunur (Liou ve ark., 1987).

Yapısal proteinler Nükleoprotein(NP), polimeraz fosfoprotein (P), matriks (M), füzyon (F), hemaglütinin-nöraminidaz (HN) ve büyük protein (L) dir. NP proteini RNA ya sıkıca bağlı olup nükleokapsitte görev alır. M proteini zarfın altında bulunup, zarfta bulunan glikoprotein ve nükleokapsid arasındaki bağlantıda rol alır. Ayrıca HN ve F proteinlerinin konak hücrenin sitoplazma membranından oluşması ve virusun konak hücreden tomurcuklanarak ayrılması işlemlerinin başlamasında rol alır. HN glikoproteinler ile virus konak hücreye bağlanır. Bu bağlanma füzyon oluşabilmesi için gereklidir. F proteini ise zarfta bulunup, virusun konak hücreler arası füzyonu (sinsityum oluşumu), hücre içi penetrasyonu ve hemoliz ile nötralizan antikor oluşumunda rol alır. Parainfluenza viruslarında 4 antijenik serotip bulunur. PIV tip1, tip2, tip3, tip4 ve iki (PIV tip 4A ve PIV tip 4B) alt tipe sahiptir (Denizli ve ark., 1994).



Şekil 1.4. Parainfluenza virusunun yapısal şekli (<http://www.jci.org/articles/view/25669/figure/1>)

1.2.2. Epidemiyoloji

Parainfluenza'nın dört tipi de geniş bir coğrafik dağılıma sahiptir. PIV tip 1 ve PIV tip 2'nin sonbahar-kış aylarında, PIV tip 3'ün ise ilkbahar aylarında salgınlara neden olduğu bilinmektedir. RSV'den sonra çocuklarda en sık alt solunum yolu enfeksiyonuna neden olan virustür. Tip 3 prevalandır ve çocukların hemen hemen yarısı ilk sene içinde enfeksiyon geçirmektedir. ABD'deki bir çalışmada ilk 2 yaşta PIV3 enfeksiyonunun fazla olduğu, hastalanma riskinin % 30 civarında olduğu belirtilmiştir. 2 yaştan sonra bu oranın düştüğü belirtilmiştir. PIV1 ve PIV2 enfeksiyonlarının 2 yıllık sikluslarla oluştuğu bildirilmiştir (Glezen ve ark., 1984).

Dünyadaki krup vakalarının 1/3'ünün parainfluenza virusları (Özellikle PIV tip 1) tarafından oluşturulduğu bilinmektedir. İmmün yetmezliği olanlarda persistan ve ciddi PIV enfeksiyonları gelişebilir. Kemik iliği transplantasyonu olanlarda da ciddi PIV enfeksiyonları bildirilmiştir (Ljungman ve ark., 1989).

1.2.3. Hastalıklar ve Klinik Bulgular

Hastalık olarak; burun akıntısı, öksürük, soğuk algınlığı gibi üst solunum yolları enfeksiyonları ve bronşit, bronşiolit ve krup gibi çok ciddi olgular gösteren alt solunum yolları enfeksiyonları oluşturabilirler. Ayrıca solunum yolu dışında da görülmüş olan PIV enfeksiyonları, nadiren menenjit, parotit ve nazokomiyal enfeksiyon etkenleri olarak sayılabilir (Karron ve ark., 1994; Reed ve ark., 1997).

1.2.4. Patogenez

PIV enfeksiyonları, solunum yollarından infekte damlacıkların ya da direkt virusun teması ile bulaşmaktadır. PIV'leri ilk giriş kapısı olarak burun ve boğaz mukoz membranlarını tutar. Silli epitelyumlara tutunarak çoğalır ve enfeksiyon oluşturur. Sonuç olarak; hücrelerde, hem virus etkisi ile hem de virusa karşı oluşan immün yanıt ile harabiyet görülür. Özgül korunma ilk olarak lokal antikorlarla gerçekleşmektedir. Kuluçka süresi 3–6 gün arasında olup, salgınlarda 1–4 gün arasındadır (Henrickson ve ark., 1995; Smith ve ark., 1994). Hastalığın normal seyrinde iyileşme geç olmaktadır. PIV enfeksiyonlarında reenfeksiyon sık olmaktadır. PIV tip3 prevalan özelliğindedir (Pachucki, 2005; Boivin ve ark., 2004).

1.2.5. Tanı

PIV enfeksiyonlarının tansında, virusun muayene maddesinde gözlenmesi, virusun hücre kültürü ile izolasyonu ve serolojik tanı uygulanan yöntemlerdir (Poot ve ark., 1992).

1.2.5.1. Direkt inceleme

İmmunofloresan antikor (IFA) yöntemi ile nazofaringeal aspirat örneklerinden virusun araştırılması esasına dayanır. Birkaç saatte sonuç alınabilen hızlı tanı yöntemidir. Ayrıca ELISA yöntemi ile virus antijeni araştırılabilir.

1.2.5.2. Serolojik Yöntemler

PIV enfeksiyonlarının serolojik tanısında antikor yanıtı nötralizasyon, hemaglutinasyon inhibisyon ve ELISA yöntemleri ile uygulanır (Ogilvie, 2001).

1.2.5.3. Virus İzolasyonu

Boğaz burun sürüntüleri örneklerinin hücre kültürlerine ekilip üretilmesi esasına dayalı yöntemdir. Virusun üremesi sitopatik etkinin gözlenmesi ile belirlenir ve İmmuno floresan antikor yöntemi uygulanır.

1.2.6. Tedavi ve Korunma

Semptomatik tedavi uygulanır. Yapılan aşı çalışmalarında antikor seviyesi artışı görülmüştür, ancak koruyuculuk yeterli bulunamamıştır. Virülansı düşürülmüş aşular ile çalışmalar devam etmektedir (Noyola ve ark., 2000; Pachucki, 2005)

1.3. Adenovirüsler

1.3.1. Morfoloji ve genel özellikler

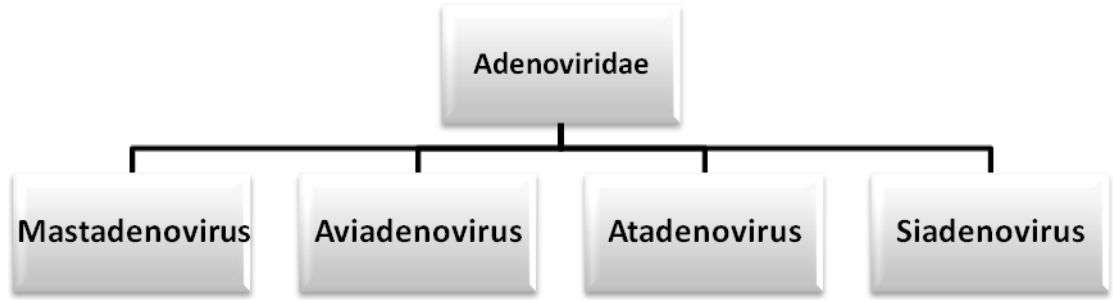
İnsan adenovirüsleri, *Adenoviridae* ailesinde *Mastadenovirus* cinsinde yer alan zarfsız, çift zincirli DNA virüsleridir. 70 ile 90 nm çapında, ikosahedral simetrik olup moleküler ağırlıkları 5,000 ila 120,000 arasında değişen 10 yapısal protein içerirler. Adenovirüsler konak hücrenin nükleusunda çoğalır ve konak türüne özgüdürler. Virüs ile infekte hücrelerin bir araya toplanması ile karakteristik tipik sitopatik etki oluştururlar. Hekzon kapsomerleri üzerinde cinse özgü antijenik determinantlar içerirler. Adenovirüsler ikosahedron şeklindedirler. Her bir virion 240 hekzon ve 12 pentondan oluşur. Çıplak virüslerdir, kübik yapının her bir köşesinde bir fiber yer alır. 12 fiber vardır. Fiberin uzunluğu her bir alt cins üyesi için karakteristiktir. Kapsit içinde tek molekül halinde lineer, çift zincirli DNA bulunur. DNA'nın moleküler ağırlığı 20×10^6 - 24×10^6 arasındadır. Farklı insan adenovirüsleri için G+C baz kompozisyonu % 47'den % 60'a kadar değişir. Çoğu adenovirüs süspansiyonları pH 6 ila 9 arasında -20°C ila -100°C'de uzun süre stabil kalır. Virüs 56°C'de, % 0.25 sodyum dodesil sulfat, 0.5 µg/ml konsantrasyondaki serbest klor varlığında, UV ışınlanması ile, 1:400-1:4000 sulandırımındaki formalinle inaktive olur. Eter ve kloroform ile muameleden etkilenmez. Özel önlemlere gereksinim kalmadan liyofilize edilebilir ve infektivitelerini 4-10°C'de korurlar (Bozkaya, 2006).

1.3.2. Sınıflandırma

Adenoviridae ailesi dört cinste toplanır (Tablo 1.3). *Mastadenovirus* Yunanca "mastos"dan gelmektedir; insan, maymun, sığır, at, domuz, kedigiller gibi memelileri kapsamaktadır. *Aviadenovirus* kuş "avi" kelimesinden gelmekte, *Atadenovirus*'taki

“at” genomun yüksek A+T içermesini tanımlamakta, *Siadenovirus* “sialidaz” kelimesinden kaynaklanmaktadır (Bozkaya, 2006).

Tablo 1.3. Adenoviridae ailesinin sınıflandırılması.



İnsan adenovirusları nukleotid dizi analizine göre A'dan F'ye kadar 6 alt cinse ayrılmıştır. Adenoviruslar önce Rosen tarafından hemaglutinasyon özelliklerine göre sınıflandırılmışlardı. Bu sınıflandırma 1973 yılında Hierholzer tarafından genişletilmiştir. 1967 yılında Hueber adenovirusları onkojenik özelliklerine göre sınıflandırmıştır. En son olarak da virionda yer alan yapısal proteinlerin büyüklüklerine ve viral genomun DNA homologisine göre bilinen tüm insan adenovirusları 6 alt cinse ayrılmıştır. İnsan adenovirusları yenidoğmuş hamsterlerde onkojenite açısından model olarak da kullanılmıştır. A alt cinsindeki adenovirusların çoğu yenidoğmuş hamsterlerde inokulasyonu takiben 2 ay içinde tümör oluşturur. B ve E alt cinslerindeki adenoviruslar bazı hayvanlarda 4 ila 18 ayda tümör oluşturur. C, D ve F alt cinslerindeki adenoviruslar in-vitro sıcan hücrelerini transforme ederler. Sodyum dodesil sulfat-poliakrilamid jel elektroforezi ile virion polipeptidlerinin moleküler ağırlıklarının analizi, insan adenovirusları arasındaki ilişki ile ilgili daha detaylı bilgi verir (Bozkaya, 2006).

Alt cins A: tip 12, 18 ve 31 bu alt cinste yer alır. Tümü sağlıklı kişilerin dışkılarından izole edilebilir. Tip 31 bağışıklık yetersizliği olan kişilerden ve diyareli çocuklardan izole edilebilir. Alt cins B: bu alt cinste iki farklı grup bulunur. 3, 7, 16, 21 ve 51 tiplerinden oluşan gruptakiler özellikle solunum yolu enfeksiyonu salgınlarından sorumludur. Bu tipler diyare de dahil sistemik enfeksiyona yol açabilirler. Dünya Sağlık Örgütü'ne bildirilen tüm izolatların 1/3'ü bu tiplerdendir.

İkinci grup tip 11, 14, 34 ve 35'den oluşur. Üriner sistemin persistan enfeksiyonlarına yol açarlar. Tip 14 ve 11 solunum yolu enfeksiyonu salgınlarına yol açabilirler. Alt cins C: tip 5 ve 6 bu alt cinsde yer alır. Lenfoid dokuda yıllarca kalıp intermitan olarak dışkıyla atılırlar. Alt cins D: goze tropizmi ile karakterizedir ve bu alt cinsde 30 serotip yer alır. Serotip 8, 19a ve 37 akciğer enfeksiyonları ve sporadik keratokonjunktivit etkenidirler. Tip 40 ve 41 bilinen epitelyal hücre dizilerinde üremezler. Bu enterik adenoviruslar uzun süren infantil diyareden sorumludur(Bozkaya, 2006).

1.3.3. Antijenik yapı

Adenovirus replikasyonu sırasında çok miktarda antijenik yapı oluşur ve eriyebilen antijenler olarak kültür sıvısına salınırlar. Bu proteinler kompleks yapılar olup, çok sayıda antijenik determinant taşırlar. Özellikle hekzon, verteks kapsomeri ve fiberler tip ve alt cinse spesifik antijen içerirler. Hekzon ve fiberler tipe özgü antijenik determinantlar virionun yüzeyinde bulunur ve serumda nötralizan antikorların oluşumuna yol açarlar. Fiber güçlü bir hemaglutininidir ve hemaglutinasyon-inhibisyon antikorlarının oluşumuna yol açar. Cinse özgü antijen hekzonlar üzerindeki ana determinant olup, kapsidin internal kısmında yer alır ve protektif antikor oluşumuna yol açmaz (Bozkaya, 2006).

1.3.4. Laboratuvar tanısı

Adenoviruslar çeşitli etkenlere dirençli viruslardır. İnfeksiyon bölgesinden kolaylıkla izole edilirler. Nazofaringeal aspirat ya da eküvyonla alınan örnek; nazal aspirat ya da eküvyonla alınan örnek kullanılır. Örneğin erken dönemde alınması ve transportun uygun şekilde yapılması gerekir (Murray, 2005).

1.3.4.1. Antijen tayini

Adenoviral IgM yanıtının duyarsızlığı ve IgG serokonversiyonunun gösterilmesinin gerekliliği, bireysel hastalarda, tanısal amaçlı serolojinin yararlılığını, büyük oranda sınırlamaktadır. İmmüno-kompromize bireylerde, persistan enfeksiyonlarda, heterotopik yanıtlar nedeniyle yetişkinlerde, gecikmiş antikör artışlarının diğer klinik problemlerle çakışabileceği çocuklarda sorunludur. Bu nedenle elimizin altında olmasına karşın, seroloji, epidemiyolojik araştırmalar için yapılmaktadır (Murray ve ark., 2005).

1.3.4.2. Virus izolasyonu

Adenoviruslar, HeLa, KB, A549 ya da Hep-2 gibi devamlı insan hücre dizilerinde, insan embriyonik akciğer fibroblastlarında (HELFI, W138, MRC-5) ve diğer embriyonik fibroblastik hücrelerde ürer; tipik sitopatik etki oluştururlar. Tip 40 ve 41 özel şartlarda belirli hücre dizilerinde çok düşük titrelerde ürerler. İnfekte hücreler yuvarlaklaşır ve kümeler oluştururlar; adenovirus için özgül sitopatik etkiyi geliştirirler. Hastadan alınan örneğin ekim için hazırlanışı önem taşır. Solunum yolu örneği antibiyotik ile muamele edilip 3 dakika düşük devirde hücre ve diğer atıkları uzaklaştırmak için santrifuj edilir. Üst sıvıdan hücre kültürüne ekim yapılır. Hücre kültüründe sitopatik etki araştırılır. Klasik yöntem uzun zaman alırsa da Shell vial yöntemi ile 2 günde sonuç elde edilebilir. İzole edilen virusun identifikasyonunda, İFA, EIA ve lateks aglutinasyonu ile adenovirus tanısı konabilir. Maymun, insan ve sıcan eritrositleri kullanarak aglutinasyon ile subgrup tanısı yapılır. Hemaglutinasyon-inhibisyon testi, notralizasyon testi, EIA ve PZR ile tip tanısı yapılabilir (Bozkaya, 2006).

1.3.4.3. Serolojik tanı

Akut ve konvelasan dönemde 2 ile 4 hafta ara ile toplanan serum örneklerinde özgül antikor aranır. Dört kat titre artışının gösterilmesi gerekir. EIA ya da kompleman fiksasyon testi kullanılır. Adenovirus antijeni, immünofloresan antikor (IFA), enzim immünoassay (EIA) ve radyoimmün assay (RIA) yöntemleri ile klinik örnekte gösterilebilir (Kim *et al.* 2000, Carballal *et al.* 2002). Immünofloresan antikor (IFA) yöntemi hücre kültürlerine örneğin ekimi ve kısa süreli inkübasyonunu takiben (24-72 saat) erken antijenlerin saptandığı “shell vial” tekniğinde başarıyla uygulanmaktadır(Aslan ve Yılmaz 2001). İndirekt floresan antikor yöntemi daha çok hasta serumunda antikor aramak amacıyla kullanılır. Solunum yolu örneklerinde adenovirusların hızlı bir şekilde saptanması için oldukça kullanışlı bir yöntem olmakla birlikte duyarlılığı düşüktür. Direkt floresan antikor (DFA) testinde ise hastalık metaryalindeki viral antijen içermesi olası hücreler, buldukları lama tespit edildikten sonra üzerlerine floresan hale getirilmiş bağışık serum ilave edilir. Yarım saat bekletildikten sonra preparat floresan mikroskobu ile incelenir. Viral antijen ile eklenilen bağışık serum birbirlerine uygunluk gösterirlerse birleşirler ve buna bağlı olarak da enfekte hücrelerin floresans verdikleri görülür (Ustaçelebi 1999).

1.3.4.4. Moleküler yöntemler

Teknolojinin ilerlemesine paralel olarak son yıllarda geliştirilen moleküler yöntemler (Southern blotting, Northern blotting, restriction fragment length polymorphism, dotblotting gibi hibridizasyon ve polimeraz zincir reaksiyonu, ligaz zincir reaksiyonu, nükleik asit dizi amplifikasyonu, transkripsiyona bağımlı amplifikasyon gibi amplifikasyon yöntemleri) ile klinik örneklerde adenovirus DNA’sı saptanabilmektedir. Hibridizasyon yöntemleri ile 5-10 adenovirus DNA kopyasının saptanabileceği gösterilmiştir. PZR yöntemi kullanılarak duyarlılık bir viral DNA kopyasına kadar indirilebilmektedir. Duyarlılığın artırılmasının yanı sıra bu yöntemle tip tayini de yapılabilmektedir. Adenoviruslar için optimal bir izolasyon sistemi olmaması ve PZR’nin izolasyona ihtiyaç göstermemesi daha önce fark edilmemiş

adenovirusların saptanmasına da olanak sağlamıştır (Durmaz 2001). Multipleks PZR ile farklı hedef bölgeler için özgül olan primerler kullanılarak çok sayıda hedef aynı zamanda çoğaltılabilmektedir. Klasik PZR'nin hızlı ve diğer PZR yöntemlerine göre ucuz olması avantajlarındandır. Fakat çoğaltılan nükleik asitlerin gösterilmesinde kullanılan agaroz jel elektroforezini takiben etidyum bromürle boyanan jelin UV transilluminatörde görüntülenmesi aşamalarında dikkatli davranılmazsa hatalı pozitif sonuç oluşabilir (Durmaz 2001, Lin *et al.* 2004).

1.3.5. Epidemiyoloji ve klinik belirtiler

Adenoviruslar insanların hemen hemen tüm organ sistemlerinden izole edilmiş, bir çok klinik sendrom ile ilişkili bulunmuştur. Adenovirus enfeksiyonları tüm yıl boyunca endemik olup her yaşta görülür. En sık okul çağı çocuklarında enfeksiyona yol açar, bu enfeksiyonların % 50'si asemptomatiktir. Adenoviruslar kış ve bahar aylarında lokalize solunum yolu enfeksiyonu salgınlarına, yazın yüzme havuzlarından kaynaklanan faringokonjunktival ateş, yılın herhangi bir ayında oftalmolojik işlemler ya da göz travmaları ile ilişkili epidemik keratokonjunktivite yol açarlar.

Adenoviruslar bebeklerde ve okul öncesi çocuklarda gastroenterit olgularının % 5-15'inden sorumludurlar. Askeri birliklerde akut solunum yolu enfeksiyonu epidemileri günümüzde uygun serotipleri içeren kapsül şeklindeki aşılarla önlenmektedir. 51 serotipi tanımlanmış olup en sık enfeksiyona yol açanları 1'den 8'e kadar ve 11, 21, 35, 37, 40 serotipleridir. Adenovirusların yol açtığı üst solunum yolu enfeksiyonları soğuk algınlığı, farenjit veya tonsillit şeklinde olup genellikle bebek ve küçük çocuklarda görülmektedir. Klinik tabloya genellikle tip1'den 7'ye kadar olan adenoviruslar yol açar. Tip 1, 2, 5 ve 6'ya ait önemli bir özellik virusun yaklaşık %50 çocukta adenoid ve tonsil dokusunda latent olarak yerleşmesidir. Bir diğer epidemiyolojik özellik ise virusun semptomsuz olarak aylarca dışkı ile atılmasıdır. Bronşit, bronşiyolit ve pnömoni gibi alt solunum yolu enfeksiyonları, sıklıkla adenovirus enfeksiyonlarında komplikasyon olarak görülür. Ölümcül

olabilen ağır pnömoni bebek ve çocuklarda, nadiren erişkinlerde görülür ve tip 3, 4, 7 ve 21 tarafından oluşturulur. Böbrek ve karaciğer tutulumu gibi ekstrapulmoner tutulum özellikle bebeklerde ve bağışıklık yetersizliği olanlarda görülür ve bu tür hastalarda yaygın hastalık genellikle fatal seyirlidir. Tip 3, 7 ya da 21'in neden olduğu pnömoniden iyileşen bazı çocuklarda kalıcı akciğer hastalığı olmaktadır. Tip 5 ile, nadiren tip 1'den 3'e kadar adenoviruslarla boğmacaya benzer öksürük tablosu bildirilmiştir. Adenoviruslar hastane enfeksiyonuna neden olabilirler. Hastaneye yatan çocuklardaki pnömonilerin % 10'undan adenoviruslar sorumludur. Dışkıyla uzun süre atılırlar. Bulaşma solunum yolundan saçılan damlacıklar ile ya da kontamine eşyalarla olur. Virus solunum yolunu ve gözü enfekte edebilir. Hastane çalışanları enfekte olabilir.

1.4. Respiratuar sinsityal virus (RSV)

1.4.1. Morfoloji ve genel özellikler

RSV yapı olarak negatif polariteli, tek sarmal RNA genomu içeren pleomorfik özelliktedir. Paramyxoviridae ailesi paramyxovirinae alt ailesinin pneumovirus cinsinde yer almaktadır. 120-300 nm çapında olup tek sarmal RNA genomu 10 viral protein kodlamaktadır. Bu proteinlerden N, P, L nükleokapsid, F,G, M, M2 zarf ve SH virion ile ilgili olup, NS1 (1C) ve NS2 (1B) yapısal olmayan proteinlerdir (Savy ve ark., 2000). Diğer paramiksoviruslar ile aynı yapısal özelliklere sahip olmasına rağmen; nöraminidaz ve hemaglutinin içermez. RSV monoklonal antikorlar aracılığı ile veya genetik analizler ile A ve B diye iki alt gruba ayrılır. Bunların ayrımı G proteinlerindeki aminoasid sekanslarındaki farklılıklarla birbirinden ayrılırlar. G proteini virusun konak hücreye bağlanmasında rol alır. 37°C'de stabil değildir, 4°C'de infektivitesi bozulmadan muhafaza edilebilir (Sengupta ve ark., 2003).

1.4.2. Antijenik yapı

Farklı araştırmacılar, RSV'nin yapısal proteinlerine karşı monoklonal antikorlar kullanarak vermiş olduğu reaksiyonlara göre A ve B olmak üzere virusun iki major antijenik alt tipini belirlemişlerdir. İki RSV alttipinin aminoasit dizisindeki en büyük değişiklik G glikoproteininde görülmektedir. Bu genetik değişikliğe neden olan diğer protein ise SH proteinidir. RSV suşları arasındaki polimorfizm ilk kez Grup A'nın A2 susu ile Grup B'nin 18537 suşunun ntralizasyonlarındaki farkın dikkat çekmesi ile saptanmıştır. A ve B altgruplarının F proteinleri %50, G proteinleri ise % 1-7 ilişki göstermiştir. Dolayısıyla, protein G ayırıcı testler için iyi bir antijendir (Langedijk ve ark., 1997; Walsh ve ark., 1990). İki alt grubun antijenik olarak stabil olduğu ve çoğu yıllarda epidemilerde, birlikte etken oldukları saptanmıştır. Genellikle alt grup A daha sıklıkla etken olarak elde edilmiştir. RSV altgrupları kendi içinde de değişkenlik göstererek genotiplere ayrılır. Bu da özellikle G proteinine karşı monoklonal antikorların kullanımına veya genomun nukleotid analizine dayanarak gösterilir. Tek bir epidemi sırasında hem A hem de B altgruplarının farklı genotiplerinin varlığı gösterilmiştir. Aynı dönemde tüm dünyada aynı genotipler bulunmaktadır. Birbirini takip eden epidemiler incelendiğinde farklı genotiplerin epidemiye hakim olduğu dikkati çekmektedir. Tüm genotipler her epidemide yoktur. Belirli genotipler zamanla artış gösterip daha sonra azalırlar. Bu belirli zamanda belirli genotipe karşı gelişen direncin göstergesidir (Cane ve ark., 1994; Cane ve ark., 1995; Garcia ve ark., 1994).

1.4.3. Epidemiyoloji

Genellikle ilkbahar ya da kısı aylarında salgınlar olurlar. Epidemilerde A ve B grubu viruslar bir arada salgınlar yapsa da genellikle grup A daha fazla izole edilmektedir. RSV salgınları esnasında diğer viruslar ortamda nadir görülüp salgınlar yaparlar. RSV salgınının en belirgin özelliği o dönemde görülen pnömoninin ve bronşiolitin toplumda artması ve çocukların akut alt solunum yolu enfeksiyonu şikyeti ile hastaneye yatmasıdır (Freymuth ve ark., 1995).

Yeni doğanlarda ve özellikle erkek çocuklarda insidansı daha yüksektir. Tüm yaş grupları RSV enfeksiyonun duyarlıdır. Salgınlar 2–3 ay sürebilmektedir. Bulaş en fazla damlacık yolu ile olup, kuluçka süresi 4–5 gündür. Okullar, bakımevleri duyarlı kişilere bulaş için ideal ortamlardır (Smith ve ark., 2003; Thomas ve ark., 2003).

1.4.4. Laboratuvar Tanı

1.4.4.1. Serolojik Tanı

Epidemiyolojik çalışmalarda daha önemli olan bu yöntem, hastalık takibinde fazlaca tercih edilmez. ELISA ve IFA yöntemi ile antijen aranır. Antijen tayini hastalığın ilk üç gününde nazofarinksten alınan aspirasyon sıvısında uygulanır.

1.4.4.2. Hücre Kültürü

Klinik ve epidemiyolojik bulguların yanında esas tanı mikrobiyolojik olarak yapılır. 58–61 Uygun hücre kültürlerinde özellikle Hep-2, HeLa, PRMK (Primer Rhesus Maymun Böbrek Hücre Kültürü) 7 günde tipik stopatik etkileri görülür. Hücre kültürlerinde üremeleri yavaştır. Düzinelerce nükleer ve stoplazmik inklüzyon cisimcikleri içeren büyük sinsityal hücrelerin görülmesi ile virus saptanır. İlk sitopatik etki 3–5 gün içinde oluşur. Virus hücre kültürüne ekildikten 7–10 saat sonra immunofloresan yöntemi ile viral antijenler hücre stoplazmasında saptanır. Hemadsorbsiyon özellikleri yoktur (Thomas ve ark., 2003; Yamada ve ark., 1991).

1.4.4.3. Moleküler yöntemler

Son yıllarda polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve revers transkripsiyon (RT) ile viral nükleik asit dizinlerinin amplifikasyonuna dayanan yöntemlerin RSV tanısında

degeri arastirilmaktadir. RSV genomunun, F glikoproteininin F1 subunitesini kodlayan bölgesine özgü oligonükleotid primerleri kullanılarak gelistirilmis tekniğin duyarlılığının ve özgünlüğünün yüksek olduğu bilinmektedir (Freytmuth ve ark., 2003).

1.4.5. Patogenez

Enfekte burun ve boğaz salgıları ile virusun bulaşmasından sonra 2-8 günlük bir kuluçka süresini takiben virusun nazal sekresyonlarda belli bir titreye ulaşması ile hastalık belirtileri başlar. Bulaşma virus içeren solunum yolu kaynaklı büyük damlacıklar veya bunlarla kontamine olmuş nesnelere ve ellerle olur (Hall ve ark., 1980; Hall ve Douglas, 1981). Virusun organizmaya girişinde göz ve burun mukozaları eşit önem taşıırken ağız da bir giriş yoludur. RSV enfeksiyonu genellikle solunum yolları ile sınırlı olup virusun yayılımı üst solunum yollarından alt solunum yollarına doğru olmaktadır. Bu yayılım mekanizması tam açık olmamakla beraber, ya solunum yolu epiteli ile direkt olarak ya da nazofarengeal sekresyonların aspirasyonu ile olduğu sanılmaktadır (Collins ve ark., 1996). Virus, sitoplazmalar arası kurulan köprülerle hücreden hücreye, hücre dışı aralığa geçmeden yayılabilmekte ve hücre füzyonu yaparak sinsisyum oluşturmaktadır. Bebeklerde alt solunum yolunun tutulma belirtileri burun akıntısının başlangıcından genellikle 1-3 gün sonradır. Otopsi çalışmalarında elde edilen verilere göre fatal seyreden pnömonili vakalarda virus antijenleri daha yoğun olarak bulunmaktadır. Bu da virus replikasyonunun solunum yetmezliğinin artışıyla doğru orantılı gittiğini ve yine RSV antijenlerinin derinlere gitmeyip solunum yolunun yüzeyel tabakalarında sınırlı kaldığını göstermiştir. Bağışıklık sisteminde yetersizlik olan bebek ve erişkinlerde fatal RSV enfeksiyonları tanımlanmıştır. Bu olgularda virusun solunum yollarının dışına da yayıldığı ve böbrek, karaciğer ve miyokard gibi diğer organların tutulduğu gözlenmiştir (Collins ve ark., 1996; Welliver ve ark., 1998).

Enfeksiyonun odak noktası; solunum yolu epiteli olup, dökülen kirpikli epitelyum hücrelerinde virusun antijenini saptamak mümkündür (Armstrong ve

Cohen, 1999). RSV ile enfekte hücrenin plazma zarının altında yoğun pleomorfik, eozinofilik iplikli kümeleri andıran perinükleer inklüzyonlar görülür. Tomurcuklanma öncesi hücre zarının altında nukleokapsid görünümü alır. Şişerek lümeneye doğru çıkıntı yapan virusle enfekte kirpikli epitel hücreleri kirpiklerini kaybeder ve virus buradan tomurcuklanır (Collins ve ark., 1996; Fields ve ark., 1996; Belshe ve Mufson, 1991). Bu esnada enfekte hücre zarı komşu hücre zarı ile birleşerek RSV'nin sitopatik etkilerinden (CPE) olan çok çekirdekli dev hücreler oluşturur. Böylece virus ekstrasellüler sıvıya geçmeden hücreden hücreye yayılır. Enfeksiyonun başlangıcından 18-24 saat sonra histolojik olarak bronşiyol epitelinde proliferasyon gelişimi başlar. Plazma hücreleri, makrofajlar ve lenfositlerin eşlik ettiği peribronşiyal infiltrasyon konak hücre yanıtının göstergeleridir. Elastik lifler ve kas tabakasında tutulum yoktur. Virusler, bronş epitelinde belirgin olarak lokal doku reaksiyonu oluştururlar. Bu reaksiyon, epitelyal örtüde nekrozdan silya ve epitel hücresinde harabiyete kadar değişen bulgulara yol açar. Bronşiyollerin lümeninden dökülen epitel hücreleri ve artan mukus salgısı nedeniyle yoğun bir tıkaç oluşur. Böylece küçük bronşiyollerde tıkanma meydana gelir. Tıkanma nedeniyle hava akımının engellenmesi hem ekspiryum hem de inspiryum sırasında gözlenir. Ekspirasyon sonrası kalan havayla artan pozitif basınç, lümen darlığını daha da artırır. Havalanma artışının nedeni, periferik bölgelerdeki kısmi tıkanıklık sonrası gelişen hava tuzağıdır. Sonrasında gelişen tam tıkanma, birden çok alanda atelettazinin gelişimine neden olur. Sonuç olarak; bronşiyolitli bebeğin akciğer hacmi artar ve ekspirasyonu zorlu olur (Mandel ve ark., 1995; Belshe ve Mufson 1991). RSV, küçük hava yolu epiteline (75-300 nm) trofizim gösterir. Geniş hava yollarında da bronşiyolit patolojik değişiklikleri saptanmıştır. Hava yollarında ve akciğer parankiminde oluşan hasar muhtemelen virusun direkt etkisi ve konağın immun yanıtından dolayıdır (Ogra, 2004; Pannitch ve ark., 1994; Visscher, 2006). Bebeklerde periferik küçük hava yolları erişkinlere oranla nispeten daha küçüktür. Ayrıca, bebeklerin hava yollarında mukus salgı bezleri daha fazladır ve bol miktarda sekresyon üretimine izin verir. Bebeklerde, hava yolu mukozası daha gevsek olarak akciğere yapıştığından, bunlarda submukozal ödem oluşma potansiyeli daha fazladır. Bebeklerin akciğerlerindeki Kohn porları az sayıda ve immatur olduğundan kollateral ventilasyon erişkinlerdeki gibi efektif değildir. Bu nedenle, hava tuzağı ve

atelektaziler daha kolay gelişir. Bütün bu faktörler değerlendirildiğinde, RSV enfeksiyonunun sıklıkla bebeklerde bronşiyolit şeklinde, erişkinlerde ise daha çok üst solunum yolu enfeksiyonu şeklinde ortaya çıktığı anlaşılmaktadır. Bebeklerde ve çocuklarda bronşiyolit daha ciddi bulgularla seyretmesinde, anatomik farklılıkların yanı sıra mukozal sekreteruar IgA değerlerindeki düşüklük, tip-1a makrofajlardaki yetersizlik gibi faktörlerin de rol oynadığı düşünülmektedir. Bunların hepsinin bir sonucu olarak da; akciğer hacminde artış (ekspiryum sonunda yaklaşık 2 kat kadar), fonksiyonel reziduel kapasitede artış, dinamik kompliyansa azalma, solunum yolları direncinde artış, gaz alışverişi ve ventilasyon-perfüzyon oranında bozulma, arteriyel hipoksi, hiperkapni ve pH değişiklikleri görülür. Bu değişiklikler, bronkopulmoner displazi, kistik fibrozis ve kronik akciğer hastalığı gibi altta yatan bir akciğer hastalığı olan çocuklarda ve özellikle pulmoner hipertansiyonla giden konjenital kalp rahatsızlığı olan bebeklerde daha ağır klinik tablolara ve zaman zaman ölümlere neden olabilmektedir. Akut bronşiyolitlerde düzelme 3-4 gün içinde bronşiyol epitelinde rejenerasyonla başlar, silialardaki iyileşme ise daha geç, yaklaşık 15 gün içinde görülür. Oluşan mukus tıkaçları ve plaklar makrofajlar tarafından yok edilirler (Pannitch ve ark., 1993; Langley ve ark., 1997).

Hastaneye yatırılan bebeklerin küçük bir kısmında alveolar hipoventilasyon ve ilerleyici hiperkarbi sonucunda mekanik ventilasyon gerekebilir. RSV enfeksiyonları 7-21 gün içerisinde düzelme gösterir, gerekli görüldüğü durumlarda hastanede kalış süresi de 3-7 gün arasında değişmektedir.

1.4.6. Direnç

RSV, sıcaklık ve pH değişikliklerine çok hassastır. Enfektivitesi 55 derecede 5 dakikada %10'a düşerken, 37 derecede bir saat stabil kalır ancak 24 saat sonra enfektivitesi %10'a iner. Enfektivitesi 25 derecede 48 saat sonra %10'a düşerken, +4 derecede 7 gün sonra %1'e düşer (Hambling, 1964). Yavaş dondurulma ve çözülmeye de duyarlı olan virus -30 derecede yavaşça dondurulup çözülmeye bırakılırsa enfektivitesinin tamamını kaybeder. Asit pH virusu olumsuz etkiler.

Optimal pH 7,5'tur. Virus; eter, kloroform ve çeşitli deterjanlarla (%) 0,1'lik sodyum deoksikolat, sodyum dodesil sulfat ve triton X-100) çabuk inaktive olur. RSV'nin saklanması, alkol-kuru buz karışımı veya gliserin ya da sükröz eklenerek hızlı dondurma yöntemleri kullanılabilir. RSV'nin canlılığı kısmen ortamın nemine de bağlı olup hastanın solunum yolu salgılarında bulunan RSV, oda sıcaklığında gözeneksiz yüzeylerde (masa, steteskop v.s) 3-30 saat canlılığını sürdürebilirken, gözenekli yüzeylerde (giysi veya kağıt gibi) canlı kalma süresi 1 saatten azdır. Ellerde de RSV'nin enfektivitesi kişiden kişiye değişmekle beraber genellikle 1 saatten azdır (Hall ve ark., 1980).

1.4.7. Tedavi

RSV ile ilgili yapılan çalışmalar sonucunda biyolojisi, immunolojisi, epidemiyolojisi ve patofizyolojisi ile ilgili olarak ilerlemeler kaydedildiyse de tedavisi ile ilgili olarak sorunlar halen surmektedir. Tedavisinde en çok üzerinde durulan destek tedavisidir. Destek tedavisi de, oksijen desteği, intravenöz hidrasyon ve antipiretik uygulanmasını kapsamaktadır. Bronkodilatörlerin etkinliği tam olarak tanımlanmamasına rağmen bronşiyolitte yaygın olarak kullanılmaktadır (La via ve ark., 1992; Levy ve Graber, 1997; Schuh ve ark., 1990).

RSV' de destek tedavisinin dışında uygulanan diğer tedaviler kişiden kişiye değişiklikler gösterir. Bebeklerde uygulanan kortikosteroidlerin yararlılığı düşük bulunmuştur (Roosevelt ve ark., 1996). Akut bronşiyolitli hastaların tedavisinde antibiyotik kullanımının yeri yoktur. Enfeksiyon göstergelerinin kuvvetli pozitif olduğu durumlar, genel durum kötülüğü, yüksek ateş, akciğer grafi bulgularında konsolidasyon varlığı ve sepsis gibi durumlarda destek tedavisine eklenmelidir (Pediatrik Akciğer Hastalıkları Çalışma Grubu, 2002).

Ribavirin, guanozin ve inozine benzeyen sentetik bir nukleozid analogu olup, ağır RSV bronşiyoliti veya bronkopnomonisi nedeniyle hastaneye yatırılan bebeklerde uygulanan antiviral ajandır. Messenger RNA'nın ekspresyonunu

etkileyerek viral protein sentezini inhibe eder. Aerosol olarak 12-20 saat sureyle 2-5 gün uygulanmalıdır. Toksik yan etkileri minimaldir, uzun sureli tedavilerde bile bu antiviral ajana karsi direnç gelisini saptanmamıştır. Özellikle, konjenital kalp hastalığı, kronik akciğer hastalığı, kistik fibrozis, immun supresyonlu hastalar, norolojik hastalığı olanlar ve premature bebeklerde yararlıdır.

RSV enfeksiyonlarının zaten birçok bebekte kendi kendini sınırlayan bir seyir izlemesi ve ribavirin tedavisinin de çok maaliyetli olması ancak seçilmiş olgularda ilacın kullanılması gerektiğini göstermiştir.

Rekombinant INF alfa-2a ile yapılan in vitro çalışmalarda olumlu sonuçlar alınmıştır. Ancak RSV ile enfekte çocuklarda yararlılığı ve yan etkilerine ait yapılan çalışmaların yetersizliği nedeniyle kullanılamamaktadır. Sung ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, rekombinant interferon tedavisinin bronşiyolit morbiditesi üzerindeki etkilerini ve bulaştırıcılık suresi üzerinde etki sağlayıp sağlamadığını araştırmışlar. Sonuç olarak plasebo alan gruba göre ilk 3 gün boyunca tüm klinik düzelmelerin daha fazla olduğunu ancak viral bulaştırıcılık süresinin değişmediğini görmüşlerdir (Mandel ve ark., 1995; Sung ve ark., 1993).

1.4.8. Korunma

RSV' ye bağlı alt solunum yolu enfeksiyonlarının tedavisi destekleyici tedavidir. Bu nedenle tedaviden ziyade hastalığın kontrolünde korunma önem kazanmaktadır. Bununla ilgili olarak, iyi el hijyeni, ellerin antiseptik solüsyonlarla yıkanması, aynı şekilde kontamine çevresel yüzeylerin ve oyuncakların da temizlenmesi gibi genel temizlik kurallarının uygulanması hastalıktan korunmada büyük önem taşımaktadır. Diğer önleyici durumlar arasında kalabalıktan sakınma, sigara içilen ortamlardan uzak durma sayılabilir (CDC, 2002). RSV'den korunma amaçlı yapılan aşı çalışmaları etkili bir asının varlığını ortaya koyamamıştır. Asılama denemeleri 1960'lı yıllarda başlamıştır. Bu ası ile immunizasyon sonrası yüksek titrede F glikoproteinine karşı antikor cevabı gözlenmiş fakat nötralizan aktivite istenilen

ölçüde olamamıştır. İnaktivasyon işleminde uygulanan formalinin, F ve G glikoproteinlerinde koruyucu epitoplara antijenitesini selektif olarak azalttığı, buna bağlı olarak da işlevsel olmayan antikorların oluştuğu ve doğal enfeksiyonun daha da abartılı olarak ortaya çıktığı düşünülmüştür. Doğal enfeksiyonun artmasına neden olan bir diğer varsayım ise, F glikoproteinine karşı oluşan antikorların virusun sınısıyum olusturmasını önlediği halde, formalinle inaktive ası uygulaması sonrası F antijenine karşı antikorların oluşmamasının sonucu bebekleri enfeksiyona hassas kıldığı seklindedir. Canlı attenuue virusun subkutan uygulanması seklinde yapılan ası çalışmalarından da anlamlı bir sonuç alınamamıştır. Halen F-G glikoproteinlerine karşı kombine ası çalışmaları devam etmektedir (Hall, 1994; Sung ve ark., 1993).

Pasif bağışıklık değerlendirildiğinde, anne sütünde özgül anti-RSV IgA'lar bulunmaktadır. Bu antikorların da yeni doğanlarda RSV' ye karşı tam bir bağışıklık sağlamadığı bilinmektedir. Son dönemde özellikle premature bebekler, kronik akciğer ve kalp hastalığı olan çocuklarda uygulanmak üzere yeni immunoterapotik ajanlar bulunmuştur (Groothuis ve ark., 1993). Bunlardan biri, saflaştırılmış insan kaynaklı IgG olan RespiGAM'dır. RSV' ye karşı koruyucu antikor içerir ve intravenoz olarak uygulanır. Hastalığın şiddetli formlarının oluşumunu azalttığı yolunda çalışmalar vardır. Bu nedenle yüksek risk grubundaki hastalara uygulanması önerilmektedir. RespiGAM'ın dezavantajları arasında, uygulama yönteminin güç olması ve uzun sürmesi, uygulama sonrası canlı ası yapımını geciktirmesi, RSV'nin sık görüldüğü mevsimden önce başlanılıp ayda 1 kez olarak mevsim boyu uygulanması ve kan kaynaklı patojenleri bulaştırma riski sayılabilir (Simoes ve ark., 1998; Sandritter ve Kraus; 1997; Hay ve ark., 1996). Bu uygulama yerini, 1998 yılında FDA tarafından onaylanan RSV monoklonal antikorun intramuskuler formu olan Palimizuvab'a (Synagis) bırakmıştır. RSV'nin F proteininin A epitopuna karşı geliştirilmiş insan kaynaklı monoklonal bir antikordur. F glikoproteinine bağlanarak virusun diğer epitel hücrelerini enfekte etmesini önler. Uygulanışı RespiGAM'dan daha kolay ve yan etkileri azdır. Maliyetinin yüksek olması nedeniyle kullanımı sınırlı olup yüksek risk grubunda olanlara kullanılmaktadır (Impact RSV Study Group, 1998; Johnson ve ark., 1997).

1.5. Rinoviruslar

Picornaviridae ailesinde yer alırlar. Soğuk algınlığı ve üst solunum yolu enfeksiyonlarının önemli etkenlerinden biridir. Bugün 100'ün üzerinde serotipi olup burun ve boğazdan izole edilmişlerdir.

İlk defa Kruse 1914 yılında nezleli bir hastanın burun akıntısının bakterisiz filtratının sağlam kişilerin burunlarına damlatılması sonucu bu kişilerin enfeksiyon geçirdiğini göstermiştir. 1954 yılında Mogabgat tarafından maymun böbrek hücrelerinden Rinovirus tip 1A izole edilmiştir. Son yıllarda tüm yaşlardaki immüno-kompromize hastalarda alt solunum yolu hastalıkları ile ilişkilendirilmektedir. Kronik akciğer hastalığı ve astım, ayrıca sinüzit ve otitis mediada etken olduğu bildirilmektedir (Savolainen ve ark., 2002).

1.5.1 Morfoloji ve Genel Özellikleri

Virus partikülü RNA ve bunu çevreleyen protein bir kapsidden ibarettir. Virus ikozahedral simetriye sahip olup 22-30 nm. çapındadır. Kapsid 60 kapsomerdan oluşmuştur. Nükleokapsitte VP1, VP2, VP3 ve VP4 olarak gösterilen dört protein içerirler. VP1, VP2 ve VP3 genetik maddeyi örten protein tabakada, VP4 ise içte yer alır. Nükleik asit tek zincirli pozitif polariteli, 7200 nükleotid uzunluğunda RNA'dır (Smith ve ark., 1986).

Rinoviruslar diğer pikornaviruslardan birçok yönden ayrılırlar. Bu viruslar düşük pH'da inaktive olurlar, fakat 50°C'de enfektivitelerini korurlar. Rinovirusların % 80-90'ı ortak bir reseptör kullanmaktadır. İntrasellüler adesiyon molekül 1 (ICAMI) en önemli reseptörleridir. ICAM-I çok farklı hücrelerin yüzeyinde bulunmaktadır. Virus diğer RNA viruslarında olduğu gibi konak hücrenin sitoplazmasında çoğalır (Uncapher ve ark., 1991).

1.5.2. Antijenik Yapısı

Rinovirus infektivitesi, çeşitli spesifik antiserumlarla nötralize edilebilir. Tip 2 ve 14'e karşı monoklonal antikorlarla yapılan çalışmalarda, Rinovirusun iki ikozahedral asimetrik ünitesinin birbirine bitişik iki yarısında 3, 4 veya 5 immünojenik bağlanma yeri gösterilmiştir. Yeni serotiplerin tanımlanması nötralizasyon reaksiyonuna dayanır. (Appleby ve ark., 2005).

1.5.3.Yaptığı Hastalıklar ve Klinik Bulgular

Hastalığın kuluçka süresi 1-5 gün olup ortalama 2 gündür. Enfeksiyon kendisini üst solunum yollarında dolgunluk ve irritasyon, baş ağrısı, öksürük, boğaz ağrısı, burun akıntısı şeklinde gösterir. Çok az bir ateş artışı olur veya ateş görülmez. Hastalığın oluşumunda hiçbir serotip predominant değildir. Spesifik serotiplerle salgınlar nadirdir. Rinoviruslar yılın birçok ayında hastalık oluştururlar ve sonbaharda en üst düzeye ulaşırlar. Alt solunum yolu enfeksiyonları da görülebilir. Hastalık 2-3 gün sürer, semptomlar hızla düzelir. Sigara içenlerde öksürük sıklığının arttığı ve hastalık süresinin uzadığı bilinmektedir (Savolainen ve ark., 2002).

1.5.4. Patogenez ve İmmünite

Rinoviruslar organizmaya üst solunum yolları aracılığı ile ve kontamine ellerle direk temasla girerler. Burun mukozası ve farinkste ürer ve orada yerleşirler. Virus sadece burun sekresyonlarında mevcut olup diğer vücut sekresyonlarında görülmez. Yaptıkları histopatolojik değişiklikler mukozaya mahsus olup başlıca bulgular mukozaya kan hücumu, ödem, hafif hücre infiltrasyonu ve epitelyum dökülmesidir. Edinilmiş bağışıklık tipe özgüdür. Bağışıklık serumdaki Ig M'den daha çok burun mukozasındaki Ig A'nın titresi ile yakın ilişkilidir. Herhangi bir tiple enfeksiyonu takiben birkaç hafta için heterotipik Rinoviruslara ve birkaç yıl homotipik virusa direnç oluşur (Savolainen ve ark., 2002).

1.5.5. Laboratuvar Tanısı

1.5.5.1. Örnek alınması ve muhafazası

Tanı için materyal alınması işlemi semptomların başlamasından itibaren 3 gün içerisinde yapılmalı ve örnek en kısa zamanda laboratuvara ulaştırılmalıdır. Bu esnada +4°C’de muhafaza edilmelidir. Örnek olarak burun yıkama sıvısı veya faringeal sürüntü kullanılabilir. Örnek uzun süre saklanacaksa -80°C de saklanmalıdır (Lennette, 1992).

1.5.5.2. Virus İzolasyonu

Rinoviruslara duyarlı olmaları nedeniyle insan orijinli olan WI-38, WI-26 ve MRC-5 gibi diploid hücre kültürleri izolasyon için uygun ortamlardır. İnsan embriyonu böbrek ve akciğer hücre kültürleri de kullanılmaktadır. Virus identifikasyonu, ısıya duyarlılık ve asit pH ve lipit solventlere rezistan oluşu ile yapılır. Rinoviruslar en iyi 33 °C de ürerler, düşük pH'ya hassasdır ve kloroform, eter gibi solventlere de dayanıklıdır (Lennette, 1992).

1.5.5.3. Viral Antijenin Gösterilmesi

Viral antijenin doğrudan klinik örnekten gösterilmesi, pek çok Rinovirus serotipi varlığı nedeniyle zordur. ELISA ile direkt olarak örnekten Rinovirus gösterilebilir. Nükleik asit hibridizasyonu ile klinik örnekten % 90'a varan oranda Rinovirus gösterilmiştir (Hierholzer ve ark., 1989).

1.5.5.4. Serolojik Tanı

Serumdaki antikorlar veya burun yıkama örneği için standart serolojik test nötralizasyon testidir. Hemaglutinasyon inhibisyon testi kullanılmakla birlikte, nötralizasyon testi kadar hassas değildir. Ayrıca bazı Rinoviruslar hemaglutinasyon özelliği göstermez. Kompleman fiksasyon testinde Rinoviruslarla, enteroviruslar arasında heterotipik antikor gösterebilir. İnsan EI ve 2 antijenleri kullanılarak hazırlanmış ELISA serum ve nazal Ig G ve Ig A'lar için kullanılmıştır. Rinovirusun pek çok serotipinin olması nedeniyle doğal enfeksiyon tanısı koymada problemler olmaktadır (Vuorinen ve Meurman, 1989).

1.5.6. Epidemiyoloji

Rinoviruslar bütün dünyada yaygın halde bulunmaktadır. Enfeksiyonlar ısının aniden değiştiği sonbahar başı ve ilkbahar başında meydana gelir. Rinoviruslar her yaş grubunda enfeksiyon oluşturabilmektedir. Virus yayılımı inhalasyonla olabileceği gibi, bulaşta infekte ellerin eşyalara ve diğer kişilerin ellerine temasının da etkili olduğu bilinmektedir (Nicholson ve ark., 1996).

1.5.7. Tedavi ve Korunma

Spesifik bir tedavisi yoktur. Çok sayıda serotipinin olması, yanıtının kalıcı olmaması aşı hazırlanmasını güçleştirmektedir. Hastalık tablosunun ağır olmaması da tedavi ve aşı için zorunluluk getirmemektedir. En iyi korunma yöntemi, salgınlarda dikkatli olma, el yıkama ve kontamine objelerin dezenfeksiyonudur (Mäkelä ve ark., 1998).

1.6. Metapneumovirus

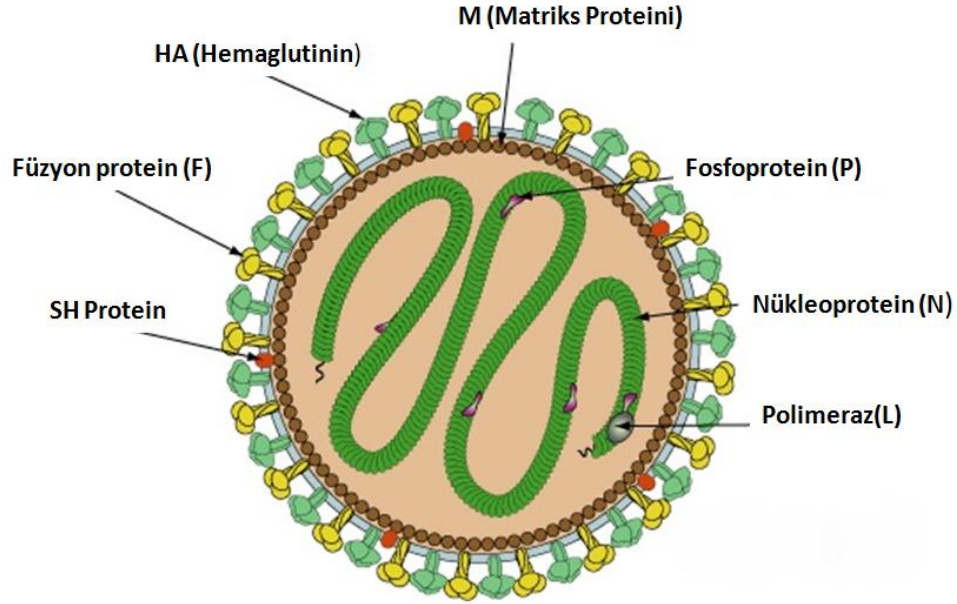
Human metapnömovirus (hMPV) ilk olarak 2001 yılında, solunum yolu yakınmaları olan çocuklardan izole edilmiştir . (Daha sonraki araştırmalar virusun dünyada çocuklar arasında 2-4 ve 5-9 yaş grubunda yaygın olarak bulunduğunu, toplumdan kazanılan akut solunum yolu enfeksiyonlarına neden olduğunu, yenidoğanda RSV ile koenfeksiyon oluşturması bronşiolitin ağırlaşmasında rol oynadığını göstermektedir (Crowe, 2004; McAdam ve ark., 2004).

1.6.1. Morfoloji ve Genel Özellikleri

Human metapnömovirus genusu zarflı , segmentsiz, tek zincirli, negatif polariteli, sırası ile 3' ucundan itibaren N (nukleokapsit), P (fosfoprotein), M (matrix), F (fusion), M2 (seconder matrix), SH (small hidrofobik), G (glikoprotein), L (large polimeraz), 5'ucuna genlerden oluşan RNA genomu içerirler. Lineer genomik RNA molekülü helikal ribonükleoprotein complexinde P ve L proteinleri ile ilişkili olan N proteini ile kapside sıkıca tutunmaktadır. (Ribonükleoprotein kompleksi genom replikasyonu için gerekli olan mRNA transkripsiyonunun yapıldığı bölgedir (Conzelmann, 1998).

hMPV, *Paramyxoviridae* ailesi *Pneumovirus* alt ailesinde yer almaktadır. Filogenetik olarak hRSV, hMPV'ye en yakın insan virusüdür. Klinik belirtileri de RSV ile örtüşmektedir .114 Hastalık hafif solunum yakınmalarından, ağır öksürük, bronşiolit ve pnömoniye kadar değişen belirtiler ile yüksek ateş, miyalji ve kusma yapabilmektedir. Dolayısı ile bazı hastaların hastaneye yatması ve mekanik ventilasyon gerekmektedir (Wright ve ark., 1989; Davies ve ark.,1996). hMPV yaşlı insanlarda da RSV benzeri hastalığa neden olmaktadır. Yaşlılarda öksürük, ateş solunum yolu şikayetleri öne çıkan belirtilerdir (Falsey ve ark., 2003). İngiltere'de yapılan bir çalışmada 40-64 yaş arasında öksürük, farinkste ağrı hissi, balgam çıkarmada artış, letarji, burun akıntısı ile seyreden enfeksiyonlu hastalardan % 70

oranında hMPV saptandığı, RSV'de olduğu gibi immünyokompromize hastalarda artan morbiditeye neden olduğu bildirilmektedir (Greensill ve ark., 2003).



Şekil 1.5. Metapneumovirus'un şematik görünümü http://expasy.org/viralzone/all_by_species/89.html

25/05/2011

1.6.2. Yaptığı Hastalıklar ve Klinik Bulgular

hMPV dünya üzerinde yaygın bir patojendir. Özellikle çocuklar ve erişkinlerde bu virus şiddetli öksürük, bronşiolit ve pnömoni benzeri semptomlarla nazofarengial yolda hafif ya da şiddetli akut enfeksiyona neden olmaktadır (Wright ve ark., 1989; Falsey ve ark., 2003) hMPV son yıllarda akut bronşiolitli akut solunum yolu enfeksiyonu bulunan çocuklardan izole edilmiş yeni bir solunum virusudur. hMPV ya tek başına viral patojen olarak ya da RSV ile koinfekte identifiye edilebilmektedir (Boivin ve ark., 2003). Mevsimsel dağılımda diğer solunum yolu viral etkenleri ile benzerlikler göstermektedir (Maggi, 2003).

Diğer solunumsal viral patojenler ile ya da RSV + hMPV' nin neden olduğu bronşiolitler arasında klinik laboratuvar açısından herhangi bir farklılık yoktur. Tek

başına hMPV pozitifliği ile RSV hMPV birlikte pozitifliği arasında hastalığın şiddeti açısından da bir fark yoktur. Benzer şekilde kalp atım sayısı, solunum sayısı wheezing, deri rengi, O₂ saturasyonu indekslerinde de önemli farklılıklar gözlenmez. RSV'ye bağlı bronşiolitli infantların bronkoalveoler lavaj sıvılarının analizinde önemli oranda hMPV koenfeksiyonu da bulunmaktadır. hMPV; çocuklarda alt solunum yolu hastalığı olarak ağır bronşiolit ve pnömoniye sebep olan önemli bir patojendir. hMPV varlığı ile birlikte klinik ve epidemiyolojik karakteristik özellikler de dikkate alınmalıdır. Klinik bulgular orta derecede ısı artışı, burun akıntısı, şiddetli öksürük, krup, taşidispne, taşikardi, diffüz wheezing ve raller ile birlikte lökositoz ve hipoksemi bulguları görülebilmektedir (Hamelin ve ark., 2004).

1.6.3. Epidemiyoloji

hMPV'ün genotiplendirilmesinde P proteininin toplumda 4 subtipinin varlığı belirlenmiştir. hMPV, çocukların alt solunum yolu enfeksiyonlarında önemli bir patojendir. Nozokomiyal enfeksiyonlara yol açmaktadır (Hamelin ve ark., 2004).

Son yapılan çalışmalarda hMPV'ün 2 ay-77 yaş arası hastalarda solunum yolu rahatsızlığına neden olabildiği belirlenmiştir (Boivin ve ark., 2002;) 123 Epidemiyolojik olarak toplumda RSV ile birlikte sirkülasyon halinde bulunmaktadır.124 125 2001 yılında Hollandalı araştırmacılar hem üst solunum yolu enfeksiyonu hem de ağır bronşiolit ve pnömoni semptomları gösteren alt solunum yolu enfeksiyonlu 28 çocuktan hMPV izole etmişlerdir ve yapılan serolojik çalışmalarda bu virusun en az 50 yıldır insanlar arasında sirkülasyon gösterdiğini ve 5 yaşındaki Hollandalı tüm çocukların bu virusa maruz kaldığını iddia etmişlerdir.

1.6.4. Laboratuvar tanısı

hMPV hücre kültürlerinde güç üremektedir. Hızlı antijen bakılması için kit geliştirme çalışmaları devam etmektedir. Seroloji retrospektif tanıyı sağlamaktadır, bu nedenle kesin tanı PZR ile yapılmaktadır (Hamelin ve ark., 2004).

1.6.5. Tedavi

Henüz spesifik tedavisi yoktur. Semptomatik tedavi veya solunum desteği uygulanabilir. Invitro çalışmalar poliklonal immunglobulin ve ribavirin ile kombine tedavinin uygulanabileceğini göstermektedir. Henüz aşısı yoktur (Wyde ve ark., 2003).

1.7. Koronavirüsler

Koronavirüsler ilk olarak 1965 yılında Tyrrell ve Bynoe, 1966 yılında Hamre ve Procknow tarafından insan embriyonu silli trakea veya nazal epitelyumu ve primer insan böbrek hücre kültürlerinde üretilmiştir. Günümüzde bu ailede yaklaşık 15 tür yer almaktadır. Koronavirüsler insanlardan başka sığır, domuz, kedi, köpek, kemiriciler ve kuşlar (bazısı özellikle civcivlerde ciddi patojen) da hastalık oluşturmaktadır. *Coronaviridae* ailesinden *Coronavirus* (omurgalı infeksiyöz bronşit virusu) ve *Torovirus*'lar (at virusu) yer almaktadır.

1.7.1 Morfoloji

Koronavirus partikülleri yaklaşık 60-220 nm büyüklükte, düzensiz görünümde, 20 nm uzunluk 10 nm genişlikte “club shaped” peplomerlidir. Koronavirus ismi virusun görüntüsünün taca benzetilmesi nedeni ile verilmiştir. Tek zincirli, segmentsiz,

pozitif polariteli RNA viruslarıdır, virionda polimeraz bulunmaz. Zarfta glikoprotein yapılar yer alır.

S protein: Majör antijendir, reseptör başlama ve hücre füzyonundan sorumludur.

E protein: Virus zarfı ile ilişkili küçük proteindir.

M protein: Virusun tomurcuklanarak zarfını almasında rol oynayan membran proteindir. HE protein ise hemagglutinin esterazdır. Genetik madde esas protein N fosfoprotein ile birlikte.

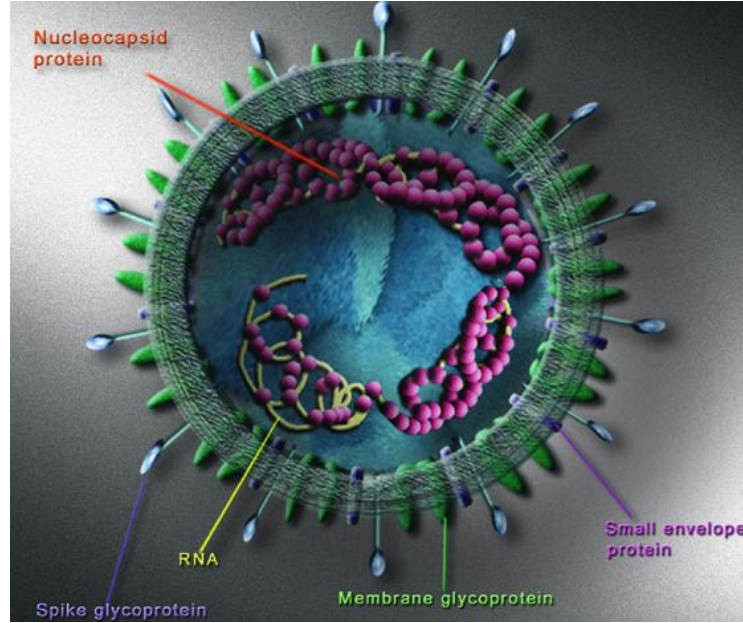
1.7.2. Sınıflandırma

Koronaviruslar ilk kez ÜSYE etiyolojisini çalışan araştırmacılar tarafından keşfedildi. İlk başta iki ana serolojik grup tanımlandı; 229E ve OC43, daha sonra 2003'te SARS- CoV, 2004'te Koronavirüs NL63 ve 2005'te Koronavirüs HKU1 bulundu. İlk başlarda 229E ve OC 43'ün, kış ve ilkbaharda daha sıklıkla olmak üzere sadece üst solunum yolu enfeksiyonuna yol açtığı sanılırken, son çalışmalarda, virüsün pnömoni gibi pek çok alt solunum yolu enfeksiyonuna yol açtığı saptanmıştır (Gagneur ve ark., 2002)

1.7.2.1. SARS-koronavirus

2002 sonbaharında, Çin Guandong'da, hipoksi, ani solunum yetmezliğiyle giden yeni bir solunum yolu enfeksiyonu geliştiği tespit edildi. İlk başta hastalığın beraber saptanan HCoV ve diğer virüslere bağlı olduğu düşünülse de sonra asıl etkenin yeni bir koronavirus, SARS- koronavirus olduğu anlaşıldı (Şekil 1.6). Kasım 2002- Temmuz 2003 arasında, SARS-CoV 8000 kişiyi enfekte etti ve 32 ülkede 800 kişinin ölümüne yol açtı. SARS-CoV'e %99 benzerlik taşıyan başka bir virus

Himalaya misk kedileri ve rakun köpeklerinde ve yarasalarda da izole edilmiş ve bunların hayvan rezervuarı olabileceği düşünülmüştür (Guan ve ark., 2003; Wang ve ark., 2006)



Şekil 1.6. Sars-Corona virusun yapısı (<http://slavirusportfolio.wikispaces.com/SARS-Danielle>)

Çocuklarda, özellikle 12 yaş altında daha hafif seyreden SARS-CoV enfeksiyonunun, ateşli bir alt solunum yolu enfeksiyonu olarak başladığı, bunu izleyen 3-7 gün içerisinde, dispne ve öksürüğün ortaya çıktığı bu evrenin de hızla solunum yetmezliğine kadar gittiği, erişkin nüfusun %10-20 oranında mekanik ventilasyon ihtiyacı olabileceği bildirilmiştir. Saptanan diğer bulgular ise steroid tedavisine yanıt veren trombositopeni, lenfopeni, anemi, nötrofili, kimyasal hepatit, akciğer grafisinde tek ya da çift taraflı infiltrasyon, hipoksidir. Hipoksi saptanan 80 hastanın 42'sine steroid ve 37'sine ribavirin verildikten sonra yapılan değerlendirmede, steroidin klinik ve radyolojik düzelmeyi sağlamada çok etkili olduğu saptanmıştır³⁵. Çocuk ve adolesanlarda hiç ölüm bildirilmemiştir. Temmuz 2003'den beri birkaç laboratuvar kaynaklı vaka dışında hiç SARS-CoV saptanmıştır.

1.7.2.2. Koronavirüs NL63

İlk kez 2004'de koronavirüs NL63, yedi aylık bir bronşiolit vakasında saptandı³⁷. Daha sonra ÜSYE ve ASYE nedeniyle izlenen hastaların %1,7-9,3'ünde etken olduğu belirlendi^{38,39}. Kore'de yapılan bir çalışmada koronavirüs NL63 saptanan vakaların %64'ünde krup, %21,4'ünde bronşiolit olduğu bildirilmiştir. Ilıman iklimlerde en sık Ocak-Mart aylarında görülen koronavirüs NL63'ün Kawasaki hastalığına yol açabileceğinden şüphelenirse de yapılan çalışmalarda bu yönde bir sonuç elde edilmemiştir (Shimizu ve ark., 2005).

1.7.2.3. Koronavirüs HKU1

İlk kez 2005'de bir erişkinden izole edilen koronavirüs HKU1'in, daha sonra çocuklarda da solunum yolu enfeksiyonuna yol açtığı gösterilmiştir (Woo ve ark., 2005). Üst ve alt solunum yolu enfeksiyonu yapabilen koronavirüs HKU1 Amerika'da diğer virüsler için negatif olarak saptanan solunum yolu örneklerinin %1'inde (Esper ve ark., 2006), Avustralya'da ise %3,1'inde (Sloots ve ark., 2006) pozitif olarak saptanmış, bu çocukların çoğunun iki yaşın altında olduğu görülmüştür. HKU1'e bağlı ishal ve febril nöbetler de bildirilmiştir (Vabret ve ark., 2006; Lau ve ark., 2006).

1.7.3. Replikasyon

Çoğu insan koronavirüsleri hücre kültüründe üremez, ancak 229E ve OC43 suşları bazı hücrelerde üretilebilir. Viral replikasyon influenza virusunda olduğu gibi yavaştır. Virus zarfında yer alan glikoprotein yapılar golgide, nükleoprotein yapılar ise konan hücrenin sitoplazmasında sentezlenir. Virus zarfını sitoplazma membranından alıp tomurcuklanarak hücreden ayrılır.

1.7.4. Patogenez

Koronaviruslar insanlarda sıklıkla solunum yolu enfeksiyonlarına neden olur. “Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS)” bunlara dahildir. Ayrıca nadiren enterik enfeksiyonlar ve nörolojik sendromlara neden olabilirler. Bulaşma solunum sekresyonları, fekal oral yol ve mekanik yolla olur. Virus çoğunlukla epiteliyal hücrelerde çoğalır. Ancak nadiren böbrek, karaciğer, kalp ve gözü de infekte edebilmekte ve nörolojik komplikasyonlara yol açabilmektedir. SARS, alt solunum yollarında viral pnomoniye neden olmaktadır. Koronavirus enfeksiyonları tüm dünyada ve sık görülür. Soğuk algınlığı olgularının yaklaşık %25’inde koronavirusların etken olduğu bildirilmektedir. İnfeksiyonun insidensi mevsimseldir, çoğunlukla kış aylarında görülür. Sıklıkla çocuklarda, daha az olarak yetişkinlerde rastlanır. Koronavirüslerde antijenik değişim bilinmemektedir.

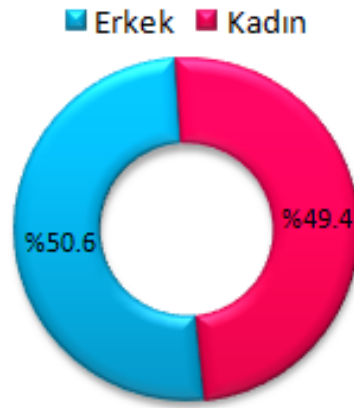
2.GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Hasta Populasyonu

Çalışmaya Kasım –Mayıs ayları arasında Afyon Kocatepe Üniversitesi Hastanesinin ve Zübeyde Hanım Doğum ve Çocuk hastanesinin; çocuk acil servisine, çocuk polikliniğine başvuran ve yatan hasta servisinde izlenen, ASYE ve ÜSYE tanıları konulan 170 hasta çalışmamıza dahil edildi. Çalışma için Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan izin alındı. Hastaların yaşı, cinsiyeti, yakınmaları ve yakınmalarının süresi, geçmişte tekrarlayan hışıltı öyküsü, evde yaşayan kişi sayısı sorgulandı. Başvuru, klinik tanı, uygulanan tedaviler, kronik rahatsızlığı olup olmadığı sorgulandı (EK 1).

2.2.Örneklerin toplanması

Çalışmamızda Kasım 2009-Mayıs 2010 tarihlerinde Afyon Kocatepe Üniversitesi Hastanesi polikliniklerine, özellikle çocuk polikliniğine/aciline ve Zübeyde Hanım Doğum ve Çocuk hastanesine solunum yolu şikayetleri ile başvuran toplam 170 hastadan (%50.6 erkek, %49.4 kadın) solunumsal viruslerinin dağılımının belirlenmesi amacı ile nazofaringeal örnekler UTM transport medium(Copan diagnostics) ile alınmış, -40°C'de muhafaza edilmiş, daha sonra örneklerden DPO™ (Dual Priming Oligonucleotide-çift astar oligonukleotid) teknolojisi kullanan multiplex RT PZR kiti RV 12 ile (Seegene Inc., Seoul, Korea) 12 adet solunumsal virus(influenza virus A ve B, insan Respiratory Syncytial Virus(RSV) A-B, rhinovirus A, parainfluenza viruses 1, 2 ve 3, human metapneumovirus, human coronavirus 229E/NL63 ve OC43, adenovirus) araştırılmıştır.



Grafik 2.1. Cinsiyet dağılımı (%)

2.3. Ekstraksiyon Aşaması

Çalışmaya başlamadan önce washing buffer B içerisine 40ml etanol eklenmiştir.

1. Örneklerden 150 µl alınarak boş ependorflara dağıtılmıştır.
2. Üzerine 250 µl Lysis buffer eklenmiştir.
3. 15sn vortexlenmiştir.
4. Oda sıcaklığında(15-25⁰C) 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
5. Ependorflara 350 µl binding buffer eklendi ve vortexlenmiştir.
6. Ependorflardaki içerisindeki karışım 2 ml'lik collection tüplere aktarılmıştır.
7. Collection tüpler 13.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
8. Collectin tüplerdeki üst kısımları atılmıştır.
9. Aynı tüplerin üzerlerine 500 µl washing buffer A eklendi ve 13.000rpm de10 dakika santrifüj edilmiştir.
10. Örnekler yeni spin kolonlara aktarılmıştır.
11. 500 µl washing buffer B eklendi ve 13.000rpm de1 dakika santrifüj edilmiştir.
12. Üst kısımlar atılıp, 13.000 rpm de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
13. Üzerlerine 50 µl Elution buffer eklenmiştir.
14. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübasyona bırakılmıştır ve 13.000 rpm de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
15. Filtreler atılıp ependorfların kapakları kapatılmıştır.

2.3.1. cDNA eldesi

Ekstarksiyon sonrasında elde edilen her bir örnek küçük ependorf tüplerine (0,1 ml lik) 11 µl olacak şekilde aktarılmıştır ve üzerlerine 1 µl Random hexamer eklenmiş ve 80 C'de 3 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra küçük ependorflar alüminyum blok üzerine alınmıştır. Alüminyum blok +4°C de muhafaza edilmiş ve çalışılacağı zaman çıkarılmıştır.

Her bir örnek için kullanılan Mix solüsyon;

4 µl 5X Buffer

2 µl dNTP

1 µl RNA inhibitör

1 µl Reverse Transkriptaz

Her bir örnek için hazırlanan mix solüsyon küçük ependorflara 8 µl olacak şekilde aktarılmıştır. Bu tüplerin üzerlerine 12 µl örnek eklenip thermal cyler konulmuştur. 37 C'de 90 dakika, 94 C'de 2 dakika bekletilmiştir. Bu yöntemle RNA, cDNA ya dönüştürülmüştür. Cihazdan çıkan tüpler soğuk spora alınmıştır.

2.3.2. PZR Aşaması

Her bir örnek için Master Mix

4 µl 5X RV15 ACE PM (A veya B)

3 µl 8-mop solution

10 µl 2X multiplex master mix

Her bir örnek için yukarıda verilenler 17 µl olacak şekilde karıştırılarak küçük ependorflara aktarılmıştır. Üzerlerine 3 µl cDNA eklenmiştir. Küçük ependorflar thermal cyler'a yerleştirilmiştir.

Tablo 2.1. Thermal cyler sıcaklık siklusu

Dilim	Siklus	Sıcaklık	Süre
1	1	94	15 dk
	40	94	0,5 dk
		60	1,5 dk
2		72	1,5 dk
3	1	72	10 dk

PZR ürünleri hazır. Elektroforez aşamasına geçilir.

2.3.3. Jel hazırlanması

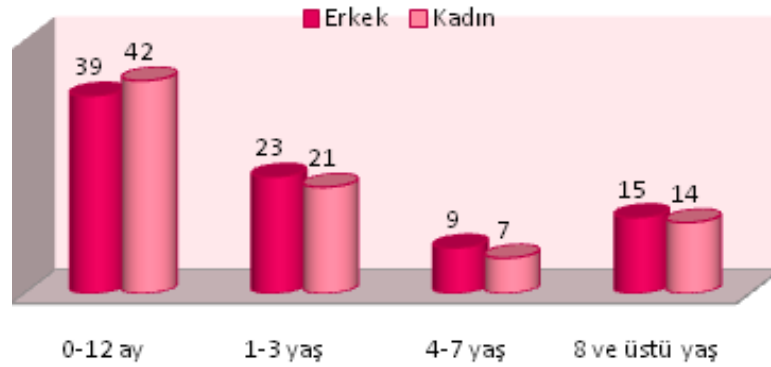
1. 1.5gr agaroz, 100 µl 10X TBE buffer bir beher içerisine alınır ve 3 dakika mikrodalgada kaynatılmıştır.
2. Biraz soğuyunca 10 µl Etidium bromid ilave edilmiştir.
3. 50°C -55°C ye kadar soğuması beklenmiştir.
4. Tarakların yerleştirilmiş olduğu tanka kabarcık oluşturmadan yavaşça dökülmüştür.
5. Tamamen donması beklenmiştir.
6. 10X TBE solüsyon elektroforez cihazının tankına doldurulmuştur.
7. Donmuş olan jelden taraklar dikkatlice çıkartılmıştır.

2.3.4. Elektroforez aşaması

1. Hazırlanmış PZR ürünlerinden 5-10 µl alınmış, jeldeki kuyucuklara pipet yardımıyla dikkatlice konulmuştur.
2. 100 V da 30-35 dakika yürütülmüştür.
3. UV stimilatörde bantlar izlenmiştir.

3. BULGULAR

AKÜ Tıp Fakültesi Uygulama Araştırma Hastanesi ve S.B. Afyonkarahisar Zübeyde Hanım Doğum Çocuk Hastanesi'ne solunum yolu şikayetleri ile başvuran 170 hastanın yaş grupları 0-12 ay, 1-3 yaş, 4-7 yaş, 8 ve üstü olarak belirlenmiştir. Hastaların yaş ve cinsiyet dağılımı grafik 3.1.'de gösterilmiştir.



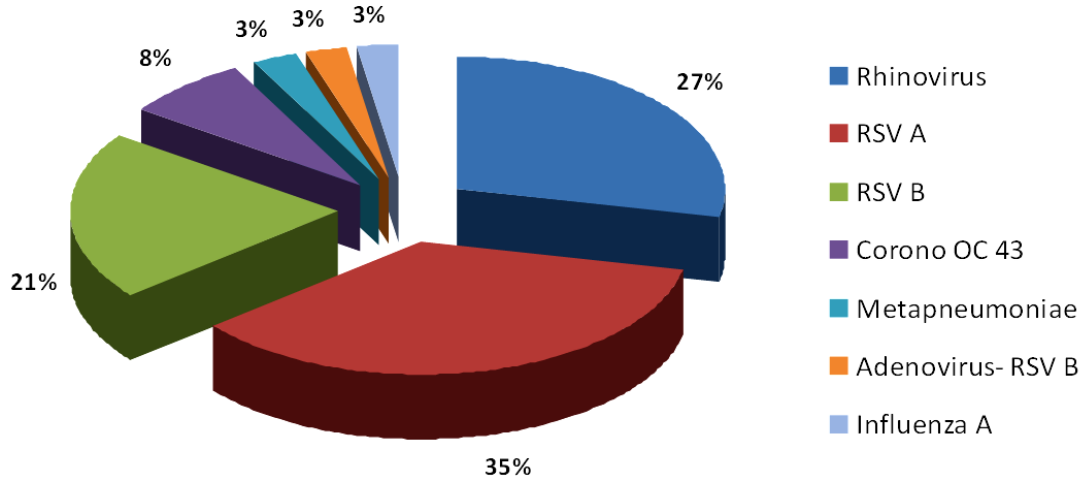
Grafik 3.1. Yaş ve cinsiyet dağılımı

İncelemeye alınan 170 hastanın nazofaringeal örneklerinden 131'inde (%77) herhangi bir viral ajan saptanamazken, 39 örnekte (%33) viral patojen identifiye edilmiştir. Cinsiyet dağılımı yaptığımızda, toplam 84 kadının 19'unda (%22.6), 86 erkeğin 20'sinde (%23.2) virus saptanmıştır (Tablo 3.1). Hastalarımızın 65 tanesi poliklinik, 105 tanesi yatan hasta olarak belirlenmiştir.

Tablo 3.1. Virusların cinsiyete göre dağılımı

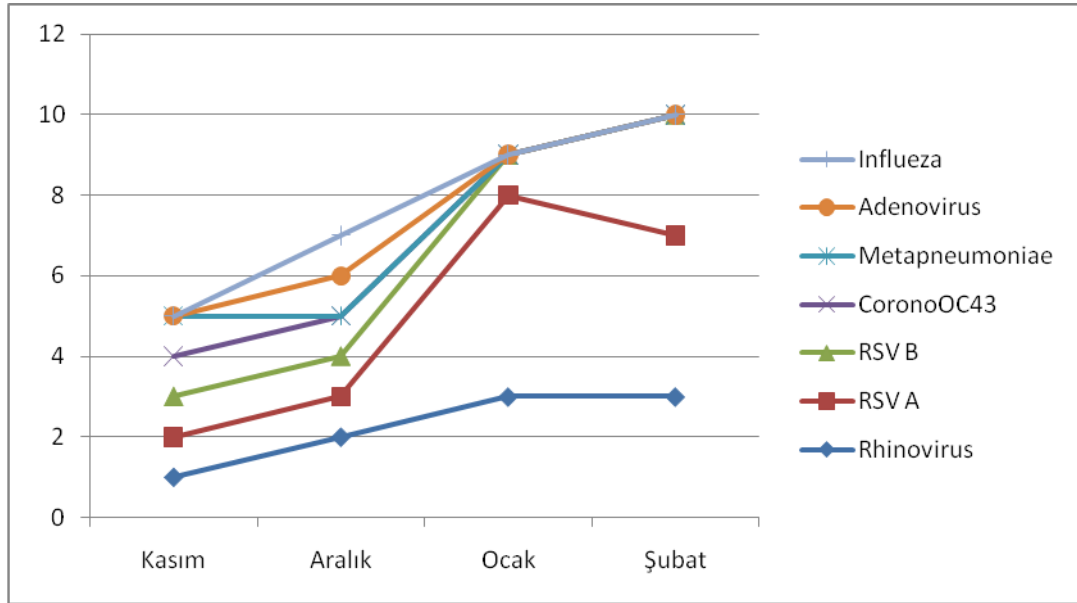
	CİNSİYET	
	KADIN	ERKEK
Rhinovirus	2	9
RSV A	10	4
RSV B	4	4
Corono OC43	1	2
Metapneumoniae	1	0
Adenovirus-RSV B	1	0
Influenza A	0	1

Alınan 170 nazofarengial sürüntü örneğinden 39 tanesi (% 22.9) multiplex PZR Yöntemi ile solunumsal viruslar açısından pozitif sonuç vermiştir. Virus dağılımı 14 (%35) RSV A, 11 (%27) Rhinovirus, 8 (%21) RSV B, 3 (%8) Corono OC43, 1 (%3) Metapneumoniae, 1 (%3) Adeno-RSV B mix, 1 (%3) influenza şeklinde bulunmuştur (Grafik 3.2).



Grafik 3.2. Solunumsal örneklerden multiplex PZR yöntemiyle saptanan viruslar

Hastaların burun tıkanıklığı, burun akıntısı nedeniyle yoğun olarak başvurduğu dönem sonbahar sonu ve kış mevsimindeki kasım, aralık ve ocak aylarıydı. Örneklerin toplandığı Kasım-Mayıs ayları arasında viruslerin en sık Aralık ve Ocak aylarında alınan örneklerden izole edildiği görüldü (Grafik 3.3).



Grafik 3.3. Saptanan virusların aylık dağılımı

Yapılan anketler doğrultusunda hastaların şikayetleri arasında burun akıntısı ve öksürük ilk sıralarda yer almaktaydı. Hırıltılı soluk alıp verme hastaların %19.4'lük bölümünün şikayetleri arasındaydı. Bunların yanı sıra ateş (%13), burun tıkanıklığı (%37.1),baş ağrısı (%6.5) şikayetleri mevcuttu (Tablo 3.2).

Tablo 3.2. Hastaların başvuru şikayetlerine göre dağılımı

Virus saptanan saptanmayan tüm hastalar	Sayı	%
Ateş		
Var	22	13
Yok	148	87.1
Öksürük		
Var	62	36.5
Yok	9	5.3
Burun akıntısı		
Var	65	38.2
Yok	3	1.8
Burun tıkanıklığı		
Var	63	37.1
Yok	6	3.5
Baş ağrısı		
Var	11	6.5
Yok	120	70.6
Hırıltılı soluk alıp verme		
Var	33	19.4
Yok	7	4.1

Influenza A (H1N1) açısından değerlendirildiğinde; 1 örnekte pozitif sonuç elde edilmiştir.

4.TARTIŞMA

Bronşiyolit, bebek ve küçük çocuklarda alt solunum yollarını tutan ve küçük hava yollarında obstruksiyonla sonuçlanan, yaygın, akut, bulaşıcı bir hastalık olarak karşımıza çıkmaktadır. Alt solunum yolu enfeksiyonlarının etiyolojisinde, çoğunlukla viral ajanlar sorumlu tutulmaktadır. Solunum sinsisyal virusu da, bütün dünyada bebek ve çocuklardaki viral alt solunum yolu enfeksiyonlarının başlıca nedenidir. Tüm viral enfeksiyonların %45-83'unu RSV enfeksiyonları oluşturmaktadır. RSV enfeksiyonunu, parainfluenza virus, influenza A ve B ve adenovirusler izlemektedir (Forgie ve ark., 1991).

Kocaeli'nde Eylül 2006 ve Mart 2007 tarihleri arasında yapılan bir araştırmada, Özel Anadolu Sağlık Merkezi Hastanesine grip belirtileriyle başvuran 100 hastada hızlı antijen testi kullanılarak, İnfluenza A ve B olarak gruplandırılan 24 kişiden 2'sinde İnfluenza virus B (%8.5), 22'sinde ise İnfluenzavirus A (%91.5) saptanmıştır (Özdamar ve ark., 2007). Akarsu ve Altoparlak'ın yaptığı çalışmada ise 171 hastanın 27'sinde (%15.8) İnfluenzavirus A, 5'inde (%2.9) İnfluenzavirus B, 7'sin- de (%4.1) Respiratory Syncytial Virus, 11 hastada (%6.4) Adenovirus, ayrıca Real Time PZR yöntemiyle de hastaların 1 tanesinde (%0.6) H5N1 antijeni belirlenmiş (Çelebi Akarsu ve Altoparlak, 2009).

Heyman ve ark.'nın yapmış olduğu çalışmada 3 yaş altındaki çocuklarda en sık etkenler RSV ve influenza iken 3-18 yaş arasında en sık rhinovirus izole edilmiştir (Heyman ve ark., 2004). Williams ve ark.'nın daha sonra aynı hasta grubuyla yaptığı çalışmada üç yaşından küçük hastalarda hMPV oranı %12.6, 3-9 yaş arasında %8.8 olarak saptanmıştır, 9-18 yaş arası hastalarda hMPV'ye rastlanmamıştır (Williams, 2005). Benzer şekilde Jartti ve ark.'nın (10) 3 ay-16 yaş arası çocuklarda yaptığı çalışmada, en sık hisiltılı etkeninin süt çocuğu döneminde RSV (%54), üç yaş ve

üzerinde ise rhinovirus (%82) olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada hMPV saptanma oranı tüm çocukluk çağında %4 iken süt çocuğu döneminde %11 olduğu görülmüştür (Williams, 2005).

Akut hışıltılı çocuklarda viral etkenlere ilişkin çeşitli yaş gruplarında yapılan bu çalışmada özellikle 0-12 aylık ve 1-3 yaş arası çocuklarda en sık karşılaşılan etkenin RSV A, sonra rhinovirus olduğu görülmüştür. Bu çalışmada 81 tane 0-12 aylık çocuk hastadan 1 tane hMPV saptanmıştır.

İnfluenza benzeri hastalığa neden olabilen etkenlerin başlıcaları influenza virusleri, parainfluenza virusleri, adenovirusler, RSV, rinovirusler, *Chlamydia pneumoniae* ve *Mycoplasma pneumoniae*'dir (Boivin ve ark., 2000). Yalnız klinik bulgulara dayanarak tanı koyabilmek her zaman mümkün olmayabilir, çünkü diğer solunum yolu virusleri benzer bulgulara yol açabilirler, ayrıca bulgular yaşa ve virus alt tipine göre değişkenlik gösterebilir (Call ve ark., 2005; Neuzil ve ark., 2002).

Diğer solunum patojenleri ile meydana gelen enfeksiyonların, İnfluenza virus enfeksiyonlarından klinik ayrımı zordur. Bu yüzden İnfluenza benzeri hastalıklı bireylerden elde edilen örneklerden, İnfluenza virusü açısından negatif bulunmuş olanların, diğer solunum viruslerini içerme olasılığı yüksektir. Coiras ve ekibi İnfluenza A, B, C, RSV ve Adenoviruslerin klinik örneklerden eş zamanlı tespiti için, nested - PZR yöntemini uygulamışlar ve RTPZR, hücre kültürü ve IFA gibi farklı yöntemlerin kombine olarak çalışılmasıyla, benzer klinik semptomlara neden olan bu viruslerin tanısının optimize edilebileceğini bildirmişlerdir (Coiras ve ark., 2005).

Erzurum Yöresinde yapılan çalışmada incelemeye alınan örnekler İnfluenza yönünden taranmış ve 1'inde (%0.6) real time PZR yöntemi ile H5N1 virusü izole edilmiş. Toplam 27 hastada (%15.8) İnfluenza A, 5 hastada (%2.9) İnfluenza B, 7 hastada (%4.1) Respiratory Syncytial virus ve 11 hastada (%6.4) Adenovirus tesbit edildiği bildirilmiştir (Çelebi Akarsu ve Altoparlak, 2009).

Önalan ve arkadaşları, 2006 yılında yaptıkları Türkiye'de 2003-2004 ve 2004-2005 yıllarında grip sürveyansı ve izole edilen İnfluenza virus suşlarının tiplendirimi isimli; ülkemizdeki grip aktivitesinin belirlenmesi amacıyla yapılan sürveyans çalışmasında, 2003-2004 yılları arasında ülkemizin dört bölgesine dağılmış toplam 12 sağlık kurumundan 37921 hastaya ait verilerin istatistiksel analizi sonucunda 11698'ne (%30.8) İnfluenza Benzeri Hastalık (IBH) tanısı konduğu belirtilmiştir. Bu hastaların toplam hastalara oranı 52. ve 2. haftalarda en yüksek değere ulaşmıştır. IBH tanısı olan hastaların yaş gruplarına göre dağılımlarına bakıldığında ise 0-4 ve 5-14 yaş gruplarına ait olguların sezonun erken dönemlerinde ilk sırayı aldıkları ayrıca bu gruptaki tanı oranlarının azalması ile >14 yaş grubunun ön plana çıktığı görülmüştür. Aynı çalışmada 2003-2004 yıllarında 91 (%44.6) İnfluenza virus A, 11 (%5.4) RSV izole edilirken bu sezonda İnfluenza virus B tespit edilememiştir. Yine bu aylara göre en yüksek izolasyon sayısına aralık (%58.9) ve ocak aylarında erişilmiştir. IBH tanısı olan hastaların yaş gruplarına göre dağılımı incelendiğinde sezonun erken döneminde 0-4 yaş gruplarına ait IBH tanılı hasta oranının yüksek olduğu, bu yaş grubu hasta sayısının düşüşe geçtiği sonraki haftalarda ise diğer yaş grubu hasta sayısının arttığı görülmektedir. 2004-2005 sezonu laboratuvar bulgularına göre ise; ülke genelinde 23 merkezden toplam 458 örnek gönderilmiş olup, 86 örnekte (%18.8) İnfluenzavirus A, 14 örnekte (%3.1) İnfluenzavirus B, 36 örnekte de (%7.9) RSV tespit edilmiştir.

İskanova ve arkadaşlarının Kasım 2005 - Şubat 2006 tarihleri arasında solunum yolu enfeksiyonu olan beş yaşın altındaki 92 çocuktan alınmış solunum örneklerinin incelenmesi sonucunda duyarlılık ve özgüllüğü nedeniyle tercih ettikleri PZR yöntemi ile 32' sinde (%34.7) virus saptamış. Bu dönemde RT-PZR ve Multiplex-RT-PZR yöntemleri ile incelenen örneklerin 22'sinde (%23,9) RSV ve 12'sinde (%13) influenza A saptanmış. Eski hasta olan çocuktan ise influenza A ile RSV birlikte elde edilmiştir (İskanova ve ark., 2008).

İskanova ve arkadaşlarının yaptığı çalışma sonucuna göre beş yaşın altındaki çocuklarda solunum hastalıkları viral etkeni olarak en sık HRSV olduğu ve ikinci sıklıkla influenza A virusu olduğu görülmektedir (İskanova, 2008). Türkiye'nin de

çeşitli bölgelerinde solunum yolu enfeksiyonlarının viral etkenlerinin sıklığını araştırmaya yönelik birçok çalımsalar yapılmıştır. Yılmaz ve arkadaşlarının, İstanbul'da yaptığı iki dönemde yürütülen çalışmada akut bronşiyolitli bebeklerden alınan nazofarengeal sekresyonlarında HRSV %35 ve %39 oranında saptanmıştır (Yılmaz ve ark., 2005). Kanra ve arkadaşlarının, 2000 - 2002 yılları arası Ankara'da yapılan çok merkezli diğer bir çalışmada, 24 ay altında ve alt solunum yolu enfeksiyonu bulgularıyla yatırılan riskli bebeklerde EIA Abbott TestPack hızlı tanı testi ile RSV % 29.5 olarak saptanmıştır (Kanra ve ark., 2005). Bursa'da gerçekleştirilen çalışmada da ilk altı ay içindeki bebeklerde saptanan akut bronşiyolitli hastaların yarısında etken olarak RSV saptanmıştır (Hacımustafaoğlu ve ark., 2004).

Viral solunum yolu etkenleri, hastane enfeksiyonlarında da önemli etkenler arasındadır. Hollanda'da yoğun bakım servisinde yatan bebeklerde enfeksiyonlara neden olabilecek virusları saptamak amacı ile yapılan 12 yıllık bir çalışmada, toplam 5396 hasta bebekten 51'sinde (%1) pozitiflik saptanmış, pozitiflik saptanan 51 örnekten 20'sinde (% 39) enterovirus ve parechovirus, ikinci sıra ile 15'sinde (% 29) HRSV, besinde (%10) rotavirus, üçünde (%6) CMV, ikisinde (%4) parainfluenza, ikisinde (%4) HSV, birinde (%2) rhinovirus ve birinde de (%2) kızamıkçık virusu bulunmuştur (Verbon ve ark., 2005). Bulaş büyük damlacıklarla veya kontamine sekresyonlarla olur. Hastanelerde personele ve diğer hastalara geçmemesini önlemek önemlidir. Özellikle altta yatan ciddi hastalıkları olan kalp veya pulmoner rahatsızlığı olanlarda, immun yetersizliği olanlarda ciddi alt solunum yolu hastalıkları gelişebilir. Ayrıca yastan ve kisiden bağımsız risk faktörleri de vardır: sosyoekonomik durum, kalabalık yaşam ortamları, anne sütü ile beslenmeme ya da bulunduğu ortamda sigara içimi öyküleri gibi (64, 73).

Solunum yolu hastalıkları etkeni viruslar hem sağlıklı kişilerde hem bağışıklık yetersizliği olanlarda mikst enfeksiyonlara yol açabilirler. Birden fazla etkeni olan bu tür enfeksiyonlarda çoğunlukla influenza ile HRSV birlikte görülmektedir (LINA ve

ark., 1996; Waner,1999; Yılmaz ve ark., 1999). Bizim çalışmamızda da 1 tane mikst etken olarak Adenovirus-RSV B saptandı.

Akut solunum yolu enfeksiyonlarında laboratuvar incelemelerinde öncelikle RSV, HPIV-2 ve 3 influenza A ve B (IFAV ve IFAVB) araştırılmaktadır. Bu etkenlere ek olarak bakteriler de araştırıldığında ancak %30- 60 olguda etken belirlenebilmektedir. Bu etkenin saptanamadığı grupta da günümüzde moleküler yöntemlerle yeni viruslar araştırılmakta ve bulunmaktadır. Viral enfeksiyonların laboratuvar tanısında hücre kültürü, direkt antijen tayini, genomun moleküler yöntemlerle tayini ve serolojik yöntemlerle özgül antikorların tayini kullanılmaktadır. Solunum yolu enfeksiyonlarının tanısında spesifik antikor tayini epidemiyolojik amaçlarla kullanılmaktadır. Antijen tayini en az duyarlı yöntemdir. Hücre kültürü duyarlılığı ve özgüllüğü çok iyidir. Ancak emek yoğun ve donanımlı bir laboratuvar gereklidir. Günümüzde viral solunum yolu enfeksiyonlarının duyarlı ve özgül tanısında giderek artan sıklıkla moleküler yöntemler tercih edilmektedir (Arden ve ark., 2006; Geretti, 2003; İlhan ve ark., 2005).

Sonuç olarak viruslarla oluşan solunum viral enfeksiyonlarının önleminde moleküler epidemiyolojinin önemi giderek artmaktadır. PZR metodu ile viral solunum yolu enfeksiyonu etkenlerini araştırmada örneklerin uygun olmayan şartlarda ve taşıma sıvılarında laboratuvara ulaştırılması veya uygun olmayan ısı derecesinde saklanması viral genomun yapısını bozmaktadır (Murray ve ark., 2005; Ustaçelebi, 1999). İşte bu yüzden örneğin uygun yöntemle alınıp, taşıma sıvılarında zamanında laboratuvara ulaştırılması ve muhafaza edilmesi gerekmektedir. Çalışmamızda nazofaringeal sürüntü örnekleri alındı, uygun transport besiyerine inoküle edildi ve -40°C’de muhafaza edildi.

Viral enfeksiyonların tanısında virus tayinini etkileyen faktörlerden biri de örneğin zamanında ve uygun yöntemle alınmasıdır. Solunum yolu enfeksiyonlarında viral atılım özellikle ilk üç gün yoğun olmaktadır, işte bu yüzden enfeksiyonun erken döneminde alınan örnekler tercih edilmelidir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Hastaların %33'ünde solunum yolu viruslarından en az bir etken virus izole edilmiştir.
2. Çalışmamızdaki viral patojen saptama oranının düşük olması, örneklerin transportu ve saklanması sırasındaki aksaklıklardan kaynaklanmış olabilir.
3. Ateş ile beraber öksürük, burun akıntısı, göz akıntısı ve döküntü gibi şikayetlerle başvuran hastaların büyük çoğunluklarda viral enfeksiyon saptanmış.
4. Çalışmaya aldığımız virusların çalışma sırasında oluşan herhangi hata nedeniyle RNA miktarlarındaki azalma yalancı negatifliğe yol açmış olabilir.
5. Bakteriyel etkenlerin ekarte edilmesi ardından viral ajanların da hızlı tanısı gerek epidemiyoloji ve gerekse hastanın sağlığına kavuşması açısından oldukça önemlidir. Örneklerin uygun bir şekilde alınması ve saklama koşullarına dikkat edilmesi gerekmektedir.
6. Tanı testlerinin hızlı, özgül ve duyarlı olması da tanının bir an önce ve doğru konulması adına oldukça önemli olacaktır.
7. Etkenlerin mevsimsel dağılımlarının bilinmesi, alınması gereken önlemler ve tedavideki farklılıkları açısından anlamlıdır.
8. Multiplex PZR metodunun çocuklarda respiratuvar viral patojenlerden kaynaklanan solunum yolu enfeksiyonlarının tanısında oldukça hızlı ve güvenilir yöntem olduğu, hücre kültürü gibi standart laboratuvar metotlarına göre daha kısa sürede ve daha spesifik sonuç vermesi, PZR yönteminin rutin uygulamada kullanılmasının gerekliliğini düşündürmektedir.

ÖZET

Solunumsal patojen viruslar ve İnfluenza A H1N1(Domuz Gribi)'nin Multiplex PZR Yöntemleri ile Tanısı

Viral solunum yolu enfeksiyonlarının hızlı, kesin tanısı ve zamanında tedavi girişimlerin sağlanması açısından önemlidir. Bu çalışmamızda solunumsal virusların dağılımının belirlenmesi amacı ile örneklerden DPO™ (Dual Priming Oligonucleotide-çift astar oligonukleotid) teknolojisi kullanan multiplex RT PZR kiti RV 12 ile (Seegene Inc., Seoul, Korea) 12 adet solunumsal virus(influenza virus A ve B, insane Respiratory Syncytial Virus(RSV) A-B, rhinovirus A, parainfluenza viruses 1, 2, ve 3, human metapneumovirus, human coronavirus 229E/NL63 ve OC43, adenovirüs) araştırılmıştır.

Kasım 2009- Mayıs 2010 tarihleri arasında, 170 örnek UTM transport medium(Copan diagnostics) ile alındı. Test edilinceye kadar -40°C'da saklandı. Bazı örnekler QuickVue® İnfluenza A + B flu Dipstick kiti ile A ve B yönünden test edildi. Donmuş örneklerden 12 solunumsal virusun tespiti için mRT-PZR (Seplex® RV detection kit, SeeGene, Seoul, Korea) uygulandı.

mRT-PZR 3 koenfekte olgu dahil 39 hastada (% 33), içinde etken virüsler tespit edildi. RSV A / B (% 35 % 21), influenza A / B (% 3), insan metapneumovirus (% 3), adenovirüs-RSV B (% 3), rinovirüs (% 27) ve coronavirüs OC43 (% 3). İnfluenza A, daha sonra referans laboratuvarlarında H1N1 olarak teyit etti.

Multiplex PCR metodunun çocuklarda respiratuvar viral patojenlerden kaynaklanan solunum yolu enfeksiyonlarının tanısında oldukça hızlı ve güvenilir yöntem olduğu anlaşılmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Solunumsal viruslar, Multiplex RT PZR, İnfluenza A/B, RSV, Adenovirus, rinovirus

SUMMARY

Identification of respiratory pathogen viruses and Influenza A H1N1 (Swine flu) by multiplex PCR assay

Rapid and accurate diagnosis of viral respiratory infections is important for providing timely therapeutic interventions. This study evaluated a new multiplex PZR assay (Seegene Inc., Seoul, Korea) for simultaneous detection and identification of 12 respiratory viruses using two primer mixes. The viruses included parainfluenza viruses 1, 2, and 3, human metapneumovirus, human coronavirus 229E/NL63 and OC43, adenovirus, influenza viruses A and B, human respiratory syncytial viruses (RSV) A and B, and human rhinovirus A. The aim of the study is to describe the epidemiological and clinical characteristics of acute viral respiratory infection in hospitalised Turkish children and few adults, Afyon/Turkey.

One hundred-seventy patient samples (nasopharyngeal swabs) were collected with flocked swabs and transported in UTM (Copan diagnostics) from November'2009 to May'2010. These were frozen to -40°C before being shipped on dry ice for batch testing. Some of the samples tested with the QuickVue[®] Influenza A + B flu Dipstick in terms of A and B. mRT-PZRs for the detection of 12 respiratory viruses (Seeplex[®] RV detection kit, SeeGene, Seoul, Korea) were tested with frozen specimens.

mRT-PZR detected causative viruses in 39 patients (33%), including 3 co-infected cases. A total of 39 viruses were identified: RSV A/B (35% 21%), influenza virus A/B (3%), human metapneumovirus (3%), adenovirus- RSV B (3%), rhinovirus (27%), and coronavirus OC43 (3%). One of influenza A, confirmed as H1N1 in the reference laboratory later.

Multiplex PCR method in the diagnosis of respiratory tract infections in children caused by respiratory viral pathogens is understood that the method is very fast and reliable.

Key words: Respiratory viruses, Multiplex RT PZR, Influenza A/B, RSV, Adenovirus, rhinovirus

KAYNAKLAR

- ADVISORY COMMITTEE ON IMMUNIZATION PRACTICES (ACIP) (2004): Prevention and control of influenza. MMWR 53(RR06); 1-40.
- A. DÜRDAL (2010).Us Pandemik influenza enfeksiyonunda etyopatogenez ve laboratuvar tanı yöntemleri *Hacettepe Tıp Dergisi* , **41**:13-27
- AKCAY M., CİBLAK, HASOKSUZ M., ESCURET V, VALETTE M, GUL F, YILMAZ H, TURAN N, BOZKAYA E, VE BADUR S. (2009). Surveillance and Oseltamivir Resistance of Human Influenza A Virus in Turkey During the 2007–2008 Season 1Istanbul Faculty of Medicine, Department of Microbiology and Clinical Microbiology, Istanbul University
- AKTAŞ F, ULUTAN F, ARTUK Ç ve ark.(1990). Hastane personelinde bir influenza epidemisi. Mikrobiyoloj, Bült ; 24-344
- ALYMOVA I. V., KODIHALLI S., GOVORKOVA E. A., FANGET B, Gerdil C., WEBSTER R. C., (1998) Immunogenicity and Protective Efficacy in Mice of Influenza B Virus Vaccines Grown in Mammalian Cells or Embryonated Chicken Eggs, *J of Virol.*, **72(5)**, 4472-77.
- APPLEBY T. C., LUECKE H., SHIM J. H., (2005) Crystal Structure of Complete Rinovirus RNA Polymerase Suggests Front Loading of Protein Primer. *J Virol.* **79(1)**, 277-288.
- ARIAS CF, ESCALERA-ZAMUDIO M, SOTO-DEL RIO MD, COBIAN-GUEMES AG, ISA P, LOPEZ S. (2009). Molecular anatomy of 2009 influenza virus A (H1N1). *Arch Med Res*; 40: 643-654
- ARMSTRONG D, COHEN J. INFECTIOUS DISEASES. LONDON (1999): Harcourt Publishers Ltd, Volume 2, :8.9-11.
- ASLAN S. VE YILMAZ, G. (2001). Akut solunum yolu enfeksiyonlu çocuklarda adenovirus enfeksiyonu insidansının saptanması. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi., **31 (3- 4)**; 242-244.
- AYMARD M, VALETTE M, LINA B, TAUVEN (1999). Surveillance and Impact of Influenza in Europe. *Vaccine*, 17: 30-41.
- BADUR S.(2007). İnsanlarda kuş gribi tanısı. *Flora*,**12**:22-25.
- BELSHE RB, MUFSON MA. (1991). Text book of human virology. 2th Ed., St. Luis: Mosby Year Book,,388-407.
- BOIVIN G, COTE S, DERY P, DE SERRES G, BERGERON MG(2004). Multiplex real-time PZR assay for detection of influenza and human respiratory syncytial viruses. *J Clin Microbiol*, **42**: 45-51
- BOIVIN G, HARDY I, TELLIER G, MAZİADE J.(2000). Predicting influenza infections during epidemics with use of a clinical case definition. *Clin Infect Dis*, **31**: 1166-9.

- BOIVIN G., COTE S., DE SERRES G., GILDA R., BERGERON MG., DERY P. (2003). Role of human metapneumovirus and other common respiratory viruses in children's hospitalization for acute respiratory tract infection: a two-year study using multiplex PZR [abstract V-478]. In: Program and abstracts of the 43rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (Chicago). Washington, DC: *American Society for Microbiology*, 491.
- BOIVIN, G., ABED, Y., PELLETIER, G., RUEL, L., MOISAN, D., COTE, S., PERET, T.C., ERDMAN, D.D. AND ANDERSON, L.J., (2002). Virological features and clinical manifestations associated with human metapneumovirus: a new paramyxovirus responsible for acute respiratory-tract infections in all age groups. *J. Infect. Dis.*, **186** (9):1330–1334.
- BOZKAYA E.(2006). Parainfluenza, adeno, korona ve rinoviruslar İstanbul Tıp Fakultesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ANKEM Derg , **20**(Ek 2):248-253
- CALL SA, VOLLENWEIDER MA, HORNUNG CA, SIMEL DL, MCKINNEY WP.(2005). Does this patient have influenza? *JAMA* , **293**: 987-997.
- CANE PA, MATTHEWS D, PRINGLE CR.(1994). Analysis of respiratory syncytial virus strain variation in successive epidemics in one city. *J Clin Microbiol*, **32**:1-3.
- CANE PA, PRINGLE CR.(1995). Molecular epidemiology of human respiratory syncytial virus. *Sem in Virology*, **6**:371-372.
- CARBALLAL, G., VIDELA, C., MISIRLIAN, A., REQUEIJO, P.V. AND AGUILAR, C.M. (2002). Adenovirus type 7 associated with severe and fatal acute lower respiratory infections in Argentine children. *BMC Pediatrics*, **2**:6.
- CENTERS FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION. GUIDELINE FOR HAND HYGIENE IN HEALTHCARE SETTINGS.(2002). Recommendations of the Health Care Infections Control Practises Advisory Committee. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, **51**:1.
- CHANG LY, SHIH SR, SHAO PL, HUANG DT, HUANG LM. (2009). Novel swine-origin influenza virus A (H1N1): the first pandemic of the 21st century. *J Formos Med Assoc*, **108**:526-32.
- CHOTPITAYASUNONDH T, UNGCHUSAK K, HANSHAOWORAKUL W et al (2005). Human disease from Influenza A (H5N1) Thailand, 2004. *Emerg Infect Dis*; **11**:201-209
- COIRAS MT, PEREZ-BRENA P, GARCIA ML, CASAS I.(2003). Simultaneous detection of influenza A, B, and C viruses, respiratory syncytial virus, and adenoviruses in clinical samples by multiplex reverse transcription nested-PZR assay. *J Med Virol* **69**:132-144.
- COLLINS PL, MCINTOSH K, CHANOCK RM. (1996). Respiratory syncytial virus. In: *Fields Virology*. Eds: Fields BN, Knipe DM, Howley PM. Third edition. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia,,1313-1351.
- Conditions.(1964) *Br J Exp Pathol*, **45**:647-655.
- CONZELMANN K. K., (1998). Nonsegmented Negative-Strand RNA Viruses: Genetics and Manipulation of Viral Genomes. *Annual Review of Genetics*, **32**:123-62.

- CROWE J. E., (2004) Human metapneumovirus as a major cause of human respiratory tract disease. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **23(11)**:215-221.
- DAVIES HD, MATLOW A, PETRIC M, GLAZIER R, WANG EE. (1996). Prospective comparative study of viral, bacterial and atypical organisms identified in pneumonia and bronchiolitis in hospitalized Canadian infants. *Pediatr Infect Dis J.*, **15**:371-75.
- DENIZLI and et al (1994). Collagen and fibronectin immobilization on phema microcarriers for hepatocyte attachment. *International Journal of Artificial Organs*; **12**: 311-322.
- DENNY F. H., MURPHY T. F., CLYDE W. A., COLLIER A. M. JR., HENDERSON F. W. (1983) Croup: an 11-year study in a pediatric practice. *Pediatrics*, **71**:871-876.
- DURMAZ, R. (2001). Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
- ESPER F, WEIBEL C, FERGUSON D, LANDRY ML, KAHN JS (2006). Coronavirus HKU1 infection in the United States. *Emerg Infect Dis*; **12**: 775-779.
- FALSEY A. R., ERDMAN D., ANDERSON L. J., WALSH E. E. (2003). Human metapneumovirus infections in young and elderly adults. *J Infect Dis*, **187**: 785-90.
- FURUSE Y, SUZUKI A, KISHI M, NUKIWA N, SHIMIZU M, SAWAYAMA R, FUJI N, OSHITANI H. Occurrence of mixed populations of influenza A viruses that can be maintained through transmission in a single host and potential for reassortment. *J Clin Microbiol* 2010; **48**: 369-374
- FIELDS BN, KNIPE DM, HOWLEY PM (1996). *Fundamental Virology*. 3th Ed., Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 577-604.
- FORGIE IM, O'NEILL KP, LLOYD-EVANS N, LEINONEN M, CAMPBELL H, WHITTLE HC, GREENWOOD BM. (1991). Etiology of acute lower respiratory tract infections in Gambian children: Acute lower respiratory tract infection in children ages one to nine years presenting at the hospital. *Pediatr Infect Dis*, **10**:42-47.
- FREYMUTH F, EUGENE G, VABRET A, PETITJEAN J, GENNETAY E.(1995). Detection of respiratory syncytial virus by reverse transcription-PZR and hybridization with a DNA enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol* , **33(12)**: 3352-3355.
- GAGNEUR A, SIZUN J, VALLET S, LEGR MC, PICARD B, TALBOT PJ (2002). Coronavirus-related nosocomial viral respiratory infections in a neonatal and paediatric intensive care unit: a prospective study. *J Hosp Infect*; **51**: 59-64.
- GARCIA O, MARTIN M, DOPAZO J, ARBIZA J, FRABASILE S, RUSSI J, HORTAL M, PEREZ-BRENA P, MARTINEZ I, GARCIA-BERRENO B.(1994). Evolutionary pattern of human respiratory syncytial virus (subgroup A): cocirculating lineages and correlation of genetic and antigenic changes in the G glycoprotein. *J Virol*, **68**:5448-5449
- GARTEN RJ, DAVIS CT, RUSSELL CA, SHU B, LINDSTROM S, BALISH A, et al.(2009). Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science*, **325**:197-201.

- GERENSILL J, MCNAMARA PS, DOVE W, FLANAGAN B, SMYTH RL, HART CA. (2003). Human metapneumovirus in severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Emerg Infect Dis.*, **9**: 372-375.
- GINOCCHIO CC, ZHANG F, MANJI R, ARORA S, BORNFREUND M, FALK L, et al. Evaluation of multiple test methods for the detection of the novel 2009 influenza A (H1N1) during the New York City outbreak. *J Clin Virol* 2009; 45:191-5
- GLEZEN, W. P., FRANK A. L., TABER L. H., KASEL J. A.. (1984) Parainfluenza virus type 3: seasonality and risk of infection and reinfection in young children. *J. Infect. Dis.* **150**, 851-857.
- GORDON SM.(2009). Update on 2009 pandemic influenza a (h1n1) virus. *Cleve Clin J Med* , 76:577-82.
- GROOTHIUS JR, SÍMOES EA, LEVIN MJ, HALL CB, LONG CE, RODRIGUEZ WJ, ARROBIO J, MEISSNER HC, FULTON DR, WELLIVER RC, (1993) et al. Prophylactic administration of respiratory syncytial virus immunoglobulin to high risk infants and young children. The respiratory syncytial virus immune globulin study group. *N Engl J Med*,**329(21)**:1524-1530.
- GUAN Y, ZHENG BJ, HE YQ. (2003). Isolation and characterization of viruses related to the SARS Coronavirus from animals in southern China. *Science.*, **302**: 276-278.
- HACIMUSTAFAOĞLU M, CELEBİ S, AYNACI E et a.(2004). The progression of maternal RSV antibodies in the offspring, *Arch Dis Child*, **89(1)**:52-53.
- HALL C, GEIMAN J, DOUGLAS RG. (1980). Possible transmission by fomites of respiratory Syncytial virus. *J Infect Dis*, **141**:98-102
- HALL CB, DOUGLAS RG. (1981). Modes of transmission of respiratory syncytial virus. *J Pediatr*, **99(1)**:100-103.
- HAMBLING M. Survival of the respiratory syncytial virus during storage under various
- HAMELIN M., ABED Y., BOLVIN G., (2004) Human Metapneumovirus: A New Player among Respiratory Viruses. *Clinical Infectious Disease*, **38**: 983-90.
- HANCOCK K, VEGUILLA V, LU X, ZHONG W, BUTLER EN, SUN H, et al.(2009). Cross-reactive antibody responses to the 2009 pandemic H1N1 influenza virus. *N Engl J Med* **361**:194552.
- HAY JW, ERNST RL, MEISSNER HC (1996). Respiratory syncytial virus immune globulin: a cost effectiveness analysis. *Am J Man Care*, **2**:851-861.
- HEIKKINEN T., MARTTILLA J., SALMI A. A., RUUSKANEN O., (2002) Nasal Swab versus nasopharyngeal Aspirate for Isolation of Respiratory Viruses. *J Clin Microbiol*, **40(11)**:4337-39.
- HENRICKSON KELLY J, RAY RANJIT, BELSHE ROBERT. PRINCIPLES AND PRACTICE OF INFECTIOUS DISEASES (1995). In: Gerald L. Mandell, John E (eds). Bennet, Raphael Dolin: parainfluenzaviridae,1489-1496.

- HEYMANN PW, CARPER HT, MURPHY DD.(2004). Viral infections in relation to age, atopy, and season of admission among children hospitalised for wheezing. *J Allergy Clin Immunol* , **114**: 239-47.
- HIERHOLZER J. C., BINGLAM P. G., COOMBS R. A., JOHANSSON K. H., ANDERSON L. J., AND HAÏONEN P. K., (1989) Comparison of monoclonal antibody timeresolved fluoroimmunoassay with monoclonal antibody capture-biotinylated detector enzyme immunoassay for respiratory syncytial virus and parainfluenza virus antigen detection. *J. Clin. Microbiol*, **27**: 1243-1249.
- HURT AC, BAAS C, DENG YM, ROBERTS S, KELSO A, BARR IG. (2009). Performance of influenza rapid point-of-care tests in the detection of swine lineage A(H1N1) influenza viruses. *Influenza Other Respi Viruses* , **3**:171-6.
- IGARASHI M, ITO K, YOSHIDA R, TOMABECHI D, KIDA H, TAKADA A.(2010). Predicting the antigenic structure of the pandemic (H1N1) 2009 influenza virus hemagglutinin. *PLoS One*, **5**(1):e8553.
- IMPACT RSV STUDY GROUP. Palimizuvab, a humanized respiratory syncytial virus monoclonal antibody, reduced hospitalization from respiratory syncytial virus.
- ITOH Y, SHINYA K, KISO M, WATANABE T, SAKODA Y, HATTA M, MURAMOTO Y, TAMURA D, SAKAI-TAGAWA Y, NODA T, et al. (2009). In vitro and in vivo characterization of new swine-origin H1N1 influenza viruses, **460**:1021-5.
- INFECTION IN HIGH-RISK INFANTS (1998). *Pediatrics*,; **102**:531-537.
- ISKANOVA B. (2008). Beş yaşın altındaki çocuklarda ve bağışıklık immun sistemi baskılanmış kişilerde solunum yolu enfeksiyonlarının viral etkenlerinin araştırılması. Doktora tezi.
- JOHNSON S, OLIVER C, PRINCE GA, HEMMING VG, PFARR DS, WANG SC, DORMITZER M, O'GRADY J, KOENIG S, TAMURA JK, WOODS R, BANSAL G, COUCHENOUR D, TSAO E, HALL WC, YOUNG JF. (1997). Development of a humanized monoclonal antibody with potent in vitro and in vivo activity against respiratory syncytial virus. *J Infect Dis*,**176**(5):1215-1224.
- KANRA G, TEZCAN S, YILMAZ G AND TURKISH NATIONAL RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS (RSV) TEAM: Respiratory Syncytial Virus epidemiology in Turkey, *Turk J Pediatr* 2005; **47** (4); 303-8.
- KARRON RA, FROELICH JL, BOBO L, BELSHE RB, YOLKEN RH (1994): Rapid detection of parainfluenza virus type 3 rna in respiratory specimens use of reverse transcription PZR-enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol*, **32**(2):484-488.
- KATZ J, HANCOCK K, VEGUILLA V, ZHONG W, LU XH, SUN H, et al.(2009). Serum Cross-Reactive Antibody Response to a Novel Influenza A (H1N1) Virus After Vaccination with Seasonal Influenza Vaccine, **58**:521-4.
- KIM, R. M., LEE, R. H. AND LEE, M. G. (2000). Epidemiology of acute viral respiratory tract infections in korean children. *Journal of infection*, **41**(2); 152-158

- KILLBOURNE ED. Perspectives on pandemics: A research agenda. *J Infect Dis* 1997; 176 (Suppl 1): S 29
- KOSKENVUO M, MOTTONEN M, RAHALA J, SAARINEN-PIHKALA U M, RIIKONEN P, WARIS M et al. Mixed Bacterial-Viral Infections in Septic Children With Leukemia. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 2007; 26: 1133-1136.
- LA. VIA. W, MARKS MI, STUTMAN HR (1992). Respiratory syncytial virus puzzle: clinical features, pathophysiology, treatment and prevention. *J Pediatr*; **121**:503-510.
- LANGEDIJK JPM, BRANDENBURG AH, MIDDEL WGJ, OBSTERHAUS AB, MELOEN RH, OIRSCHOT JT (1997). A subtype-specific peptide-based enzyme immunoassay for detection of antibodies to the G protein of human respiratory virus is more sensitive than routine serological tests. *J Clin Microbiol*, **35**:1656-1660.
- LANGLEY JM, LEBLANC JC, WANG EE, LAW BJ, MCDONALD NE, MITCHELL I, STEPHENS D, MCDONALD J, BOUCHER FD, DOBSON S. (1997). Nasocomial respiratory syncytial virus in canadian pediatric hospitals a Pediatric Investigators Collaborative Network on Infections in Canada study. *Pediatrics*, Dec, **100(6)**:943-946.
- LAU SK, WOO PC, YIP CC (2006), et al. Coronavirus HKU1 and other Coronavirus infections in Hong Kong. *J Clin Microbiol*, **44**: 2063-2071.
- LENNETTE E H., EDITOR. (1992) Laboratory diagnosis of viral infections. New York, N.Y: Marcel Dekker.
- LEVY BT, GRABER MA.(1997). Respiratory syncytial virus infection in infants and young children *J Fam Pract*, **45**:6,437-481.
- LI J., CHEN S., EVANS D. H., (2001) Typing and Subtyping Influenza Virus Using DNA Microarrays and Multiplex RT-PZR. *J Clin. Microbiol*, **39(2)**: 696-704.
- LINA B, VALETTE M, FORAY S, LUCIAN S, STAGNARA S, SEE D M, AYMARD M: Surveillance of community- acquired viral infections due to respiratory viruses in Rhone- Alpes (France) during winter 1994 to 1995, *J Clin Microbiol* 1996 .34: 3007.
- LIN, B., VORA, G.J., THACH, D., WALTER, E., METZGAR, D., TIBBETTS, C. AND STENGER, D. A. (2004). Use of oligonucleotide microarrays for rapid detection and serotyping of acute respiratory disease-associated adenoviruses. *Journal of Clinical Microbiology*, **42**; 3232-3239.
- LIOU YS, BARBOUR SD, BELL LM, PLOTKIN SA (1987). Children hospitalized with influenza B infection. *Pediatr Infect Dis J*, **6**: 541-543
- MENDOZA SÁNCHEZ MC, RUIZ-CONTRERAS J, VIVANCO JL, FERNÁNDEZ-CARRIÓN F, BARO FERNÁNDEZ M, RAMOS JT et al, Respiratory virus infections in children with cancer or HIV infection. *Journal of Pediatric Hematology Oncology*. 2006;28: 154-159.

- CARROLL KC, BUTEL JS, MORSE SA (eds).(2007). *Adelberg's Medical Microbiology*. 24th ed. USA: Mc Graw Hill, 533-45.
- HALL CB. Respiratory Syncytial Virus. In: *Principles and Practice of Clinical Virology*.Eds: Zuckerman AJ, Banatvala JE, Pattison JR. John Wiley and Sons, Chichester. 1994:270-272.
- LJUNGMAN C. A., GLEAVES C. A., MEYERS J. D.(1989). Respiratory virus infection in immunocompromised patients. *Bone Marrow Transplant.*, **4**: 35- 40.
- MAGGI F., PIFFERI M., VATTERONI M., (2003) Human Metapneumovirus Associated with Respiratory Tract Infections in a 3-year Study of Nasal Swabs from Infants in Italy. *J. Clin. Microbiol.*, **41(7)**:2987-91.
- MAKELA M. J., PUHAKKA T., RUUSKANEN O. (1998). Virus and Bacteria in the Etiology of the Common Cold. *J. Clin. Microbiol.*, **36(2)**:539–542.
- MANDEL GL, BENNETT JE, DOLIN R, MANDELL DOUGLAS AND BENNET'S (1995). *Principles and practice of infectious diseases* 4th Ed. United States of America: Churchill Livingstone Inc,1501-1519.
- MCADAM, A. J., HASENBEIN M. E., FELDMAN H. A., COLE S. E., OFFERMAN J. T., RILEY A. M., AND LIEU T. A.. (2004) Human metapneumovirus in children tested at a tertiary-care hospital. *J. Infect. Dis.*, **190**:20-26.
- Morens DM, Taubenberger JK, Harvey HA, Memoli MJ. The 1918 influenza pandemic: lessons for 2009 and the future. *Crit Care Med* 2010; 38[Suppl.]: e10-e20
- MURRAY P R, ROSENTHAL K S, PFALLER M A. *Medical Microbiology*. 5th ed. Philadelphia. ASM press 2005.
- NEUZIL KM, ZHU Y, GRIFFIN MR, et al.(2002). Burden of interpandemic influenza in children younger than 5 years: a 25-year prospective study. *J Infect Dis*, **185**: 147-52.
- NICHOLSON K. G., KENT J., HAMMERSLEY V., CANCIO E. (1996) Risk factors for lower respiratory complications of Rinovirus infections in elderly people living in the community: prospective cohort study. *BMJ*, **313**: 1119–1123.
- NOYOLA DE, CLARK B, O'DONNELL FT, ATMAR RL, GREER J, DREMMLER GJ (2000). Comparison of a new neuraminidase detection assay with an enzyme immunoassay, IFA, and culture for rapid detection of influenza A and B viruses in nasal wash specimens. *J Clin microbiol.*, **38**: 1161-116.
- OGILVIE M. (2001). Molecular techniques should not now replace cell culture in diagnostic virology laboratories *Rev in Med Virology*, **6**: 351-354.
- OGRA PL. RSV (2004). The virus, the disease and the immun response. *Ped Res Rev.*;5 (suppl A), 119-126.
- OSTERHOLM MT. (2005). Preparing for the next pandemic. *N Engl J Med.*, **352**:1839-1842.

- ÖZDAMAR M, TÜRKOĞLU S, HAKKO E, TAHMAZ EF(2007). İstanbul ve Kocaeli'nde Influenza prevalansnnnn hnzln antijen testi ile belirlenmesi. ANKEM Derg, **21**:51-52.
- PACHUCKI CT (2005). Rapid tests for influenza. *Curr Infect Dis Rep*, **7**: 187-192.
- PAES BA.(2003). Current strategies in the prevention of respiratory syncytial virus disease. *Paediatr Respir Rev*, **4**(1):21-27.
- PANNİTCH HB, CALLAHAN CW, SCHİDLOV DV. (1993). Bronchiolitis in children *Clin Chest Med.*, **14**(4):715-729.
- PEDİYATRİK AKCİĞER HASTALIKLARI ÇALIŞMA GRUBU (2002). Toraks Derneği Akut Bronsiyolit Tanı ve Tedavi Rehberi. *Toraks Dergisi.*, 3(ek 3):35.
- POOT AND ET AL (1992). Dependence of endothelial cell growth on substrate-bound fibronectin. *Clinical Materials*, **11**:151-155
- RAPHAEL GD, BARANJUK JN, KALINER MA (1991). How and why the nose runs. *J allergy Clin Immunol*, **87**: 457-460
- REED G, JEWETT PH, THOMPSON J, TOLLEFSON S, WRIGHT PF (1997). Epidemiology and clinical impact of Parainfluenza virus infections in otherwise healthy infants and young children < 5 years old. *J Inf Dis*, **175**:807-813
- RENNELS M.B., MEISSNER H.C.(2002). The Committee on Infectious Diseases, American Academy Of Pediatrics Technical Report Reduction of the Influenza Burden in Children; *Pediatrics* **110**,6: 1-18.
- ROOSEVELT G, SHEEHAN K, GRUPP-PHELAN J, TANZ RR, LISTERNICK R (1996). Dexamethasone in bronchiolitis: a randomised controlled trial. *Lancet.*, **348**(9023):292-295.
- ROWE T., ABERNATHY R. A., HU-PRIMMER J., et al. (1999) Detection of Antibody to Avian Influenza A (H5N1) Virus in Human Serum by Using a Combination of Serologic Assays, *J Clin Microbiol*, **37**(4): 937-43.
- RUEST A., MICHAUD S., DESLANDES S., FROST E. H., (2003) Comparison of the Directigen Flu A+B test, the QuickVue Influenza Test, and Clinical CaseDefinition to Viral Culture and Reverse Transcription PZR for Rapid Diagnosis of Influenza Virus Infection. *J Clin Microbiol*, **41**(8):3487-93.
- SANDRITTER TL, KRAUS DM (1997). Respiratory syncytial virus-immunoglobulin intravenous (RSV-IVIG) for respiratory syncytial virus infections. Part I. *J Pediatr Health Care*, **11**(6):284-291.
- SAVOLAINEN C., BLOMQVIST S., MULDER M. N., HOVIT. (2002). Genetic clustering of all 102 human Rinovirus prototype strains: serotype 87 is close to human enterovirus 70. *J. Gen. Virol.*, **83**: 333-340.

- SAVY VL, BAUMEISTER EG, CAMPOS AM, PONTORIERO A.(2002). Comparison of 2 techniques for the laboratory diagnosis of Influenza virus infections. *Rev Argent Microbiol*, **32**: 144-148.
- SCHUH S, CANNY G, REISSMAN JJ, KEREM E, BENTUR L, PETRIC M, LEVISON H (1990). Nebulized albuterol in acute bronchiolitis. *J Pediatr.*, **117(4)**:633-637.
- SENGUPTA S, ONODERA F, LAI A, MELCHER U.(2003). Molecular detection and identification of influenza viruses by oligonucleotide microarray hybridization. *J Clin Microbiol*, **41**: 4542-4550
- SHIMIZU C, SHIKE H, BAKER SC (2005). Human Coronavirus NL63 is not detected in the respiratory tracts of children with acute Kawasaki disease. *J Infect Dis*, **192**: 1767-1771
- SIMÕES EA, SONDHEIMER HM, TOP FH, MEISSNER HC, WELLS RC, KRAMER AA, GROOTHIUS JR (1998). Respiratory syncytial virus immune globulin for prophylaxis against respiratory syncytial virus disease in infants and children with congenital heart disease. The Cardiac Study Group. *J Pediatr.*, **133(4)**:492-499.
- SINHA NK, ROY A, DAS B, DAS S, BASAK S.(2009). Evolutionary complexities of swine flu H1N1 gene sequences of 2009. *Biochem Biophys Res Commun* , **390**:349-351.
- SLOOTS TP, MCERLEAN P, SPEICHER DJ, ARDEN KE, NISSEN MD, MACKAY IM (2006). Evidence of human Coronavirus HKU1 and human bocavirus in Australian children. *J Clin Virol*, **35**: 99-102.
- SMITH AB, MOCK V, MELEAR R, COLARUSSO P, WILLIS DE. (2003). Rapid detection of Influenza A and B viruses in clinical specimens by Light Cycler real time RTPZR. *J Clin Virol* ,**28**: 51-58.
- SMITH CB, GORBACH SL, BARTLETT JG, BLOCKLOW NR (eds). (1998). *Influenza viruses In Infectious Diseases*. Philadelphia, WB Saunders Company, 2120.
- SMITH FS, PORTNER A, LEGGIARDO RJ, TURNER EV, HURWITZ JL (1994). Age-related development of human memory T-helper and B cell responses toward parainfluenza type-1. *Virology*, **205**:453-461.
- SMITH, T. J., KREMER M. J., LUO M., et al. (1986) The site of attachment in human Rinovirus 14 for antiviral agents that inhibit uncoating. *Science*, **233**:1286-1293.
- STORCH GA.(1997).Respiratory syncytial virus In: Long S.S., Pickering LK., Prober CG. (eds.) *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases* 1 st. Edition Churchill Livingstone,1247-1254.
- SULLIVAN SJ, JACOBSON RM, DOWDLE WR, POLAND GA.(2010). 2009 H1N1 Influenza. *Mayo Clin Proc* , **85**:64-76.
- SUNG RYT, YIN J, OPPENHEIMER SJ, TAM JS, LAU J (1993). Treatment of respiratory syncytial virus infection with recombinant interferon alpha-2a. *Arch. Dis. Child.*,**69**:440-442.

- SUNG RYT, YIN J, OPPENHEIMER SJ, TAM JS, LAU J. Treatment of respiratory syncytial virus infection with recombinant interferon alpha-2a. *Arch. Dis. Child*, 1993;69:440-442.
- TAUBENBERGER JK, HARVEY HA, MEMOLI MJ. The 1918 influenza pandemic: lessons for 2009 and the future. *Crit Care Med* 2009 Dec 31 [Epub ahead of print].
- THOMAS Y, KAISER L, WUNDERLI W. (2003).The use of near patient tests in influenza surveillance: Swiss experience and EISS recommendations. *Euro Surveill* **8**: 240-246
- TREANOR JJ.: MANDELI GL, BENNETT JE, DOLIN R (eds) (2005). *Influenza in Principles and Practice of Infectious Diseases*. New York: Churchill Livingstone, 1823.
- TUMPEY TM. (2005).Characterization of the reconstructed 1918: Spanish influenza pandemic virus. *Science* , **310**: 77-80.
- TURNER D, WAILOO A, NICHOLSON K, COOPER N, SUTTON A, ABRAMS K (2003). Systematic review and economic decision modeling for the prevention and treatment of influenza A and B. <http://www.nice.org.uk/pdf/influenzaassrep.pdf> (accessed Oct 15).
- UNCAPHER C. R., DEWITT C. M., COLONNO R. J. (1991) The major and minor group receptor families contain all but one human Rinovirus serotype. *Virology*, **180**:814-817.
- USTAÇELEBİ, Ş. (1999). *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Güneş kitapevi,Ankara. s., 807-813.
- VABRET A, DINA J, GOUARIN S, PETITJEAN J, CORBET S, FREYMUTH F (2006). Detection of the new human Coronavirus HKU1: a report of 6 cases. *Clin Infect Dis*, **42**: 634-639.
- VERBON- MACÍOLEK M A, KREDIET T G, GERARDS L S, FLEER A, VAN LOON T M: Clinical and epidemiologic characteristic of viral infections in a neonotal intensive care unit during a 12 year period, *Pediatr Infect Dis J* 2005; **24** (10): 901-4.
- VISSCHER DW, MYERS JL. BRONCHIOLITIS (2006). *Proc Am Thorac Soc.*,**3**(1):41-47.
- VUORINEN T., AND MEURMAN O., (1989) Enzyme immunoassays for detection of IgG and IgM antibodies to parainfluenza types 1, 2, and 3. *J. Virol. Methods*, **23**: 63-70.
- WALSH EE, MCCONOCHIE KM, LONG CE, HALL CB, SCHANABEL KC, HILDRETH SW, ANDERSON LJ (1990). Occurance of groups A and B of respiratory syncytial virus over 15 years: associated epidemiologic and clinical characteristics in hospitalized and ambulatory children. *J Infect Dis*, **162**:1283-1290.
- WANER J L: Mixed viral infections. Detection and management, *Clin Microbiol Rew* 1994,7: 143.
- WANG LF, SHI Z, ZHANG S, FIELD H, DASZAK P, EATON BT (2006). Review of bats and SARS. *Emerg Infect Dis.*, **12**: 1834-1840.
- WELLIVER CR, OGRA PR (1998). Respiratory syncytial virus In: Gorbach Sherwood L, Bartlett John G, Blacklow Neil R (eds). *Infectious Diseases*, 2th Edition, W B Saunders Company, 2148-2150.

- WHITE T.(1999). Lavoie S.,Nettleman MD., Potential Cost Savings Attributable to Influenza Vaccination of School-aged Children; *Pediatrics*, **103**:6. 1-5.
- WHO.(2001). Influenza pandemic preparedness and response. EB 115 / 44 / 20- 01.
- WILLIAMS JV. (2005).The clinical presentation and outcomes of children infected with newly identified respiratory tract viruses. *Infect Dis Clin N Am* , **19**: 569-84.
- WOO PC, LAU SK, CHU CM (2005). Characterization and complete genome sequence of a novel Coronavirus, Coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *J Virol*, **79**: 884-895.
- WOOD DJ, CORBITT.G, Viral infections in childhood leukemia. *Journal of infectious diseases*. 1985; 152: 266-273.
- WRIGHT AL, TAUSSIG LM, RAY CG, HARRISON HR, HOLBERG CJ. (1989) The Tucson Children's Respiratory Study II: lower respiratory tract illness in the first year of life. *Am J Epidemiol*, **129**: 1232-46.
- WYDE PR, CHETTY SN, JEWELL AM, BOIVIN G, PIEDRA PA. (2003) Comparison of the inhibition of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus by ribavirin and immune serum globulin in vitro. *Antiviral Res*, **60**: 51-9.
- YAMADA A, IMANISHI J, NAKAJIMA K, NAKAJIMA S.(1991). Detection of influenza viruses in throat swab by using polymerase chain reaction. *Microbiol Immunoloji*, **35**: 259-265
- YILMAZ G, İSKANOVA B, ÖZKAN E, TÜRKOĞLU S. Comparison of antigen detection by IFA and cell culture for the diagnosis of RSV infection, s..173 the 8th Annual ESCV Meeting 2005.
- YILMAZ G, UZEL N, ISIK N, BAYSAL S U, ASLAN S, BADUR S: Viral lower respiratory tract infections in children in İstanbul, Turkey *Ped Infect Dis J* 1999; **18** (2): 173.

<http://pathmicro.med.sc.edu/> Erişim tarihi: 10.02.2011.

CDC. (2002). [<http://www.cdc.gov/handhygiene/Guidelines.html>]. Erişim tarihi: 25.10.2010.

<http://slavirusportfolio.wikispaces.com/SARS-Danielle> Erişim tarihi: 15.01.2011

www.virology.ws/influenza-virion.jpg Erişim tarihi: 9.12.2010

www.bing.com/health Erişim tarihi: 9.12.2010

EK 1

Anket no:....

**SOLUNUMSAL ENFEKSİYONLARDA VİRAL ETKENLER SORGULAMA
FORMU**

Ad soyad : **Dosya No:**

Cinsiyet :

Yaş :

Adres-tel :

Evde yaşayan kişi sayısı:

Ailenin gelir düzeyi: () Çok Düşük () Düşük () Orta () İyi () Çok İyi

Mevsimsel grip Aşısı vurdurdunuz mu?

() Evet () Hayır

Domuz gribi(H1N1) Aşısı vurdurdunuz mu?

() Evet () Hayır

Son bir ay içinde ailede grip benzeri hastalık geçiren oldu mu: () Evet () Hayır

Oldu ise kim ?....., **Hastalık nasıl tedavi edildi?**.....

Son bir ay içinde başka bir nedenle hastaneye yatırıldı mı? : () Evet () Hayır

Halen Şikayeti :

Ateş varsa kaç derece :.....() Kaç günden beri.....

Baş ağrısı : Halsizlik :

Öksürük : Hırıltılı soluk alma ve verme :

Nefes darlığı : Burun akıntısı :

Gözlerde sulanma : Burun tıkanıklığı :

Titreme : Miyalji(kas ağrısı) :

İshal : () kaç günden beri.....Günde kaç Kez:.....

Kusma : () kaç günden beri..... Günde kaç Kez:.....

Karın ağrısı : () kaç günden beri.....

Tedavi aldı mı? () almadı () Antibiyotik () antiviral () Ateş düşürücü

Kronik hastalığınız var mı? () Evet () Hayır

Diyabet :

Böbrek yetmezliği :

Hipertansiyon :

Karaciğer yetmezliği :

Kalp dolaşım yetmezliği :

Astım :

Diğer :