

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

**2019-2020 SEZONUNDA SOLUNUMSAL ENFEKSİYON
ETKENİ VİRÜSLERİN DAĞILIMI VE SAPTANAN
İNFLUENZA VİRÜSLERİNİN OSELTAMİVİR
DİRENCİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tuğba KAYA

**Enstitü Anabilim Dalı : Tıbbi Mikrobiyoloji
Enstitü Bilim Dalı : Tıbbi Mikrobiyoloji**

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Mustafa ALTINDIŞ

HAZİRAN-2021

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**2019-2020 SEZONUNDA SOLUNUMSAL ENFEKSİYON
ETKENİ VİRÜSLERİN DAĞILIMI VE SAPTANAN
İNFLUENZA VİRÜSLERİNİN OSELTAMİVİR
DİRENCİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tuğba KAYA

**Enstitü Anabilim Dalı : Tıbbi Mikrobiyoloji
Enstitü Bilim Dalı : Tıbbi Mikrobiyoloji**

“Bu tez/..../202.. tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.”

JÜRİ ÜYESİ	KANAATI	İMZA

BEYAN

Bu çalışma T.C. Sakarya Üniversitesi Klinik Araştırmalar Girişimsel Olmayan Etik Kurulu'ndan 23/01/2020 tarihinde 62 sayılı karar numarası ile onay olarak hazırlanmıştır. Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

.../.../2021

Adı-Soyadı

İmza

TEŞEKKÜR

Sakarya Üniversitesi yüksek lisans süresi boyunca her konuda ilgi ve desteğini benden esirgemeyen, hoşgörüsü, öneri ve eleştirileriyle beni yönlendiren, tez planlama süresince bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşarak yardımcı olan tez danışmanım değerli hocam sayın Prof. Dr. Mustafa ALTINDİŐ'e, sayın hocam Prof. Dr. Mehmet KÖROğLU'na, laboratuvar teknik desteklerinden dolayı Uzm. Dr. Fatma BAYRAKDAR ve Uzm. Dr. Yasemin COŞGUN'a, desteğini her zaman ve her konuda hissettiğim Uzm. Dr. Hande TOPTAN'a, her türlü bilgiyi ve yardımını esirgemeyen Uzm. Dr. Hüseyin Agah TERZİ'ye, yaşamım boyunca sevgisini ve desteklerini hep yanımda hissettiğim değerli annem Kezban KAYA, kıymetli babam Mikail KAYA ve canım kardeşim Burhan KAYA'ya bana olan inanç ve destekleri için teşekkürlerimi sunarım.

Saygılarımla

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
KISALTMA VE SİMGELER.....	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ	vi
TABLolar LİSTESİ.....	vii
RESİMLER LİSTESİ	viii
ÖZET.....	ix
SUMMARY	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ	x
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. İNFLUENZA VİRÜSLERİ.....	3
2.1.1. Viral Özellikler	4
2.1.1.1. Sınıflandırma.....	4
2.1.1.2. Virüs Morfolojisi ve Genom Yapısı.....	5
2.1.1.3. Replikasyon.....	7
2.1.1.4. Antijenik Varyasyon	8
2.1.2. Epidemiyoloji.....	9
2.1.3. Sürveyans.....	11
2.1.4. Klinik Özellikler	13
2.1.5. Laboratuvar Tanısı	14
2.1.5.1. Örneklerin Toplanması ve saklanması	14
2.1.5.2. Hızlı Antijen Testleri.....	17
2.1.5.3. Embriyonlu Yumurtada Virüs İzolasyonu	17
2.1.5.4. Hücre Kültüründe Virüs İzolasyonu	18
2.1.5.5. Serolojik Tanı.....	18
2.1.5.6. Moleküler Yöntemleri.....	19
2.1.6. Tedavi ve Korunma	19
2.1.6.1. Antiviral ilaçlar	19
2.1.6.2. Aşı.....	21
2.1.7. Direnç.....	24

2.1.8. Antiviral Direnç Saptama Yöntemleri	26
2.2. İNFLUENZA DIŞI SOLUNUM YOLU VİRÜSLERİ	27
2.2.1. Parainfluenza Virus.....	27
2.2.2. Human Metapneumovirus (hMPV)	28
2.2.3. Respiratuvar Sinsityal Virüs (RSV).....	28
2.2.4. Rhinovirus.....	30
2.2.5. Enterovirüs.....	30
2.2.6. Adenovirusler (Human Adenovirus- HAdV)	31
2.2.7. Bocavirus (Human Bocavirus- HBoV).....	32
2.2.8. Coronavirus.....	32
3. GEREÇ VE YÖNTEM	35
3.1. ÇALIŞMA GRUBU	35
3.2. ÖRNEKLERİN ALINMASI VE SAKLANMASI	35
3.3. QIASTAT-DX® RESPIRATORY PANEL İLE VİRÜSLERİN TESPİTİ	36
3.3.1. Örnek Alma Ve Kartuş Yükleme.....	37
3.4. VİRÜS HÜCRE KÜLTÜRÜ	38
3.5. DNA DİZİ ANALİZİ (SEKANS).....	39
4. BULGULAR.....	41
4.1. ÇALIŞMA GRUBUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ	41
4.1.1. Demografik Veriler.....	41
4.1.2. Örneklerin Gönderildiği Klinikler	42
4.2. QIASTAT-DX® RESPIRATORY PANEL TEST SONUÇLARI	44
4.3. DNA DİZİLEME ANALİZİ SONUÇLARI	49
4.3.1. H1N1 İzolatlarında Oseltamivir Direnç Sonuçları	50
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	52
KAYNAKLAR	62
ÖZGEÇMİŐ	76

KISALTMA VE SİMGELER

CDC	: Centers for Disease Control and Prevention
cDNA	: Komplementer Deoksiribonükleik Asit
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EIA	: Enzyme Immunoassay
FDA	: Food and Drug Administration
GISRS	: Global Influenza Surveillance and Response System
GIS	: Gastrointestinal Sistem
HA	: Hemaglütinin
HADV	: Human Adenovirüs
HBOV	: Human Bocavirüs
HEF	: Hemaglütinin- Nöraminidaz Füzyon Proteini
HSGM	: Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü
HSYS	: Halk Sağlığı Yönetim Sistemi
İBH	: İnfluenza Benzeri Hastalık
M1	: Matriks Proteini 1
M2	: Matriks Proteini 2
MDCK	: Madin-Darby Canine Kidney
MERS-COV	: Middle East Respiratory Syndrome-Coronavirus
NA	: Nöraminidaz
NASBA	: Nucleic Acid Sequence Based Amplification
NAT	: Nükleikasit Tespiti
NP	: Nükleoprotein
NS1	: Nüklear Eksport Protein 1
NS2	: Nüklear Eksport Protein 2
nm	: Nanometre
PA	: Polimeraz Asidik
PB1	: Polimeraz Bazik 1

PB2	: Polimeraz Bazik 2
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RSV	: Respiratuvar Sinsityal Virüs
RT-PZR	: Revers Transkriptaz- Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik Asit
SARI	: Severe Acute Respiratory Infections
SARS	: Severe Acute Respiratory Syndrome
VTM	: Viral Transport Medium



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. İnfluenza virüsünün yapısı	5
Şekil 2. İnfluenza virüsünün elektron mikroskopundaki görünümü	6
Şekil 3. İnfluenza virüsünün replikasyonu	7
Şekil 4. Ülkemizde sentinel SARI numunelerindeki İnfluenza pozitiflik yüzdesi, İnfluenza alt tipleri sayısı ve pozitif numunelerin alt tipinin yüzde dağılımı, 2019-2020 İnfluenza sezonu.....	13
Şekil 5. Boğaz sürüntüsü alınması	15
Şekil 6. Burun sürüntüsü alınması	16
Şekil 7. Nazofaringeal sürüntüsü alınması	16
Şekil 8. Nazofaringeal aspirasyon örneğinin alınması	17
Şekil 9. Embriyonlu yumurtada virüs izolasyonu	18
Şekil 10. Oseltamivir direnç mekanizması	25
Şekil 11. Kartuşu cihaza yerleştirme	37
Şekil 12. Amplifikasyon eğrileri ekranı	38
Şekil 13. Hastaların yaş dönemlerine göre dağılımı	42
Şekil 14. Örneklerden solunum yolu virüsleri saptama oranı	44
Şekil 15. Solunum yolu virüslerinin haftalara göre dağılımı	45
Şekil 16. Solunum yolu virüslerinin aylara göre dağılımı	46
Şekil 17. Tespit edilen İnfluenza cins ve serotiplerinin dağılımı	46
Şekil 18. Tespit edilen İnfluenza cins ve serotiplerinin aylara göre dağılımı	48
Şekil 19. Diğer solunum yolu virüslerinin (İnfluenza dışı) dağılımı	48
Şekil 20. Çocuklarda solunum yolu virüslerinin yaşlara göre dağılımı	49
Şekil 21. Agaroz jel elektroforez sonucu	50
Şekil 22. İnfluenza H1N1 izolatlarında direnç kromotogramı.....	51

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1. İnfluenza A subtipleri	4
Tablo 2. İnfluenza A gen segmentleri ve fonksiyonları	6
Tablo 3. İnfluenzaya bağlı komplikasyon gelişme riski olan gruplar	11
Tablo 4. Sentinel İBH ve sentinel SARI sörveyans merkezleri	12
Tablo 5. CDC'nin pandemik grip olguları klinik bulguları kategorileri	14
Tablo 6. Solunum yolu enfeksiyonları teşhisinde kullanılabilir örnek çeşitleri... ..	14
Tablo 7. Tedavide etkili nöraminidaz inhibitörü ilaçlar	20
Tablo 8. 2010-2015 yılları arasında ülkemizde tespit edilen influenza virüs antijenik tipleri ile aşı içeriğindeki virüslerin karşılaştırılması.....	22
Tablo 9. 2015-2018 yılları arasında kuzey yarımkürede grip mevsiminde önerilen grip aşıları içeriği	23
Tablo 10. 2018-2021 yılları arasında kuzey yarımkürede grip mevsiminde önerilen grip aşıları içeriği	23
Tablo 11. Hücre kültüründe kullanılan vasatlar	38
Tablo 12. Hastaların yaş gruplarına ve cinsiyetlerine göre dağılımı	41
Tablo 13. İncelenen örneklerin kliniklere göre dağılımı	43
Tablo 14. İnfluenza alt tiplerinin yaş gruplarına göre dağılımı	47

RESİMLER LİSTESİ

Resim 1. QIAstat-Dx [®] Respiratory Panel	36
---	----



ÖZET

GİRİŞ VE AMAÇ: Bu çalışmada üst solunum yolu enfeksiyonu semptomlarıyla başvuran hastalardaki viral etkenlerin sezonal dağılımının multipleks PCR yöntemi ile irdelenmesi ve İnfluenza A (H1N1) pozitif bulunan örneklerde Oseltamivir ilaç direncinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM: Sakarya Üniversitesi Sakarya Eğitim ve Araştırma Hastanesi'ne 12 Eylül 2019- 19 Şubat 2020 tarihleri arasında üst solunum yolu enfeksiyonu semptomları ile başvuran 0-94 yaş arasındaki 354 hastanın multipleks PCR yöntemiyle (Qiasat-Dx Respiratory panel-Qiagen, Almanya) çalışılmış nazofaringeal sürüntü ve bronkoalveoler lavaj örneklerinin verileri retrospektif olarak irdelenmiştir. Sonuçta, İnfluenza A (H1N1) pozitif örnekler arasından seçilen 11 numunede, Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları ve Biyolojik Ürünler Daire Başkanlığı, Ulusal Viroloji Referans Laboratuvarında Sanger sekans analizi ile Oseltamivir direnci araştırılmıştır.

BULGULAR: İncelenen 354 örneğin 233'ünde bir ya da daha fazla solunum yolu viral etkeni tespit edilmiştir. Bunlardan 64'ü İnfluenza A/H1N1, 4 İnfluenza A/H3N2, 24 İnfluenza B, 64 Respiratuvar Sinsityal Virüs A/B (RSV A/B), 58 Rhinovirüs/Enterovirüs, 18 Adenovirüs, 12 Human Metapneumo Virüs (hMPV), 10 Bocavirüs, 4 Parainfluenza 1, 7 Parainfluenza 3, 3 Parainfluenza 4, 5 Coronavirüs HKU1 ve 13 Coronavirüs NL63 olarak bulunmuştur. İnfluenza A/H1N1 pozitif olan suşlardan seçilen 11 numunenin hiçbirinde Oseltamivir direnci saptanmamıştır.

SONUÇ: Bu çalışmada incelenen İnfluenza A/H1N1 pozitif örneklerinde Oseltamivir direnci saptanmamıştır. İnfluenza A/H1N1 suşlarının Oseltamivir direnci açısından belirli aralıklarla analizinin yapılması ampirik tedavinin yönlendirilmesinde önemlidir.

Anahtar Kelimeler: Solunum yolu virüsleri, İnfluenza, Oseltamivir, Direnç, Sekans.

SUMMARY

Distribution of Respiratory Infection Viruses in 2019-2020 Season and Determination of Oseltamivir Resistance of Influenza Viruses

INTRODUCTION AND AIM: In this study, we aimed to determine the seasonal distribution of viral factors in patients presenting with symptoms of upper respiratory tract infection by multiplex PCR method and investigating Oseltamivir drug resistance in samples found to be influenza A (H1N1) positive.

MATERIALS AND METHODS: The data of the Nasopharyngeal swab samples and bronchoalveolar lavage samples which were studied by multiplex PCR method (QIAstat-Qiagen, Germany), of 354 patients aged 0-94 who applied to Sakarya University Sakarya Training and Research Hospital with symptoms of upper respiratory tract infection between 12 September 2019 and 19 February 2020 were examined retrospectively. As a result, Oseltamivir resistance was investigated by sanger sequence analysis in 11 samples selected among Influenza A (H1N1) positive samples, in the National Virology Reference Laboratory of the Ministry of Health, General Directorate of Public Health, Microbiology Reference Laboratories and Biological Products Department.

RESULTS: One or more respiratory viral factors were identified in 233 of the 354 samples examined. Of these, 64 were Influenza A/H1N1, 4 Influenza A/H3N2, 24 Influenza B, 64 Respiratory Syncytial Virus A/B (RSV A/B), 58 Rhinovirus/Enterovirus, 18 Adenovirus, 12 Human Metapneumo Virus (hMPV), 10 Bocavirus, 4 Parainfluenza 1, 7 Parainfluenza 3, 3 Parainfluenza 4, 5 Coronavirus HKU1 and 13 Coronavirus NL63. Oseltamivir resistance was detected in none of the 11 samples selected from strains that tested positive for influenza A/H1N1.

CONCLUSION: Oseltamivir resistance was not detected in any of the Influenza A/H1N1 positive samples examined in this study. It is important to test influenza A/H1N1 strains at certain intervals in terms of Oseltamivir resistance in order to direct empirical treatment.

Keywords: Respiratory viruses, Influenza, Oseltamivir, Resistance, Sequence.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Grip, influenza virüsüne bağlı ortaya çıkan bir solunum yolu enfeksiyonudur. Virüs içeren damlacıkların enfekte bireylerin hapşırması, öksürmesi veya konuşmasıyla 100-180 cm mesafeye kadar ulaşabildiği gösterilmiştir. Konuşma, öksürme, aksırma ile damlacık yoluyla gelip yakındaki kişilerin ağız ve burunlarına yerleşebilen virüs, bireyin üzerinde grip virüsü bulunan bir eşyaya veya zemine temasının ardından kendi ağız, burun veya gözlerine dokunarak da gribe sebep olabilmektedir (Yıldırım 2019). Farklı klinik tablolar gösteren influenza virüsünün bazı türleri, insandan insana kolaylıkla bulaşarak özellikle kış aylarında mevsimsel salgınlara ve pandemilere neden olur. Her yıl influenza ile enfekte olan kişiler hastane yatışlarıyla tedavi görebilirken bazı yüksek risk gruplarında bu durum mortaliteye neden olabilmektedir (Grohskopf et al 2019).

Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde 1976-2007 yılları arasında yetişkin yaş grubunda yıllık yaklaşık 23.483 influenzaya bağlı ölüm gerçekleşmiştir. Bu sayı tüm yaş gruplarındaki viral pnömoni ölümlerin %99,5'ini oluşturmaktadır (Casey et al 2010). Gelişmiş ülkelerde ölümlerin çoğunun 65 yaş ve üzeri insanlarda görüldüğü gözlenmiştir. (Özışık, Çalık Başaran ve Ünal 2016). 2016'da yapılan bir çalışmaya göre dünya genelinde influenza sebepli hastane yatışlarının gelişmekte olan ülkelere sanayileşmiş ülkelere göre 3 kat fazla olduğu belirlenmiştir. (Yıldırım 2019).

Gripten korunmanın en iyi yolu grip aşısıdır. Özellikle influenzaya bağlı komplikasyon gelişme riski olan kişilerde aşılama büyük öneme sahiptir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) gebeler öncelikli olmak üzere bu riskli grupların ve sağlık çalışanlarının mevsimsel grip aşısı ile aşılmasını önermektedir. Amerika Birleşik Devletleri Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi (CDC- Centers for Disease Control and Prevention) 6 aylık ve üzeri herkesin her sene aşılmasını önermekte, grip virüsleri dolaşımında olduğu sürece, grip sezonu boyunca aşılama yapılabileceğini belirtmektedir. Bu sayede grip olma riski, gribe bağlı hastane yatışlar, okul/iş gücü kayıpları, gereksiz ilaç kullanımı ve doktora başvuru azalacak, daha da önemlisi çocuklarda hayat kurtarıcı olacaktır (Yıldırım 2019).

İnfluenza aktivitesinin düşük olduğu dönemlerde diğer solunum yolu virüslerinin (Rhinovirüs, Respiratuar Sinsityal Virüs (RSV), Parainfluenza, Adenovirüs, Coronavirüsler...) neden olduğu hastalıklarda influenza benzeri semptomlar gösterebilir. Bu durumda influenzayı diğer patojenlerden ayırmak ve kesin tanı koymak için antijen tespiti yapılmalıdır. En yaygın kullanılan yöntemler direkt virüs izolasyonu ya da ters transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ile influenza spesifik RNA'nın saptanmasıdır (Aktürk et al 2015).

Solunum yolu virüslerinden özellikle pandemik influenza A/H1N1 nedeniyle hastaneye yatırılan veya komplikasyon riski yüksek hastalarda en kısa sürede antiviral tedaviye başlanması önerilmektedir. Yapılan çalışmaların büyük bir kısmında hastalığın başlangıcında ilk 48 saatte başlanılan antiviral tedavinin sağ kalım oranını arttırdığı görülmüştür ve sık tercih edilen antiviralin nöraminidaz inhibitörü olan Oseltamivir olduğu belirlenmiştir (Çiftçi, Karbuz ve Kendirli 2016).

Bu çalışmada 2019-2020 sezonundaki influenza epidemisi sırasında üst solunum yolu enfeksiyonu semptomları ile Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesine başvuran hastalardaki viral etkenlerin dağılımının irdelenmesi ve İnfluenza A (H1N1) pozitif olarak bulunan hasta örneklerinde, en yaygın kullanılan antiviral olan Oseltamivir ilaç direnci araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İNFLUENZA VİRÜSLERİ

Üst solunum yolları enfeksiyonları çok eski yıllardan günümüze kadar gelen hastalık etkenleridir. İlk kez M.Ö. 412’de Hipokrat tarafından tanımlanmış ve İnfluenzaya benzer ilk pandemi 1580 yılında gerçekleşmiştir. Noble tarafından toplanan 1500-1800 yılları arasındaki döneme ait verilerde, epidemilerin göreceli olarak sıklıkla ve düzensiz zaman aralıklarında görülüp kaybolduğu bildirilmiştir. Richard Shope, 1920’li yılların sonuna doğru yaptığı çalışma ile domuz influenza virüsünün insana bulaşabileceğini göstermiştir. 1933’ te insan influenza virüsünün ilk izolasyonunun ardından büyük antijenik kaymalar görüldüğü ve neticesinde pandemilere neden olduğu belirlenmiştir (Özden 2010).

Bu zamana kadar görülen pandemilerin en büyüğü 1918-1919 yıllarında görülen ve yaklaşık 20 milyon insanın ölümüne yol açan İspanyol gripidir. Onu takriben 1957-1958 yılları arasında Asya gribi, 1968-1970’ te Hong Kong gribi ve 1977-1978’ de salgınları görülmüştür. 1997’de Hong Kong’da tespit edilen kuş gribi, avian influenza H5N1 virüsüne ait değişmiş bir suş gösterilememiştir ve şu an için insandan insana geçmediği bilinmektedir (Özışık ve ark 2016). Son pandemi 17 Nisan 2009’ da CDC’ nin iki pediatri olgusunda “domuz gribi” (swine influenza) tanısını ile başlamış; etkenin insan, kanatlı, domuz influenza virüslerine ait gen bölgelerini toplayan (üçlü bir harmanlama/reasorman) virüs olarak tanımlanan H1N1 suşu olduğu belirlenmiştir (Patient 2009). Günümüze kadar görülüp pandemiye neden olan influenza A subtipleri ve bunlara bağlı meydana gelen mortaliteler Tablo 1.’ de gösterilmiştir.

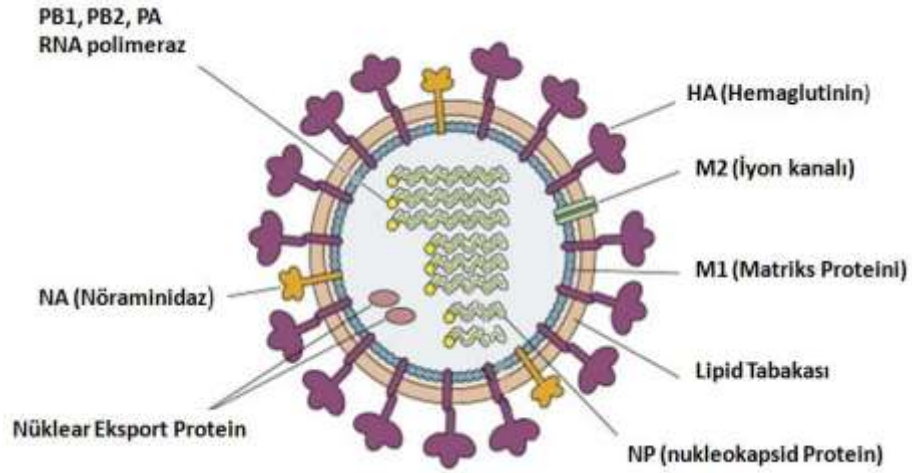
Tablo 1. Pandemiye Neden Olan İnfluenza A Subtipleri (Badur 2012)

YIL	Subtip	Tahmini Ölüm sayısı	Pandemi adı
1889	H2N2	1 milyon	Asya gribi/Rus gribi
1900	H3N8	—	Hong Kong gribi
1918	H1N1	20-50 milyon	İspanyol gribi
1957	H2N2	1-4 milyon	Asya gribi
1968	H3N2	1-4 milyon	Hong Kong gribi
1977	H1N1	-	Rus gribi
1997	H5N1	-	Kuş gribi
2009	H1N1	100 bin-400 bin	Domuz gribi/2009 influenza pandemisi

2.1.1. Viral Özellikler

2.1.1.1. Sınıflandırma

Gribe neden olan influenza virüsleri Orthomyxovirüs aile aittir. Büyüklükleri 80-120 nanometre çapında olup pleomorfik yapıdadırlar. Negatif polariteye sahip, zarflı, tek zircirli virüslerdir. Segmentli RNA bulundurlar. İnsanlarda görülen influenza virüsünün nükleokapsidi ve matriks proteinlerine göre A, B ve C şeklinde 3 ana tipi ve yakın zamanda tarif edilen D tipi vardır (Çelebi ve Ayyıldız 2008). İnfluenza tip A virüslerinin doğal kaynağı yabani kuşlardır fakat bu virüsler geniş konak özgüllüğü (evcil kuşlar, memeli hayvanlar, insanlar) göstermektedir. İnfluenza tip B'nin doğal kaynağı insandır; influenza tip C'nin ise insan, nadiren domuz ve köpek şeklindedir. Yeni tanımlanan İnfluenza D'nin kaynağı sığır, domuz, koyun şeklindedir ve insan enfeksiyonu ile ilişkilendirilmemiştir (Ducatez, Pelletier and Meyer 2015). A ve B sekiz segmentli iken C ve D yedi segmentlidir (Çelebi ve Ayyıldız 2008).

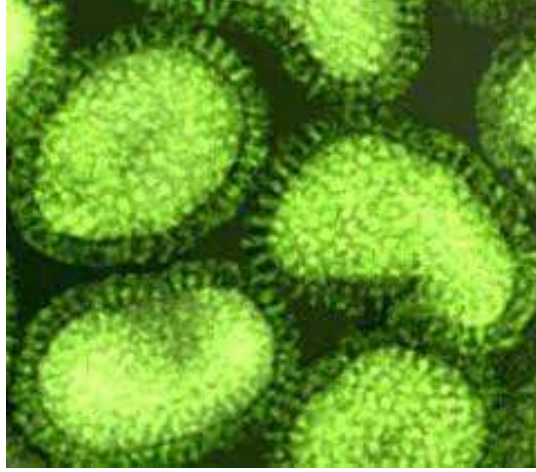


Şekil 1. İnfluenza virüsünün yapısı (Çalışkan Eryeğen 2011)

Yapısında hemagglütinin (HA) ve nöraminidaz (NA) isimli zarf glikoproteinleri vardır. HA virüsün hücreye bağlanmasını sağlarken NA ise mürin tabakasını uzaklaştırarak bağlanmaya yardımcı olur. İnfluenza A ve B alttipleri, HA ve NA aktivitesi gösterirken İnfluenza C’de NA yoktur. İnfluenza C’de aynı fonksiyonları gösteren Hemagglutinin-Nöraminidaz ve füzyon proteini (HEF) vardır (Paketçi 2008). İnfluenza A virüsü HA ve NA glikoproteinlerine göre alt tiplere ayrılmıştır. Şimdiye kadar toplam 18 HA ve 11 NA alt tipi belirlenmiştir (Özdemir 2018).

2.1.1.2. Virüs Morfolojisi ve Genom Yapısı

İnfluenza virüsü elektron mikroskobu ile incelendiğinde 120 nm çapında ve yuvarlak partiküller şeklinde gözlenmiştir. Virüs morfolojisi insanlardan ilk izole edilen ve pasajdan sonra elde edilen şekilde farklılık göstermektedir. Fakat hücre kültürü ya da embriyonlu yumurta pasajlarında çoğunlukla yuvarlak morfolojilidirler. Ayrıca virüsün yüzeyinden dışarı doğru ışınsal şekilde dizilmiş uzantılar görülür (Özdemir 2018).



Şekil 2. İnfluenza virüsünün elektron mikroskopundaki görünümü (Aslan 2006, Çelebi ve Ayyıldız 2021, Özdemir 2011)

İnfluenza A ve B'nin yapıları benzerdir fakat İnfluenza C virüsünün yüzey glikoprotein yapısı farklıdır. HEF adında yüzey uzantısına sahiptir. İnfluenza A'nın segmentleri ve fonksiyonları Tablo 2'te gösterilmiştir.

Tablo 2. İnfluenza A Gen Segmentleri ve Fonksiyonları (Us Dürdal 2010)

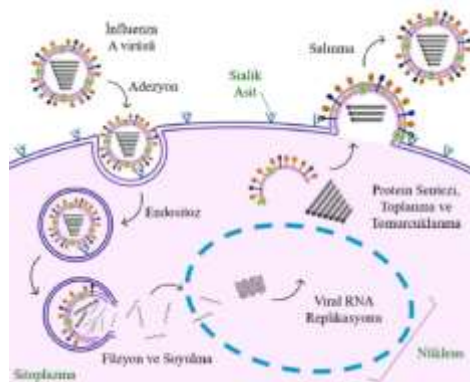
Segment	Protein		Fonksiyonu
	Simge	Açık adı	
1	PB2	Polimeraz bazik 2	RNA bağımlı RNA polimeraz kompleksi. Replikasyon sırasında virüse özgü RNA sentezinde rol alma
2	PB1	Polimeraz bazik 1	
3	PA	Polimeraz asidik	
4	HA	Hemagglutinin	Sialik aside tutunma;endositozla membran füzyonu;Nötralizan antikor oluşumu
5	NP	Nükleoprotein	Genomun yapısal komponenti,viral RNA'nın nüklear/ sitoplazmik transportu
6	NA	Nöraminidaz	D gliktozamin ile Sialik asidin arasındaki bağın kesilmesini, virüsün hücreden salınımı
7	M1	Matriks Proteini 1	Virionun içini kaplama ve dış yapı elemanlarının tutulmasını sağlama
	M2	Matriks Proteini 2	Membran içinde protein kanalı oluşturur,tabakaları kaldırıp viral salınımı sağlama
8	NS1	Yapısal olmayan proteinler	RNA transportu,interferon sentezinin baskılanması
	NS2 (NEP)	Nüklear eksport protein	Progeni nükleokapsidlerin sitoplazmaya taşınması

2.1.1.3. Replikasyon

İnfluenza negatif sarmallı bir RNA virüsüdür. Bu nedenle replikasyondan önce enzimlerin sentezi için pozitif polariteli mRNA oluşturulması gerekir. İnfluenza A ve B virüsleri, HA glikoproteinleri ile konak hücrenin glikokaliks tabakasındaki sialik asit reseptörüne bağlanır. İnfluenza C virüsü ise bu bağlanma olayını HEF proteini ile sağlar. Hücreye tutunan virüs endositozla hücreye girer ve HA'nın üç boyutlu yapısında modifikasyonlara sebep olur. Bu sayede proteinin hidrofobik füzyon başlatan bölgeleri açığa çıkmış olur ve viral zarf, endozomal membranla birleşir. M2 proteini ile meydana gelen kanallar, NP ve M1 arasındaki bağlantıyı koparmak için zarf içeriğinin asidifikasyonunu başlatır, nükleokapsid, kılıfın yırtılmasına ve sitoplazma içerisine atılmasına imkân sağlar (Çelebi ve Ayyıldız 2008).

Konak hücrede replikasyon proteinlerinin üretimi için öncelikle transkripsiyon gerçekleşir. İnfluenza nükleokapsidi nükleusa gider ve mRNA'ya çevrilir. RNA konak hücrenin nükleusuna gidince PA, PB1 ve PB2, hücresel RNA polimeraz II ile primer mRNA transkripsiyonunu başlatır (Yıldırım 2019).

İnfluenza A ve B virüsünde genomun 8 segmentinin translasyonu ile 10 protein kodlanmaktadır. Bunlar HA, NA, PB1, PB2, NP, PA, M1, M2 ve iki NS proteinleridir. Viral genomun replikasyonu virüs tarafından kodlanan aynı polimeraz proteinleri ile sonlanır. Sekiz RNA segmentinin plazma membranına gelmesi ile tomurcuklanma başlar. NA membrandaki sialik asit reseptörlerinin yıkımını sağlar ve tomurcuklanma ile virüs hücreyi terk eder (Çelebi ve Ayyıldız 2008).



Şekil 3. İnfluenza Virüsünün Replikasyonu (Gökçe 2019)

2.1.1.4. Antijenik Varyasyon

İnfluenza virüsü mevsimsel özellik gösterir ve ılımlı iklime sahip ülkelerde iyi gözlemlenmektedir. Dolaşımda olan bir önceki virüsün yerine antijenik varyantı geldiği gözlenmektedir. İnfluenza, solunumsal virüsler arasında en çok antijenik varyasyon gösterendir. “Drift” ve “shift” olmak üzere iki ana değişiklik görülür (Yıldız 2016).

2.1.1.4.1. Antijenik drift (Antijenik Sürüklenme)

Viral transkripsiyonlar sırasında nokta mutasyonlar meydana gelebilir ve viral RNA polimeraz enziminin hata düzeltme yeteneği yoktur. Bu mutasyonların çoğalması ile HA ve NA glikoproteinlerinde minör değişimler olur (Yıldız 2016). Bu duruma antijenik drift denir. H1 molekülünde Ca1, Ca2, Cb, Sa ve Sb olmak üzere yine 5 antijenik domain, H3 molekülünde ise A, B, C, D ve E olmak üzere 5 tane antijenik domain saptanmıştır. Bu antijenik bölgelerdeki tek bir mutasyon bile antijenik varyasyona neden olabilmektedir (Çıplak 2011). Görülen nokta mutasyonların büyük çoğunluğu nötral olup proteinlerin konfürmasyonunu etkilemezken bazı mutasyonlar, konak antikorlarının bağlanmalarını etkileyecek biçimde virüs proteinlerinde değişikliklere sebep olurlar (Öksüz 2017). Bu nedenle dolaşımda olan suşlara karşı bulunan antikorlar, yeni virüslere koruma sağlamayabilir ve oluşan bu yeni suşlar epidemilere neden olur (Yıldız 2016).

2.1.1.4.2. Antijenik shift (Antijenik Kayma)

Sadece İnfluenza A virüslerinde ortaya çıkan ve majör antijenik değişimlere sebep olan antijenik shift, iki mekanizma ile gelişir. Bunlardan birincisi, insan-insan, kanatlı-kanatlı ve insan-kanatlı virüsleri arasında gerçekleşen harmanlanma sonucunda gerçekleşen antijenik shifttir. İkincisi ise kanatlı ya da domuz virüslerinin direkt olarak insan popülasyonuna transmisyonu ve bu popülasyona yerleşerek mevcut virüslerin yerini almasıyla oluşan antijenik shifttir (Çıplak 2011). Böylece önceden dolaşımda bulunup izole edilen virüslerden farklı NA ve/veya HA glikoproteinlerine sahip yeni

bir influenza A virüsü alt tipi oluşur. Yeni suş ve eski suş arasında benzerlik çok azdır veya yoktur. İnsanlar yeni antijene karşı bağışık olmadığından hastalık pandemi ile sonuçlanır. İnsanlarda yeni pandemik suşların, transferle geçtiği ya da dolaşımdaki insan influenza virüslerinin kanatlılar ve domuz influenza virüsleri ile gen alışverişi yapmasıyla ortaya çıktığı bilinmektedir (Us Dürdal 2010). Yıllarca epidemiyeye neden olup saklı kalan ve pandemi oluşmasına kadar değişiklik göstermeyen virüsler de pandemiye neden olabilmektedir (Özdemir 2018). Geçtiğimiz yüzyılda antijenik sapma sonucunda toplam dört pandemi meydana gelmiştir: 1918’de H1N1 alt tipi ile “İspanyol Gribi”, 1957’de H2N2 alt tipinin mevcut H1N1’in yerini almasıyla ortaya çıkan “Asya Gribi”, 1968’de H3N2 alt tipinin mevcut H2N2’nin yerini almasıyla “Hong Kong Gribi” ve son olarak da 1977’de H1N1 alt tipinin yeniden dolaşıma girmesiyle meydana gelen “Rus Gribi”dir. 21. yüzyılın ilk pandemisine neden olan pdm A(H1N1) 2009 virüsü de antijenik sapma sonucunda kanatlı, insan ve domuz influenza virüslerinin gen segmentlerinin harmanlanmasıyla ortaya çıkmıştır (Çıplak 2011).

2.1.2. Epidemiyoloji

İnfluenza virüsleri tüm dünyada yaygın olmakla beraber her sene kuzey yarımkürede kış aylarında, güney yarı kürede ise yaz aylarında salgınlara neden olmakta ve önemli morbilite ve mortaliteye yol açmaktadır. Tropikal bölgelerde tüm yıl boyunca görülebilmektedir. Her sene dünya nüfusunun %-15’ini etkileyen influenza epidemileri, yaklaşık olarak 500 bin kişinin ölümüne neden olmaktadır (Russell et al 2008). ABD’de influenza nedenli hastaneye yatış oranı ortalama 114000 kişi iken, ölüm oranları 20000 ile 40000 arasındadır (Centers for Disease ve Prevention 2006). Ülkemizde ilk pandemik grip (swine influenza) vakası 17 Mayıs 2009 tarihinde kayıtlara geçerken, ilk yerli olgu 18 Haziran 2009’ da bildirilmiştir. İlk defa okul salgını ise ekim ayında yaşanmıştır ve bu olaydan on gün sonra ilk ölüm vakası bir sağlık çalışanında görülmüştür. Aralık ayından itibaren azalma dönemine giren pandemide son ölüm bildirimini 6 Mart 2010’da yapılmıştır (Sorrell et al 2005).

Epidemilerin aniden başlayıp iki-üç haftada pik yapmaları ve uzun süre devam edip toplumda hastalık yapmaları karakterizedir. Özellikle okul çağı çocukların yayılışa hız kazandırdığı bilinmektedir. Bu duruma virüsün damlacık yoluyla yayılması veya direkt bulaş şeklinde sebep olduğu gözlenmektedir. Ayrıca epidemiler sırasında genellikle tek influenza suşu hakimdir ve nadiren iki farklı suş veya iki farklı subtip eş zamanlı etkinlik gösterebilir. Araştırmalara göre mortalite oranları suşlara göre farklılık göstermektedir. Örneğin H3N2 suşu ile oluşan epidemiler H1N1 suşu ile oluşanlara göre daha yüksek mortalite oranlarına neden olmaktadır (Treanor 2005). Tüm dünyada hızla yayılarak sağlık, ekonomi ve sosyal açıdan önemli kayıplara neden olmaktadır. Hastalığın epidemi ya da pandemilerde çok sayıda insanda aynı zamanda başlaması, infekte kişinin duyarlı kişilere virüs bulaştırmasının sonucudur (Tunç ve Atıcı 2020). Ayrıca toplumun bağışıklık düzeyi, kronik hastalıkların varlığı, immün sistemin baskılanmasının etkisi, sigara içme alışkanlığı, gebeliğin duyarlılığa etkisi de epidemilerin meydana gelmesine neden olmaktadır (Şanlı 2010). İnfluenzaya bağlı komplikasyonla karşılaşma ihtimali olan gruplar Tablo 3'te gösterilmiştir.

Tablo 3. İnfluenzaya bağlı komplikasyon gelişme riski olan gruplar (Grohskopf, Alyanak, Broder, Walter, Fry and Jernigan 2019).

6 ila 59 aylık çocuklar
6 aylık 18 yaş arası olup uzun süre aspirin kullanan kişiler
Huzurevleri veya diğer kronik bakım merkezlerinde yaşayanlar
50 yaş ve üzeri kişiler
Gebeler ve hamile olma ihtimali olanlar
Morbid obezler
Kronik tıbbi hastalığa sahip olanlar
Astım, kronik akciğer hastalıkları
Kardiyovasküler hastalıklar
Kronik böbrek yetmezliği
Karaciğer yetmezliği
Diabetes mellitus
Orak hücreli anemi hemoglobinopatiler
İnsan immünyetmezlik virüsü (HIV) ile infekte kişiler

Tablo 3. (devam) Influenzaya bağlı komplikasyon gelişme riski olan gruplar
(Grohskopf, Alyanak, Broder, Walter, Fry and Jernigan 2019).

Organ veya hematopoietik kök hücre nakli alıcıları
İmmünsüpresan ilaçlarla tedavi edilen inflamatuvar hastalıklar
Kronik nörolojik hastalıklar

2.1.3. Sürveyans

İnfluenza sezonunun başlangıç ve bitiş zamanını tespit etmek için yapılan sürveyans çalışmaları, dolaşımdaki suşların erkenden tespit edilip gerekli antiviral tedaviye başlanmasıyla mortalite sayısını azalmasına yardımcı olduğu görülmektedir (Zambon et al 2009).

Gribin pandemiyle hızlı şekilde yayılması ve dünyanın her tarafında görülmesi nedeniyle DSÖ Global İnfluenza Sürveyans ve Yanıt Sistemi (GISRS) isimli bir iletişim ağı kurmuştur. Bu aę sayesinde dünyada dolaşımda olan influenza virüslerin subtipleri ve antijenik yapısı takip edilmektedir. Ayrıca virüs izolasyonlarının belirlenmesi ve ilgili laboratuvarlara bilgi aktarılması ile gelecek yıl için aşı üretimine yardımcı olmaktadır (Çıplak 2011).

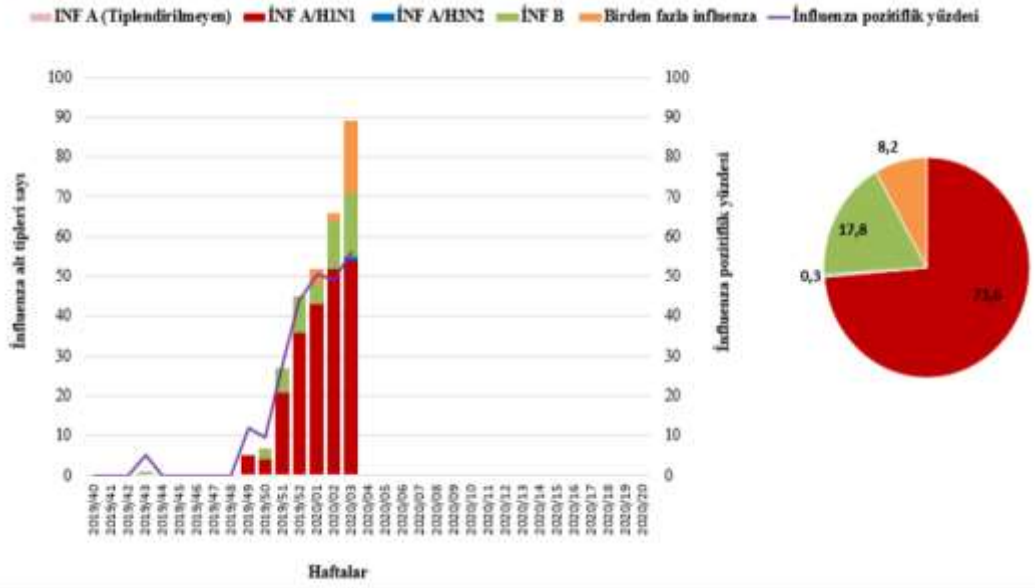
Ülkemizde dolaşımda olan virüslerin takibi 2004 yılından itibaren sentinel ve non-sentinel influenza sürveyansı olmak üzere iki şekilde yapılmaktadır. Non-sentinel influenza sürveyansı kapsamında, Türkiye genelinde belirlenen merkezler dışındaki sağlık kurumlarından gönderilen ve vaka tanımına uyan kişilerin numuneleri ile vaka bilgi formları değerlendirilmektedir. Sentinel influenza sürveyansı kapsamında ise sınırlı sayıda belirlenen noktalardan rutin veri toplanmaktadır. 2005 yılından beri uygulanan Sentinel influenza benzeri hastalıklar (İBH) sürveyansının veri toplamada yetersizliği sebebiyle 2015 yılı sonunda SARI (Severe Acute Respiratory Infections /Ağır Akut Solunum Yolu Enfeksiyonu) sürveyansı uygulanmaya başlamıştır. 2017'den beri influenza sezonu (yılın 40. Haftasıyla sonraki yılın 20. Haftası arası), web tabanlı Halk Sağlığı Yönetim Sistemi (HSYS) modülünden takip edilmektedir. Doktorlardan ve hastanelerden elde edilen haftalık veriler değerlendirildikten sonra

Halk Sağlığı Genel M¼d¼rl¼ę¼ (HSGM) Bulaşıcı Hastalıklar Dairesi Başkanlığı haftalık analiz yapmaktadır. Analizlerin sonuçları Sağlık Bakanlığı web sayfasında rapor halinde yayınlanmaktadır (Pandemik İNFLUENZA Ulusal Hazırlık Planı 2019).

Tablo 4. Sentinel İBH ve Sentinel SARI S¼rveyans Merkezleri (Pandemik İNFLUENZA Ulusal Hazırlık Planı 2019)

Sentinel İBH	Adana	İstanbul	Samsun
S¼rveyans	Ankara	İzmir	Sivas
Merkezleri	Antalya	Kars	şanlıurfa
	Bursa	Kocaeli	Tekirdağ
	Diyarbakır	Konya	Trabzon
	Edirne	Malatya	Uşak
	Erzurum	Muğla	Van
Sentinel SARI	Adana	Erzurum	Samsun
S¼rveyans	Ankara	İstanbul	İzmir
Merkezleri			

2019-2020 influenza sezonunun ilk 6 haftasına bakıldığında numunelerde influenza A/H1N1 t¼r¼n¼n en sık rastlanan influenza t¼r¼ olduğu g¼r¼lmektedir. (şekil 4) (Pandemik İNFLUENZA Ulusal Hazırlık Planı 2019).



Şekil 4. Ülkemizde Sentinel SARI numunelerindeki İnfluenza pozitiflik yüzdesi, İnfluenza alt tipleri sayısı ve pozitif numunelerin alt tipinin yüzde dağılımı, 2019-2020 İnfluenza sezonu (Pandemik İnfluenza Ulusal Hazırlık Planı 2019)

2.1.4. Klinik Özellikler

İnfluenza enfeksiyonları erişkinlerde asemptomatik belirtilerden pnömoniye kadar değişebilen tablolar göstermektedir. En önemli belirtisi yaklaşık 3 gün süren 38-40 °C arası ateştir. Halsizlik, baş ağrısı, kas ağrısı, boğaz ağrısı, öksürük ise gözlenen diğer belirtilerdir. Bulantı, kusma, ishal şikayetleri çocuklarda daha yaygındır. En sık rastlanan komplikasyonlar akciğerle ilgili olan “Primer viral pnömoni” ve “Sekonder Bakteriyel Pnömoni” şeklindedir. Akciğer dışı komplikasyonlar ise Miyozit, Miyokardir, Perikardit, Ensefalit ve nadiren Guillain-Barre Sendromu’dur. Ayrıca hastalığın ilk günlerinde yüz kızarıklık, cilt sıcak ve nemli olup; burun akıntısı / tıkanıklığı, hapşırma sık görülür (Özdemir 2018). Tam iyileşme hali 1-2 hafta veya daha uzun zaman sürede olabilir (Yıldırım 2019).

Tablo 5. CDC'nin Pandemik grip olguları klinik bulguları kategorileri (Balkan 2013)

Hafif veya nonkomplike olgular	İlerleyici hastalık (Tipik sendromlara ilaveten)	Ağır veya komplike olgular
Ateş	Göğüs ağrısı	Oksijen desteği gerektiren hipoksi
Öksürük	Takipne	Akciğer grafisinde patoloji
Boğaz ağrısı	Hipoksi	Mekanik ventilator ihtiyacı
Burun akıntısı	Hipotansiyon	Ensefalit, Ensefalopati
Kas ağrısı	Bilinç bulanıklığı	Şok, Organ yetmezliği
Baş ağrısı	Ağır sıvı kaybı	Myokardit veya rabdomiyoliz
Bitkinlik	Altta yatan hastalığın alevlenmesi	Sekonder bakteriyel enfeksiyon bulguları
İshal veya kusma	-	-

2.1.5. Laboratuvar Tanısı

2.1.5.1. Örneklerin Toplanması ve saklanması

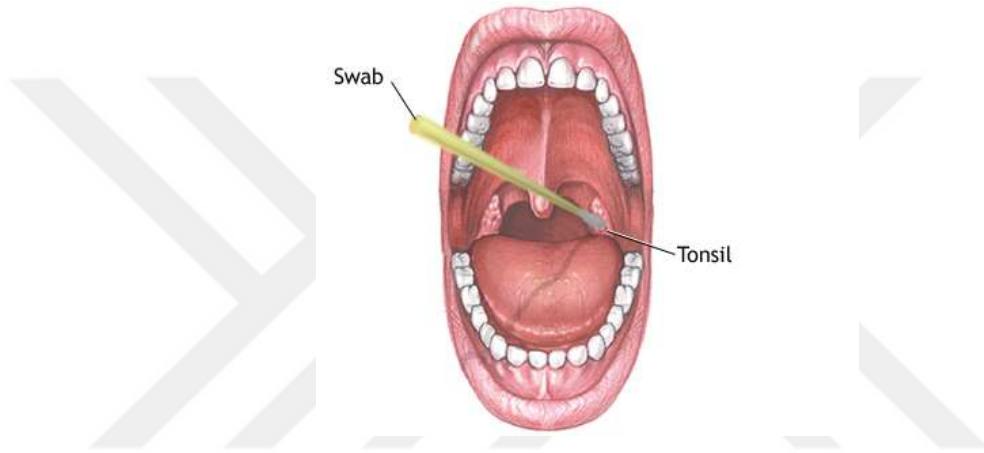
İnfluenza virüslerinin tanısında numune kalitesi, saklanması ve laboratuvara gönderim koşulları önemlidir. Numuneler hastalık belirtilerinin başlangıcından itibaren ilk 3 gün içerisinde ve antiviral ilaç tedavi başlanmadan önce alınmalıdır. Daha sonraki günlerde alınan numune virüsün saptanma olasılığını azaltmaktadır. Tanıda kullanılacak numune tipleri tablo 6'da verilmiştir. Çalışılacak solunum yolu örnekleri virüs taşınması için özel olarak hazırlanan VTM (Viral Transport Medium) içerisine alınarak laboratuvara gönderilmelidir. Örnekler +4°C'de maksimum 4 güne kadar tutulabilir. Fakat uzun süre saklanacaksa -70°C'de tutulması uygundur.

Tablo 6. Solunum yolu enfeksiyonları teşhisinde kullanılacak örnek çeşitleri (Pandemik İnfluenza Ulusal Hazırlık Planı 2019)

Burun sürüntüsü	Boğaz çalkantı suyu	Endotrakeal aspirat
Boğaz sürüntüsü	Bronkoalveolar lavaj	Nazotrakeal aspirat
Nazofarengal sürüntü	Akciğer biyopsisi	Orotakeal aspirat
Nazal/ Nazofaringeal aspirat	Postmortem akciğer doku	Trakeal doku

Numune alma prosedürleri:

Boğaz sürüntüsü numunesi için ağız içi ve farinks net görülecek şekilde aydınlatılır. Dil, bir dil basacağı ile bastırılıp steril eküvyon tonsillalar üzerine döndürülür. Bu işlem sırasında eküvyonun yanak iç kısımlarına ve dile değdirilmemesine dikkat edilmelidir. (Şekil 5) Plastik saplı steril dakron eküvyon ile tonsiller ve posterior farinkse sürütülerek alınan örnek, virolojik incelemeler için VTM içerisine konulur. Boğaz sürüntü örneği genellikle influenza virüsünün replike olmadığı squamoz epitel hücreleri içermektedir. Bu yüzden burun ve boğaz sürüntüsü birlikte alınmalıdır.



Şekil 5. Boğaz Sürüntüsü Alınması

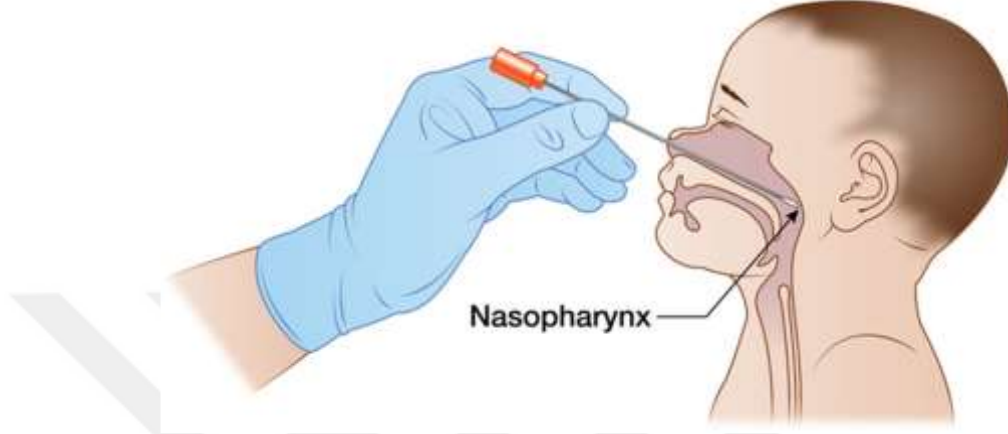
(<https://medlineplus.gov/ency/imagepages/9950.htm> 'dan uyarlanmıştır.)

Burun sürüntüsü için ince saplı bir steril eküvyonla (dacron/polyester eküvyon) nazal mukozaya değecek şekilde örnek alınır (Şekil 6) Diğer burun deliği için yine aynı eküvyonla işlem tekrarlanarak örnek VTM içerisine konur.



Şekil 6. Burun Sürüntüsü Alınması (Pandemik İnfluenza Ulusal Hazırlık Planı 2019)

Nazofaringeal sürüntü için gövdesi burgulu ve rahatça esneyebilen dacron uçlu eküvyonlar (viral örnekler için) tercih edilir. Burun deliğinden sokularak anterior burun boşluğunun ilerisine itilen eküvyon, fariks duvarına kadar ulaşıp döndürüldükten sonra geri çekilir. (Şekil 7) VTM içerisine alınan örnek, viroloji incelemesi için laboratuvara götürülür.



Şekil 7. Nazofaringeal Sürüntüsü Alınması (Satzke, Turner, Virolainen-Julkunen, Adrian, Antonio, Hare, Henao-Restrepo, Leach, Klugman ve Porter 2013)

Nazofaringeal aspirat örneği için başı arkaya eğik şekilde oturtulan hastanın burun deliğine 1-1,5 ml steril serum fizyolojik verilir. Plastik bir kateter veya tüp, 2-3 ml serum fizyolojikle yıkanır. Tüp, damağa paralel şekilde burun içine sokulup nazofaringeal sekresyonlar aspire edilir. (Şekil 8) Diğer burun deliği içinde bu işlem uygulanır ve kateter geri çekilip şırıngadan ayrılarak aspirat hemen steril tüpe konulur.



Şekil 8. Nazofaringeal Aspirasyon Örneğinin Alınması (Pandemik İnfluenza Ulusal Hazırlık Planı 2019)

2.1.5.2. Hızlı Antijen Testleri

Klinik örneklerden direkt olarak virüse ait korunmuş antijenlerin tipe özgü spesifik monoklonal antikorlarla saptanması esasına dayanan direkt immünofloresan, immünoenzimatik testler (ELISA) ve immünokromatografik testler bulunmaktadır (Çıplak 2011). Direkt immunfloresan yöntemi İnfluenza virüslerini yüksek duyarlılıklarda tespit edebilmektedir fakat; iyi floresan mikroskopu kullanımı ayrıca bir teknik uzmanlık gerektirmektedir (Öksüz 2017). ELISA kısa sürede çok sayıda etkeni incelemek için yüksek duyarlı bir yöntemdir. Temel bileşeni enzimle konjüge edilmiş bir antikor olup, bunun faaliyeti ile reaksiyona substrat ilavesi sonucu renk değişikliği meydana gelir. Enzim aktivitesiyle oluşan renk değişikliği göz ile ya da spektrofotometreyle değerlendirilmektedir (Demircili 2018).

Hızlı antijen testlerinin en yaygın kullanılanı ise immünokromatografik testtir. Test üç bölgeden oluşmaktadır: örneğin konulduğu, işaretli antikorla bağlandığı ve oluşan immün kompleksleri tutan antikorların bulunduğu test bölgesi şeklinde. Örnek konulduktan sonra kapiller özellikle akım gerçekleşmekte; aranan antijen var olduğunda test bölgesinde renkli bir bant oluşmaktadır (Özdemir, Feyzioğlu ve Uğur 2021).

Hızlı antijen saptama testleri çok kısa sürede influenza A ya da B tespiti yapabilmektedir fakat influenza A'nın pozitif olması durumunda pandemik influenza 2009 (H1N1), mevsimsel influenza ya da hayvan kaynaklı influenza hakkında kesin sonuca varılamamaktadır (Sullivan, Jacobson, Dowdle and Poland 2010).

2.1.5.3. Embriyonlu Yumurtada Virüs İzolasyonu

İnfluenza virüsünün izolasyonunda hücre kültürü veya embriyolu tavuk yumurtasına inokülasyonu “altın standart” olarak kabul edilmektedir. Örnekler 11 günlük embriyonlu yumurtanın ilk üretim için amniyotik sıvısına ekim yapılır. Daha sonraki üretimler için allontotik sıvıya ekim uygun olmaktadır (Şekil 9). Ekim yapılan yumurtalar 3 gün 38°C’de inkübe edilir ve süre sonunda bu sıvılar alınıp

hemaglutasyon uygulanarak tanıya gidilir (Murray, Baron, Jorgensen, Pfaller and Tenenbaum 2003).



Şekil 9. Embriyonlu yumurtada virüs izolasyonu

(<http://www.virology.ws/2009/12/10/influenza-virus-growth-in-eggs/> 'den uyarlanmıştır.)

2.1.5.4. Hücre Kültüründe Virüs İzolasyonu

İnfluenza A ve B virüsleri primer rhesus maymun böbrek hücreleri (PRM) veya Madin-Darby Köpek Böbrek Hücresi (Madin-Darby Canine Kidney- MDCK) kültürlerinde üremektedir. Madin- Darby köpek böbrek hücrelerindeki üreme, sitopatik etkinin saptanması ve tavuk ya da kobay eritrositleri ile yapılan hemadsorbsiyon testiyle saptanır (Zambon 1998). Hücre kültüründe ürer fakat sitopatik etki yapmazlar. Virüsün üreme durumu Enzyme Immunoassay (EIA), Floresan Antikor (FA), hemadsorbsiyon gibi yöntemlerle saptanır. Kültürler -70°C'de dondurularak saklanır. İnfluenza A virüsünün sitopatik etkisi, hücrelerin dejenerasyonu ve yuvarlaklaşmasıyla karakterizedir. Fakat sitopatik etkinin görülmemesi ya da sitopatik etki belirlemenin güç olması,

2.1.5.5. Serolojik Tanı

Serolojik tanı, enfeksiyonun akut devrede ve 2-3 hafta sonra alınan kan örnekleri arasındaki antikor artışının dört kat veya daha fazla saptanmasıyla yapılır (Özdemir 2018). İnfluenza virüs enfeksiyonlarının saptanması ve virüs tiplendirilmesinde

kullanılan yöntemlerdir fakat akut enfeksiyonun gösterilmesinde hem akut hem de iyileşme dönemindeki her iki seruma da ihtiyaç olduğundan daha çok retrospektif çalışmalar için kullanılır (Wang and Taubenberger 2010). Genellikle Enzyme Immunoassay (EIA) tekniği kullanılmaktadır. Bunun dışında Hemagglütinasyon İnhibisyon testi, Single Radial Diffusion (SRD), kompleman birleşmesi (KB), Double Immundiffusion (DID) testleri de uygulanabilir (Karaarslan 2019).

2.1.5.6. Moleküler Yöntemler

İnfluenza virüsünün tanısında birçok moleküler yöntem tercih edilmekle birlikte, en çok PCR temelli yöntemler kullanımdadır. Son yıllarda İnfluenza viral RNA'sının saptanmasında daha kısa sürede gerçekleşen ve daha duyarlı olan yöntemler tercih edilmektedir. (Öksüz 2017). İnfluenza virüslerinin tanısı için multipleks PCR, PCR-Enzyme Immuno Assay, Nucleic Acid Sequenced Based Amplification (NASBA), real-time PCR, microarray DNA gibi moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Günümüzde bu yöntemlerden en önemli olanı real-time PCR'dır. Bu yöntemde PCR ürünün çoğaltılması ve ortaya çıkan ürünlerin gözlenmesi eş zamanlı gerçekleşmektedir. PCR ürünü arttıkça, floresan işaretli ürün ve sinyal artar. Bu artış, çalışma sırasında cihaz ekranından takip edilebilmektedir. Nükleik asitin çoğaltılması ve sinyal tespitinin birlikte gerçekleşmesi, PCR ardından işlem gerektirmediğinden zaman tasarrufu sağlamaktadır. Bu test genellikle diğer solunum virüslerini de içeren multipleks paneller şeklinde piyasada bulunmaktadır (Özdemir, Feyzioğlu ve Uğur 2021).

2.1.6. Tedavi ve Korunma

2.1.6.1. Antiviral ilaçlar

Antiviraller, virüslerin çoğalmasını önlemek için doğrudan virüsleri etkileyen ilaçlardır. İnflüenzanın profilaksi ve tedavisinde yararlanılan antiviraller iki grupta toplanmaktadır: M2 (Matriks proteini) inhibitörleri (Amantidin, Rimantidin) ve NA (Nöraminidaz) inhibitörleri (Oseltamivir, Zanamivir, Peramivir). M2 inhibitörleri,

İnfluenza A virüslerinin M2 kanalına bağlanarak işlevini bozarlar. FDA'dan onay almasına rağmen sadece İnfluenza A virüslerine etkin olmaları ve yüksek seviyede direnç geliştirdikleri için yaygın kullanılmamaktadır. NA inhibitörleri, virüs salınımını ve replikasyonunu engelleyerek etki etmektedirler. Bunlar antivirallerden Oseltamivir, oral kullanımında biyoyararlanımı yüksek olduğu için ve tedaviye erken başlanıldığında hastalarda sağ kalım oranını önemli ölçüde etkilediği için yaygın kullanılmaktadır (Öksüz 2017).

Tablo 7. Tedavide Etkili Nöraminidaz İnhibitörü İlaçlar (Pandemik İnfluenza Ulusal Hazırlık Planı 2019).

Antiviral ilaç	Kullanım amacı	Hedef kitlesi	Yan etkileri
Oral Oseltamivir	Tedavi	Tüm yaşlarda	Bulantı*
	Profilaksi	3 ay ve üzeri	Kusma* Baş ağrısı Deri alerjik reaksiyonları Nadiren geçici nöropsikiyatrik ataklar
Inhale Zanamivir	Tedavi	7 yaş ve üzeri	Nadiren alerjik reaksiyonlar
	Profilaksi	5 yaş ve üzeri	Bronkospazm (özellikle sinüzit vb. solunum yolu rahatsızlıklarında) Çok nadiren geçici nöropsikiyatrik ataklar
Intravenöz Peramivir	Tedavi	2 yaş ve üzeri	Diyare
	Profilaksi	Profilakside kullanımı yoktur	Ciddi deri reaksiyonu Nadiren geçici nöropsikiyatri ataklar

*Bu yan etkiler geçicidir ve genellikle ilk dozdan sonra görülür.

İnfluenza virüslerinin replikasyon mekanizmasını hedefleyen RNA polimeraz ve nükleoprotein inhibitörleri de geliştirilmiştir. Bu ilaçlardan ikisi: Baloxavir marboxil ve Favipiravir'dir. Fakat şu anda yaygın olarak kullanılmamaktadır. Baloxavir marboxil Japonya, Amerika Birleşik Devletleri (ABD), Hong Kong, Avustralya ve Avrupa'da lisans altındadır, Favipiravir ise Japonya'da sınırlı kullanım için ve ABD ve Avrupa'da faz III klinik deneme kapsamında lisanslanmıştır (Bai, Jones, Wong and Zanin 2021).

2.1.6.2. Aşı

Mevsimsel influenzaya karşı her sene içeriği DSÖ'nün belirlediği sezonal influenza aşısı koruyucudur. Aşılamayla birlikte hastalık yükü ve sınırlı sayıdaki antiviral ilaçların kullanımı zamanla azalacaktır. Bugüne kadar üretilen influenza aşıları dört şekildedir: inaktif, hücre kültürü kaynaklı, rekombinant ve canlı-attenüe (zayıflatılmış) aşılar. İçerikleri dünya genelinde ulusal influenza merkezleri ve DSÖ referans merkezlerinden gönderilen veriler analiz edilerek belirlenir. Her sene Eylül ve Şubat aylarında DSÖ Küresel İnfluenza Programı çerçevesinde sonraki influenza mevsimi için aşı içerikleri belirlenmektedir. Güney yarımkürede Nisan-Eylül, Kuzey yarımkürede ise Ekim-Mart aylarında belirlenen virüsler değerlendirilmektedir. 2010-2015 yılları arasında ülkemizde tespit edilen influenza virüs antijenik tipleri ve aşı içeriğindeki virüslerin karşılaştırılması tablo 9'da gösterilmiştir. Halihazırda olan sezonal influenza aşıları 2 influenza A- 1 influenza B antijeni veya 2 influenza A- 2 influenza B antijeni olmak üzere üç veya dört antijen içermektedir. İnfluenza aşısının Ekim ayından itibaren influenza sezonu boyunca uygulanması önerilmektedir (Murray and Skull 2002).

Tablo 8. 2010-2015 yılları arasında ülkemizde tespit edilen influenza virüs antijenik tipleri ile aşı içeriğindeki virüslerin karşılaştırılması (Altaş, Bayraktar ve Korukluoğlu 2016)

Sezon	Tip / Alt tip	Aşı içeriği	Türkiye bulguları
2014-2015	A(H1N1) pdm09	A/California/7/2009	A/California/7/2009
	A(H3N2)	A/Texas/50/2012	A/Switzerland/97 15293/2013
	B	B/Massachusetts/2/2012 (Yam)	B/Massachusetts/2/2012 (Yam) B/Phuket/3073/2013 (Yam)
2013-2014	A(H1N1) pdm09	A/California/7/2009	A/California/7/2009
	A(H3N2)	A/Victoria/361/2011, A/Texas/50/2012	A/Victoria/361/2011, A/Texas/50/2012
	B	B/Massachusetts/2/2012 (Yam)	B/Massachusetts/2/2012 (Yam)
2012-2013	A(H1N1) pdm09	A/California/7/2009	A/California/7/2009
	A(H3N2)	A/Victoria/361/2011	A/Victoria/361/2011
	B	B/Wisconsin/1/2010 (Yam)	B/Wisconsin/1/2010(Yam) B/Massachusetts/2/2012 (Yam)
2011-2012	A(H1N1) pdm09	A/California/7/2009	Saptanmadı
	A(H3N2)	A/Perth/16/2009	A/Victoria/361/2011
	B	B/Brisbane/60/2008 (Vic)	B/Brisbane/60/2008(Vic)
2010-2011	A(H1N1) pdm09	A/California/7/2009	A/California/7/2009
	A(H3N2)	A/Perth/16/2009	A/Perth/16/2009
	B	B/Brisbane/60/2008 (Vic)	B/Bangladesh/3333/2007 (Yam)

Tablo 9. 2015-2018 yılları arasında Kuzey Yarımkürede grip mevsiminde önerilen grip aşuları içeriği (WHO)

Sezon	Tip / Alt tip	Aşı içeriği
2017-2018	A(H1N1) pdm09	A/Michigan/45/2015
	A(H3N2)	A/Hong Kong/4801/2014
	B	B/Phuket/3073/2013 (Yam) B/Brisbane/60/2008 (Vic)
2016-2017	A(H1N1) pdm09	A/California/7/2009
	A(H3N2)	A/Hong Kong/4801/2014
	B	B/Phuket/3073/2013 (Yam) B/Brisbane/60/2008 (Vic)
2015-2016	A(H1N1) pdm09	A/California/7/2009
	A(H3N2)	A/Switzerland/9715293/2013
	B	B/Phuket/3073/2013 (Yam) B/Brisbane/60/2008 (Vic)

Tablo 10. 2018-2021 yılları arasında Kuzey Yarımkürede grip mevsiminde önerilen grip aşuları içeriği (Haftalık İnfluenza Raporları 2018-2021)

Sezon	Suşı çeşidi	Aşı içeriği
2020-2021	Dörtlü(quadrivalan) aşı içeriği	A/Guangdong-Maonan/SWL1536/2019 (H1N1) pdm09
		A/Hong Kong /2671/2019 (H3N2)
		B/Washington/02/2019-(B/Victoria)
		B/Phuket/3073/2013-(B/Yamagata)
		A/Hawaii/70/2019 (H1N1) pdm09
	Üçlü (trivalan) aşı içeriği	A/Hong Kong /45/2019 (H3N2) benzeri virüs
		B/Washington/02/2019-(B/Victoria)
		B/Phuket/3073/2013-(B/Yamagata)
		A/Guangdong-Maonan/SWL1536/2019 (H1N1) pdm09
		A/Hong Kong /2671/2019 (H3N2)

Tablo 10. (Devamı) 2018-2021 yılları arasında Kuzey Yarımkürede grip mevsiminde önerilen grip aşuları içeriği (Haftalık İnfluenza Raporları 2018-2021)

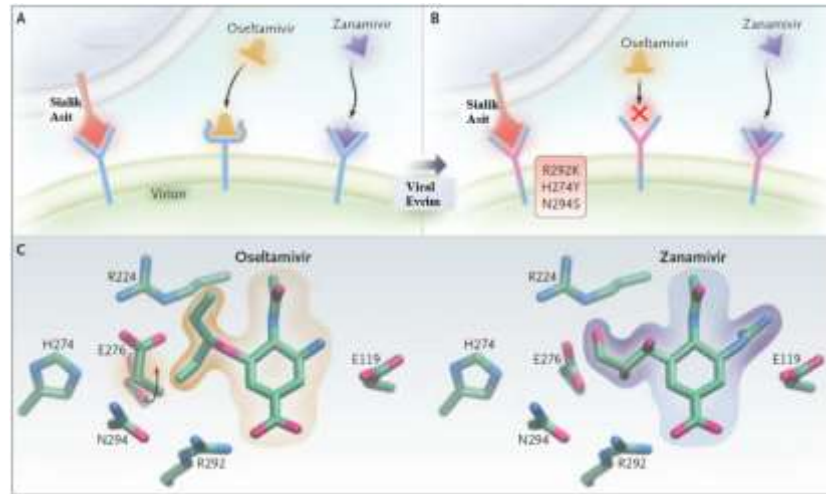
		B/Washington/02/2019-(B/Victoria)
		A/Hawaii/70/2019 (H1N1) pdm09
		A/Hong Kong /45/2019 (H3N2)
		B/Washington/02/2019-(B/Victoria)
2019-2020	Dörtlü	A/Brisbane/02/2018 (H1N1) pdm09
	(quadrivalan) aşısı içeriği	A/Kansas /14/2017 (H3N2)
		B/Colorado/06/2017-(B/Victoria/2/87)
		B/Phuket/3073/2013- (B/Yamagata/16/88)
	Üçlü (trivalan) aşısı içeriği	A/Michigan/45/2015 (H1N1) pdm09
		A/Kansas /14/2017 (H3N2)
		B/Colorado/06/2017- (B/Victoria/2/87)
2018-2019	Dörtlü	A/Michigan/45/2015 (H1N1) pdm09
	(quadrivalan) aşısı içeriği	A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2)
		B/Colorado/06/2017- (B/Victoria/2/87)
		B/Phuket/3073/2013- (B/Yamagata/16/88)
	Üçlü (trivalan) aşısı içeriği	A/Michigan/45/2015 (H1N1) pdm09
		A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2)
		B/Colorado/06/2017- (B/Victoria/2/87)

2.1.7. Direnç

Nöraminidaz inhibitörlerinde direnç iki şekilde gerçekleşmektedir. İlk yol NA geninin aktif enzim kısmındaki aminoasitlerde değişime neden olan mutasyonlardır ve aktif bölge ile ilaç arasındaki etkileşimi bozan ilacın inhibitör etkisini azaltır. Bu durum oseltamivir bağlanmasında morfolojik değişiklik sorunu çıkartırken Zanamivir de değişiklik göstermez. Bu nedenle NA molekülünde oluşan mutasyonlar Oseltamivir direnci oluştururken zanamivir direnci görülmez. Moleküler çalışmalarda NA molekülünde Oseltamivir yan zincirini içine alan kovuğun oluşması için E276 aminoasidinin rotasyon yaparak R224 ile bağ kurması gerektiği fakat R292K, N294S

ve H274Y mutasyonlarının E276 rotasyonunu engelleyerek kovuk oluşmasını dolayısıyla Oseltamivirin NA'ya bağlanmasını engellediği görülmüştür (Çıplak 2011). NA'nın aktif bölgesinde oluşan şekil değişikliğiyle Oseltamivirin bağlanması için bir kovuk oluşur, zanamivir bağlanması için morfolojik değişikliğe gerek yoktur (Şekil 10.a.). Meydana gelebilecek mutasyonlardan herhangi biri aktif bölgedeki morfolojik değişikliğin oluşumuna engel olarak Oseltamivirin bağlanmasına da engel olur. Fakat oseltamivir direnci meydana gelen virüs konak hücredeki sialik asit reseptörüne ve zanamivire bağlanabilme özelliğini devam ettirir (Şekil 10.b.). E276 aminoasidi rotasyon yaparak R224 aminoasidiyle bağ kurar ve kovuk oluşur. R292K, N294S ve H274Y mutasyonları aminoasitler arasında meydana gelen rotasyonunu engeller. Kovuk oluşumunun engellenmesi sonucu Oseltamivir bağlanamaz ve virüs Oseltamivire karşı direnç kazanır (Şekil 10.c.) (Çıplak 2011).

Dirence neden olan ikinci yol ise HA'nın sialik asit bağlanma bölgesinde mutasyonların meydana gelmesidir. HA'daki değişikliklerin ilaç duyarlılığının azalmasına etkisi net bir şekilde bilinmemektedir. Fakat HA ile sialik asit reseptörü arasındaki etkileşimin değişmesinden meydana gelen reseptör afinitesindeki azalmanın ilaç direncine neden olduğu düşünülmektedir (Zambon 1998).



Şekil 10. Oseltamivir direnç mekanizması (Moscona 2005)

DSÖ'nün influenza A virüsüne karşı tavsiyesi oseltamivir kullanımınıdır. Fakat 2007-2009 yılları arasında tüm mevsimsel influenza A(H1N1) virüslerinde H274Y

mutasyonunun neden olduğu oseltamivir direnci gözlenmiştir. 2009 yılında dirençli mevsimle İnfluenza A/H1N1 virüslerinin yerini oseltamivire genellikle duyarlı olan ve tüm dünyada yaklaşık %1 oranında oseltamivir direnci görülen pandemik İnfluenza A 2009 H1N1 virüsü almıştır. Fakat 2011 yılında dikkat çekici derecede artan (yaklaşık %24) H274Y mutasyonu, NA (N1) proteininin 274. Pozisyonunda bulunan Histidin aminoasidinin Tirozine dönüşümü (H274Y) şeklinde ifade edilir ve oseltamivir direncinin genetik işaretidir. (Öksüz 2017). Bu direncin artışı, tüm dünya ülkelerini direnç sorununa karşı harekete geçirmiş ve antiviral direnç çalışmaları başlatılmıştır.

2.1.8. Antiviral Direnç Saptama Yöntemleri

İnfluenza antiviral direnci iki yolla saptanmaktadır; NA enzim inhibisyon yöntemi ve moleküler saptama teknikleri. Antiviral duyarlılık testleri daha çok epidemiyolojik çalışmalar için kullanılmaktadır.

NA enzim inhibisyon yöntemi geleneksel bir yöntemdir ve hücre kültürleri kullanılarak yapılır. Hücre kültürlerinde virüs, antiviralin çeşitli konsantrasyonlarına maruz bırakılır. Antivirale karşı oluşan direncin virüsün çoğalmasına etkisi araştırılır. Dirençli virüslerin genetik analizi yapılarak dirence neden olan mutasyon saptanır.

Moleküler teknikler, klinik örneklerle direkt uygulanabilmesi ve cansız virüslerin kullanılabilmesi açısından diğer yöntemlere göre daha avantajlıdır (Öksüz 2017). Bu yöntemler klasik dizileme ve yeni nesil dizileme (NGS-New Generation Sequencing) teknolojileri şeklindedir. Klasik dizileme yöntemleri: Sanger dizileme ve Maxim Gilbert dizilemesi'dir. NGS yöntemleri: Kitlesel Paralel Dizileme, Poloni dizilemesi, Pirodizilemesi, Solexa dizilemesi, SOLID dizilemesi, İyon yarı iletken dizilemesi, DNA nanotop dizilemesi'dir (Petterson, Lundeberg and Ahmadian 2009).

Sanger dizileme olarak isimlendirilen zincir sonlandırma yönteminde tek iplikli kalıp DNA, primer, DNA polimeraz, normal deoksiribonükleotid trifosfatlar (dATP, dGTP, dCTP ve dTTP) ve zincir uzamasını sonlandıran modifiye dideoksiribonükleotid trifosfatlar (ddNTP) kullanılmaktadır. Radyoaktif veya floresan moleküller ile

işaretlenmiş olan bu modifiye ddNTP'lar iki nükleotid arasında bir fosfodiester bağının oluşması için gerekli olan 3'-OH sahip değildirler. Bu nedenle ddNTP'lardan sonra yeni bir nükleotid eklenemediğinden zincir uzaması sonlanmış olur. Bu yöntemde her bir reaksiyonda farklı bir ddNTP'nin kullanıldığı dört farklı polimeraz zincir reaksiyonu paralel olarak gerçekleşmektedir. Dört reaksiyonun her birindeki DNA parçaları jel elektroforzinde yan yana yürütüldükten sonra bantların göreceli konumlarına bakılarak DNA dizisi okunmaktadır (Otlu ve Gürsoy 2018).

NA enzim inhibisyon yöntemi ile kombine kullanılan Pyrosekans yöntemi antiviral dirence neden olan mutasyonları saptayabilen bir sekanslama yöntemidir. Amantadin direncine neden olan mutasyonları saptamada başarılıdır fakat NA inhibitörlerine tam olarak karakterize edilememiştir (Öksüz 2017).

2.2. İNFLUENZA DIŞI SOLUNUM YOLU VİRÜSLERİ

2.2.1. Parainfluenza Virus

Paramyxoviridae ailesine dahil olan Parainfluenza virüsler, zarflı, negatif polariteli ve tek zincirli RNA virüsleridir. Şekilleri ve Sialik asit reseptörlerine olan afinitesi bakımından Ortomiksovirüslere benzerler fakat daha büyüktürler. Farklı yapılarla sahip 4 tip parainfluenza virüsü vardır. Bunlardan tip 4, sadece nötralizasyon veya hemadsorbsiyon inhibisyon testleriyle ayırt edilebilecek iki alt tipe (4a ve 4b) sahiptir (Akarsu Çelebi 2009).

Parainfluenza virüsler genellikle krup, üst solunum yolu infeksiyonları ve bazı hastalarda bronşiolit ile ilişkilidir. İnkübasyon süresi 3-6 gün olan virüsün solunum yollarında lokal olarak yayıldığı düşünülmektedir. Ilıman bölgelerde parainfluenza tip 1 infeksiyonları kış aylarında sık görülürken tip 3 yaz infeksiyonudur ve her sene küçük salgınlara neden olmaktadır. Tip 4 infeksiyonları, uygun reaktiflerin eksikliği nedeniyle yetersiz teşhis edilebilir ve raporlanan sayılar gerçek verilere göre düşüktür. Teşhis edilen infeksiyonların çoğu okul öncesi ve ilkökul çocuklarındadır. Reinfeksiyonlar gelişebilir fakat fatalite nadirdir. Solunum sekresyonlarında bulunan

virüsler, infekte olmuş damlacıkların solunması ve kişiden kişiye temasla bulaşmaktadır (Tortora, Funke and Case 2016). Henüz aşısı yoktur. Moleküler yöntemlerle (RT-PCR gibi) virüs RNA'sı tespit edilmektedir. Nazofarengeal örneklerden immünfloresan boyama ile hızlı tanı testleri de uygulanabilir. Parainfluenza tip 4 daha nadir olmakla birlikte 1, 2 ve 3'ün immünfloresan tespiti için monoklonal antikor reaktifleri bulunur. ELISA (Enzim immün assay) yöntemleri ile viral antijenler tespit edilebilir ve virüs maymun böbrek hücre kültürlerinde izole edilebilir (Özdemir ve ark. 2021).

2.2.2. Human Metapneumovirus (hMPV)

Pneumoviridae ailesine dahil olan insan metapnömovirüsleri (hMPV-Human Metapneumovirus) zarflı, pleomorfik yapıya sahip RNA virüsleridir. Genom analizleri ile A ve B olarak iki genotipe ayrılmıştır. Yüzey glikoproteinleri bağlantı (G) ve füzyon (F) dizi değişikliğine göre bu iki genotip de A1, A2, B1, B2 alt gruplarına ayrılır (Devrim 2005, Broor and Bharaj 2007).

Klinik belirtileri özellikle çocuklarda Respiratuvar sinsityal virüsünden ayırt edilememektedir. Genellikle bronşit, bronşiolit ve pnömoni tanısı alan hastaların belirtileri öksürük, ateş, üst solunum yolu ve alt solunum yolu enfeksiyonları şeklindedir. Bulaş havadaki damlacıklarla olur. Çok az sayıda verilerde enfeksiyonun tedavisi ve kontrolü için ribavirin, immunoglobulin ve füzyon inhibitörleri kullanılabileceği düşünülmelidir (Çiçek 2014).

hMPV enfeksiyonunun tanısında hücre kültürü nadir, RT-PCR veya mütipleks RT-PCR gibi moleküler yöntemler daha yaygın kullanılmaktadır. Virüse karşı kontakta oluşan antikorlar immünfloresan ve ELISA ile saptanabilir (Öz ve Altındış 2018).

2.2.3. Respiratuvar Sinsityal Virüs (RSV)

Pneumoviridae ailesine dahil olan Respiratuvar sinsityal virüsü (RSV), zarflı, negatif polariteli ve tek zincirli RNA virüsleridir. Paramiksovirüslerden fiziksel farklılıklar ve

hemaglutinin, hemolizin ve nöraminidaz eksikliği nedeniyle ayrı bir cinse (pnömovirüs) yerleştirilir. Hücre bağlanması için reseptör olan bir G lipoproteine ve hem virüs penetrasyonuna hem de konakçıya yayılmasından sorumlu olan F proteinine sahiptir (Hall et al 2009).

Erken bebeklik döneminde bronşiolit şeklinde ciddi bir hastalığa neden olur. Çoğunlukla 1 yaş altındaki bebeklerde görülür. Bronkopulmoner displazi, konjenital kalp defektleri olan ve immün sistemi yetersiz veya baskılanmış kişilerde yaşamı tehdit edebilir. Ani bebek ölüm sendromlarının (SIDS-Sudden infant death syndrome) bir kısmında RSV tespit edilmiştir. Bronşiektazi ve astım gibi kronik solunum yolları hastalıklarına yatkınlık sağlayabildiği bilinmektedir. Büyük çocuklarda ve yetişkinlerde hava yolları geniş olduğu için infeksiyon daha hafif seyretmektedir. Yüzey proteinlerinde meydana gelen antijenik driftler nedeniyle reinfeksiyon gelişmekte ve aşının üretilmesini zorlaştırmaktadır (Hall et al 2009).

RSV sonbahar ve kış aylarında ortaya çıkar ve her yıl kış salgınlarına neden olur. Bu nedenle RSV epidemisi iklim faktörlerine aynı varyasyonu göstermez, yıl boyunca sporadik vakalar şeklinde görülür. Virüs hastalığın akut fazında RT-PCR, immünofloresan, ELISA veya kültürle nazofaringeal örneklerden kolaylıkla tespit edilebilir. Immünofloresan yöntemiyle 1 saatten daha kısa zamanda hızlı tanı konulabilir ve benzer sonuçlar ELISA ile de elde edilebilir. Bu yöntemlerin kültüre göre duyarlılıkları düşüktür ancak kültür sonuçları geç elde edildiğinden tedaviye katkısı sınırlıdır (Chu et al 2013).

Çoğu bebek semptomatik olarak tedavi edilebilir. Kemoterapi için mevcut tek spesifik antiviral ilaç, küçük partikül inhale ribavirin'dir. Akciğerlerin en çok etkilenen bölgeleri iyi havalanamadığından aerosolize ilacın klinik etkinliği tartışmalıdır. İnsan monoklonal antikolar ve hiperimmün RSV immünglobulinler gibi pahalı preparatlar, prematüre bebekler veya önceden bronkopulmoner displazisi olan hastalar gibi çok yüksek risk altındaki gruplarda kullanılabilir (Özdemir, Feyzioğlu ve ark. 2021).

2.2.4. Rhinovirus

Picornaviridae ailesine dahildir. Bu aile zarfsız, 30 nm çapında, ikozahedral kapsidle çevrelenmiş, tek iplikli, pozitif polariteli RNA genomuna sahip virüslerden oluşmaktadır. Rhinovirüs ve Enterovirüs cinslerinin morfolojileri tamamen aynıdır; klinik, biyofizik ve epidemiyolojik verilerle birbirlerinden ayrılmaktadır. Hayatın ilk yıllarında solunum yolu hastalığı etkeni olarak yaygın şekilde görülür. Ilıman iklimlerde sonbahar ve ilkbaharda salgınlara neden olur (Hershenson 2013). Üst solunum yolu semptomları 7 günden kısa sürmektedir. Sekonder olarak bakteriyel sinüzit ve orta kulak iltihabı gelişebilir. Astım ve kronik obstrüktif pulmoner hastalık alevlenmelerine neden olabilir. Klinik örneklerden RT-PCR yöntemiyle viral nükleik asit belirlenmesi duyarlı, özgül, hızlı ve güvenilirdir. Viral kültür yapılabilir fakat rutin laboratuvar uygulamalarında yer almaz. Tedavi için spesifik antiviral bulunmamaktadır ve tedavi çoğunlukla semptomlara yöneliktir (Özdemir, Feyzioğlu ve ark. 2021).

2.2.5. Enterovirüs

Enterovirüs infeksiyonlar tüm dünyada yaygın olarak görülür. 2014 yılında ABD’de ülke genelinde ağır solunum yolu salgınına neden olan Enterovirüs D68, özellikle çocuklarda sinir sistemi infeksiyonlarından sorumlu olduğu düşünülmektedir (Trip, Schonenberg, Starreveld and Versteegh 2009). Poliomyelit beneri hastalıkla ilişkili bulunmaktadır. Özellikle Asya kıtasında çocuklarda Enterovirüs 71 kaynaklı el-ayak-ağız hastalığı salgınları sık görülür. Enterovirüs 71 infeksiyonları fatal beyin sapı ensefaliti gibi ağır nörolojik hastalıkla ilişkilidir. Görülme sıklığı 12-23 aylık bebeklerde yüksek olsa da Enterovirüs 71 infeksiyonu 6 aydan küçük çocuklar ağır ve ölümcül hastalık bakımından en riskli gruptur. Bu risk yaş artışıyla beraber düşer (Özdemir, Feyzioğlu ve ark. 2021). Enterovirüslerin hücre kültüründen izolasyonu mümkündür ve virüs insan rabdomiyosarkom hücrelerinde üretilebilir. Tanı için burun sürüntüsü, nazofarengeal aspirat, bronkoalveolar lavaj örneği, kan ve beyin omurilik sıvısı kullanılarak moleküler yöntemlerden yararlanılabilir (Altındış ve Dal 2016).

2.2.6. Adenovirüsler (Human Adenovirus- HAdV)

Adenoviridae ailesine dahil olan insan adenovirüsleri (HAdV) zarfsız, ikosahedral, çift sarmallı DNA virüsleridir. İlk olarak insan adenoid doku kültürlerinden izole edilmiştir. HAdV türleri 7 grupta toplanmıştır (HAdV-A ila HAdV-G) ve günümüze kadar 67 HAdV serotipi raporlanmıştır. Bunlardan bazıları menenjit, keratokonjonktivit, faringokonjonktival ateş, solunum yolu enfeksiyonları, akut gastroenterit ve akut hemorajik sistite neden olan enfeksiyonlardır. Birçok tipi çocukluk döneminde enfeksiyona neden olurken, semptomlar hafif ve kendini sınırlayan üst solunum yolu enfeksiyonlarına kadar değişkenlik gösterir. Özellikle bakım evleri, askeri üsler, okullar gibi kalabalık yerlerde salgınlara yol açabilir. İnkübasyon süresi genellikle 4-8 gün arasındadır ve bu sürede çok bulaşıcıdır (Heim 2020). Yayılma olasılığı yüksek olup salgınlara neden olan serotipler HAdV tip 3,4,7,8,14 ve 55'tir. Enfeksiyonları bağışıklık sistemi baskılanmış kişiler hariç genellikle hayatı tehdit edici değildir. HAdV, viral konjonktivitin en yaygın nedenidir ve kriptik görünümlü akut farenjit yapar. Enterik suşları ise gastroenterite neden olur. Gastrointestinal Sistem (GIS), solunum yolu, göz ve mesane epitel hücrelerinde litik enfeksiyona sebep olur. Farklı serotiplerin farklı doku ve hücrelere tropizimleri vardır. Bazı adenovirüs türleri, adenoidlerde ve tonsillalarda latent olarak uzun yıllar kalırlar. Enfeksiyon başından itibaren aylarca dışkıyla atılırlar (Crenshaw, Jones, Bell, Kumar and Matthews 2019).

HAdV'ler dış ortamda dayanıklıdır. Klor ve etanol gibi düşük/orta seviyelerde dezenfektanlara ve ısı ile inaktivasyona ($\leq 60^{\circ}\text{C}$) dayanıklıdır. Bu sebeple HAdV'ler yüzeylerde yaklaşık 3-8 hafta kalıp enfeksiyon riski oluştururlar. Klor seviyesi düşük havuzlardan da bulaş meydana gelebilir (Coşgun 2021).

Tanı için moleküler yöntemlerden ELISA ve PCR testleri kullanılırken ayrıca dışkı hızlı antijen testleri de yaygın olarak kullanılmaktadır. Hücre kültüründen viral izolasyon, dışkı, solunum yolu ve konjonktival örneklerde HAdV'leri tespit etmek için kullanılan başka bir standart yöntemdir. Viral izolasyon için en güvenilir numune

dışkıdır. Tedavisi mevcut olmayan adenovirüs için tip 4 ve 7' ye karşı sadece 17-50 yaş arası askeri personel için aşı önerilmektedir (Crenshaw, Jones et al 2019)

2.2.7. Bocavirus (Human Bocavirus- HBoV)

Parvoviridae ailesine dahil olan insan Bocavirüsleri (HBoV) küçük, ikozahedral simetrik, zarfsız, tek zincirli negatif polariteli DNA virüsleridir. Dört türü vardır: HBoV-1, HBoV-2, HBoV-3 ve HBoV-4 şeklinde. Kış ve bahar aylarında daha sık görülen HBoV enfeksiyonları, virüsün solunum yolu epitel hücrelerini enfekte edip bu hücrelerin hasarına yol açmasıyla meydana gelmektedir. Soğuk algınlığı semptomlarıyla beraber burun akıntısı, öksürme ve akut otitis media görülür. Solunum veya dışkı örneklerinin serum örnekleriyle birlikte değerlendirildiği virüsün laboratuvar tanısı PCR ile yapılmaktadır ve FDA tarafından onaylanmış Multiplex PCR kitleri mevcuttur. HBoV enfeksiyonları için özel bir tedavi yoktur ve aşı mevcut değildir (Uzuner ve Karadenizli 2018).

2.2.8. Coronavirus

Coronaviridae ailesine dahil olan Koronavirüsler zarflı, tek zincirli, pozitif polariteli RNA virüsleridir. Dört alt tipi vardır: insanları infekte edebilen α - ve β - koronavirüsleri ile sadece hayvanlarda bulunan γ - ve Δ - koronavirüsleri şeklinde. Hayvanlardan insanlara bulaşabilen bu zoonatik virüsler, havadaki damlacıklar ve aerosoller yoluyla insanlar arasında enfeksiyonlara yol açmaktadır. İnsan enfeksiyonlarına yol açan türler için başlıca rezervuar hayvan yarasalar olsa da sığır, deve, hindi, domuz, kedi, köpek, fare, yaban gelinciği ve vizon gibi geniş hayvan rezervuarları vardır. İlk koronavirüs enfeksiyonları soğuk algınlığı nedeni olarak 1960 yılında bildirilmiştir. 2002' ye kadar dört infekte koronavirüs alt tipinin insanları infekte ettiği ve rutin olarak üst ve/veya alt solunum yolu enfeksiyonlarına neden olduğu bildirilmiştir. Bunlar: iki α - koronavirüs-229E ve NL63, iki β -koronavirüs OC43 ve HKU1'dir. 2002'de ilk ölümcül şiddetli akut solunum sendromuna (SARS- Severe acute respiratory syndrome) neden olan koronavirüsün ortaya çıkmasıyla koronavirüs kaynaklı hastalık anlayışı önemli ölçüde değişmiştir (Van Doremalen et al 2020).

Çin'in Guangdong Eyaletinde ortaya çıkan SARS-CoV, 29 ülkede sekiz binin üzerinde vaka ve yedi yüzün üzerinde ölüme neden olmuştur. 2012 yılında ise Suudi Arabistan'da bir hastada daha önce insanlarda rastlanmayan yeni bir β -koronavirüs bildirilmiştir. Orta Doğu Solunum Sendromuna neden olan ve MERS-CoV (Middle East respiratory syndrome-Coronavirus) olarak bilinen bu yeni koronavirüs 27 ülkede iki binin üzerinde vaka ve sekiz yüzün üzerinde ölüme sebep olmuştur. Son olarak 8 Aralık 2019'da Çin'in Hubei eyaleti Wuhan'da bildirilen ilk vakayla pnömونيye neden olan yeni bir koronavirüs türü bildirilmiştir. İlk zamanlar 2019-nCoV sonrasında ise SARS-CoV-2 olarak adlandırılan yeni virüs, insandan insana hızla bulaşan β -koronavirüs alt tipi olarak tanımlanmıştır. Virüsün neden olduğu Covid-19 hastalığı, Nisan 2021 itibariyle 137 milyonun üzerinde vaka ve 2.5 milyonun üzerinde ölüme yol açan pandemik bir hastalık olarak insanlığı tehdit etmektedir (Zhu et al 2020).

Koronavirüslerin genomu dört yapısal protein için gen içerir: zarf (E), membran (M), nükleokapsid (N) ve sivri uç (S). Virionları yüzeyde "Corolla" veya "çiçek yaprakları" şeklinde birden fazla 20 nm'lik başak benzeri uzantılarla karakterize, boyut olarak değişken (80-160 nm) lipid çift katmanlı zarflı partiküllerdir. Virion çekirdeğinde ikosahedral simetriye sahip bir nükleokapsid, merkezi net olan elektron yoğun bir tabaka içerir. Genomik nükleik asidi, virion montajı için genomik RNA'nın yanı sıra subgenomik protein kodlayan RNA'lar üreten bir negatif RNA replikasyon döngüsü ara maddesi gerektiren tek iplikli pozitif RNA'dır. Çekirdek ayrıca çeşitli koronavirüs türleri arasında önemli ölçüde farklılık gösteren yardımcı proteinlere de sahiptir. Hedef hücreye girmek için kullandıkları birincil reseptör ACE2 (anjyotensin dönüştürücü enzim II) reseptörüdür. Fakat bazı suşlar CD209L gibi alternatif reseptörleri de kullanırlar. ACE2 solunum yolunda, bağırsak mukozal hücrelerinde, damarların endotel hücreleri ve kalp hücrelerinde, böbrek epitel hücrelerinde, bağışıklık hücreleri ve serebral nöron hücreleri gibi hücreler üzerinde yaygın bulunur (Acar ve Koçak 2020 , Batirel 2020).

SARS-CoV-2 solunum damlacıkları, tükürük, mekanik olarak üretilen aerosoller ve dışkıda gösterilmiştir. Kuluçka süresi 2-14 gün arasında değişirken, ortanca kuluçka

süresi 5.1 gündür. Hane halkı buluşmalarının analizi, virüse maruz kalındıktan 3-7 gün sonra ateş ve solunum semptomlarının ortaya çıktığı yönündedir. Ateş, yorgunluk, kuru öksürük daha sık bildirilirken; burun tıkanıklığı, boğaz ağrısı, rinore ve kas ağrısı nispeten daha azdır. Bazen çarpıntı, ishal veya baş ağrısı gibi solunum dışı semptomlar solunum semptomlarından daha önce gelmektedir. Covid-19'un spektrumu asemptomatik ile ölümcül pnömoni arasında değişmektedir. Başlangıçta asemptomatik infeksiyonların çoğu sonunda semptomatik hale gelebilmektedir (Batirel 2020).

SARS-CoV-2 laboratuvar tanısı için preanalitik aşamada doğru solunum yolu örneğinin doğru anatomik bölgeden doğru zamanda alınması gerekmektedir. Analitik aşamada RT-PCR moleküler yöntemi kullanılmaktadır. Spesifik ilaç mevcut değildir fakat şiddetli Covid-19 tedavisinde remdesivir acil kullanım onayı verilen antivirallerden en bilinenidir. Ülkemizde içinde olduğu pek çok gelişmiş ülkede yüzlerce aşı araştırma aşamasındadır (Dikmen, Kına, Özkan ve İlhan 2020).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. ÇALIŞMA GRUBU

Çalışmamızda 12 Eylül 2019- 19 Şubat 2020 tarihleri arasında T.C. Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nin farklı kliniklerinden solunumsal yakınmaları olan hastaların gönderilen 354 örneğinde çalışılan sendromik solunum panel testi rutin verileri retrospektif olarak değerlendirilmiştir. Sakarya Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu 23.01.2020 tarih ve 62 sayılı etik kurul izni alınmıştır.

Çalışmaya Dahil Edilme Koşulları:

- 2019-2020 kış sezonunda solunumsal yakınmalı bireylerden alınan ve laboratuvara gönderilerek rutin solunum panel testi çalışılan nazofaringeal sürüntü ve bronkoalveoler lavaj örnekleri

Çalışma Dışı Bırakılma Koşulları:

- Nazofaringeal sürüntü ve bronkoalveoler lavaj sıvı örnekleri harici örnekler olması

3.2. ÖRNEKLERİN ALINMASI VE SAKLANMASI

Solunum yolları enfeksiyonu semptomları ile T.C. Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nin farklı kliniklerine başvuran hastalardan alınan ve rutin solunumsal virüsler çalışılması için mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen, çalışma sonrası saklanmış nazofaringeal sürüntü ve bronkoalveoler lavaj örnekleri ve verileri değerlendirilmiştir. Örnekler multipleks PCR yöntemi ile Solunum Panel testi (QIAstat-Dx®-Qiagen, Almanya) ile değerlendirilip viral etkenlerin dağılımı retrospektif olarak irdelenmiştir. İnfluenza A (H1N1) pozitif olarak bulunan 64 hasta örneği, laboratuvarında -80 derecede saklanmıştır. İnfluenza A (H1N1) pozitif örnekler arasından sekans analizi için seçilen 11 numune Ulusal İnfluenza Merkezi olarak görev yapan T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları ve Biyolojik Ürünler Daire Başkanlığı, Ulusal Viroloji Referans

Laboratuvarında ilaç direnci çalışılmak üzere soğuk zincir taşıma koşullarına dikkat edilerek (dondurulmuş örnekler kuru buzda) laboratuvara ulaştırılmıştır.

3.3. QIASTAT-DX® RESPIRATORY PANEL İLE VİRÜSLERİN TESPİTİ

Solunum yolu virüslerin tespiti, multipleks PCR yöntemi ile Solunum Panel (Respiratory Panel) testi (QIAstat-Dx®, Qiagen, Almanya) ile değerlendirilmiştir.



Resim 1. QIAstat-Dx® Respiratory Panel

Panel, solunum yolu enfeksiyonundan şüphelenilen hastalardan alınan nazofaringeal sürüntü örneklerini viral ve bakteriyel nükleik asitler açısından analiz eden kalitatif bir testtir. Test, entegre nükleik asit ekstraksiyonu ve multipleks real time PCR saptaması için QIAstat-Dx Analyzer 1.0 ile birlikte kullanılmaktadır. Saptanan ve ayırt edilebilen patojenler: İnfluenza A, İnfluenza A alt tip H1N1/2009, İnfluenza alt tip H1, İnfluenza alt tip H3, İnfluenza B, Coronavirus 229E, Coronavirus HKU1, Coronavirus NL63, Coronavirus OC43, Parainfluenza virüs 1, Parainfluenza virüs 2, Parainfluenza virüs 3, Parainfluenza virüs 4, Respiratuvar Sinsityal virüs A/B, İnsan Metapnömovirüs A/B (hMPV), Adenovirus, Bocavirus, Rhinovirus/Enterovirus (RSV saptanır ancak ayırt edilmez), *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Bordetella pertussis*'dir.

Panele yerleştirilen kartuş (QIAstat-Dx Respiratory Panel Cartridge), solunum yolu patojenlerin saptanması için otomatik moleküler testler yapılmasını sağlayan, gereken tüm reaktifleri içeren tek kullanımlık plastik bir kittir. Tüm örnek hazırlama, test adımları kartuş içinde gerçekleştirilir ve sonuçlar yaklaşık 1 saatte alınır.

3.3.1. Örnek Alma ve Kartuş Yükleme

Panel için sağlanan kittede; kartuşlar (QIAstat-Dx Respiratory Panel Cartridge) ve transfer pipetleri bulunmaktadır. Alınan nazofaringeal sürüntü örneği, taşıma besiyerine yerleştirilip ardından örnek bilgilerinin bulunduğu etiket kartuşa yapıştırılır. Örnek kartuşa manuel olarak yüklenir. Kuru sürüntü örnek tipi (nazofaringeal sürüntü örneği) kartuşun sürüntü portuna, taşıma besiyeri sıvı örneği transfer pipetler yardımıyla kartuşun ana portuna aktarılır. Örnek barkodu ve kartuş barkodu (QIAstat-Dx Respiratory Panel Cartridge) cihazda (QIAstat-Dx Analyzer 1.0) taranıp, yerleştirilir. (Şekil 11.)



Şekil 11. Kartuşu cihaza yerleştirme

Örnekteki nükleik asitlerin ekstraksiyonu, amplifikasyonu ve saptanması otomatik olarak gerçekleştirilir. Test sonuçları “saptandı, kuşkulu, test edildi” şeklinde 3 grupta açıklanmaktadır. Ayrıca her patojene karşılık atanan renklerle oluşturulan

Amplifikasyon grafiği ile her patojene ait eşik değer (C_T- Cycle threshold) ve sonlanım noktası floresans değerleri görüntülenmiştir.



şekil 12. Amplifikasyon eğrileri ekranı

3.4. VİRÜS HÜCRE KÜLTÜRÜ

İnfluenza A H1N1 PCR pozitif saptanan örneklerden 11'i T.C. Sağlık Bakanlığı Ankara Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları ve Biyolojik Ürünler Daire Başkanlığı, Ulusal Viroloji Referans Laboratuvarında virüs hücre kültüründe üretilmiştir. Klinik örneklerden influenza virüs izolasyonu için Madin-Darby Canine Kidney MDCK-SIAT (Modifiye sialik asit reseptörleri) hücreleri kullanılmıştır. Klasik hücre kültür yöntemi uygulanmıştır. Kullanılan vasatların özellikleri Tablo 11'de gösterilmiştir.

Tablo 11. Hücre Kültüründe Kullanılan Vasatlar

	Çoğaltma Vasatı	İdame Vasatı
DMEM	100 ml	100 ml
NaHCO ₃	3,5 ml	4,5 ml
FBS/FCS	10 ml	2 ml
Penisilin/Streptomisin Solüsyonu	1 ml	1 ml

Monolayer olmuş sağlıklı hücrelerin bulunduğu 25 cm²'lik flaskların içindeki büyütme vasatı boşaltılmıştır. %10 FCS içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) vasatından flasklara 5'er mL konulmuştur. Üzerine 1 mL VTM solüsyonu inokule edilmiş ve 37°C CO₂ etüve kaldırılmıştır. Flasklar 10 gün boyunca inkübe edilip 2. günden sonra hücre dejenerasyonunu (Cytopathic effect-CPE) izlemek için, flasklar mikroskop altında incelenerek değerlendirilmiştir. Üreme (CPE) gözlenen flasklardan mikrotüplere alınan örnekler ekstraksiyon işlemine alınmıştır. Viral genomik RNA, üreticinin talimatlarına göre Qiagen EZ1 Virus Mini Kit v2.0 ve EZ1 Advanced ekstraksiyon robotu (Qiagen, Almanya) kullanılarak üremiş olan kültür vasatından 400 ul alınarak ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon ürünü, sekans çalışması yapılmak üzere konvansiyonel PCR çalışılmıştır.

3.5. DNA DİZİ ANALİZİ (SEKANS)

Qiagen One Step RT PCR kit ile 1410 bp uzunluğundaki NA geni N1F1, N1R1099, N1F401 ve NARUc primerleri ile amplifiye edilmiştir. Kullanılan materyaller aşağıdaki şekildedir:

- 5x Tampon (Reaction buffer) (10 µl)
- dNTP (2 µl)
- 10 µM Forward Primer (1,5 µl)
- 10 µM Reverse Primer (1,5 µl)
- Enzim karışımı (Enzyme Mix) (2 µl)
- RNase inhibitör (optional) (0,5 µl)
- Template RNA (10 µM)
- RNase içermeyen su (RNase-free water) (22,5 µl)

120 V da %1,5 lik agaroz jelde ampikonlar yürütülüp 1410 bp'lik bant gözlenmiştir. H1N1 virüsü olduğu tespit edilmiştir.

PCR ürünlerinin pürifikasyonu

PCR ürünleri Agencourt AMPure XP (cat. No: A63881) ile üreticinin talimatlarına göre pürifiye edilmiştir.

Cycle Sekans Reaksiyonu

BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (4337454) ile reaksiyon hazırlanmıştır.

- 5x sequencing buffer 2 µl
- Primer F veya R (5 µM) 2 µl
- Big dye Terminator 2 µl
- DNA Template 2 µl
- Toplam hacim (Total volüme) 10 µl

Cycle Sekans ürünlerinin pürifikasyonu

Axygen AxyPrep MAG DyeClean-Up Kit (Cat.No: MAG-DYECL-250) ile üreticinin talimatlarına göre yapılmıştır. DNA dizi analizi için ABI 3500 sanger sekans cihazı kullanılmıştır.

Elde edilen veriler aşağıdaki referans suşlarla karşılaştırılarak analiz edilmiştir.

Referans Suşlar

A/California/7/2009 Apr

A/Bayern/69/2009 Jul

A/Lviv/N6/2009 Oct

A/Astrakhan/1/2011 Feb

A/St Petersburg/27/2011 Feb

A/St Petersburg/100/2011 Mar

A/Hong Kong/5659/2012 May

A/South Africa/3626/2013 Jun

A/Slovenia/2903/2015 Oct

A/Israel/Q-504/2015 Dec

A/Michigan/45/2015 Sep

A/Norway/3433/2018_Oct

A/Switzerland/3330/2017

A/Ireland/84630/2018

A/Switzerland/2656/2017

A/Paris/1447/2017

A/Slovenia/2903/2015

A/Hong_Kong/110/2019

4. BULGULAR

4.1. ÇALIŞMA GRUBUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ

Çalışmada, Sakarya Üniversitesi Sakarya Eğitim ve Araştırma Hastanesinin farklı kliniklerine başvuran 354 hastanın laboratuvara gönderilen örneklerinin rutinde çalışılan verileri retrospektif olarak irdelenmiştir.

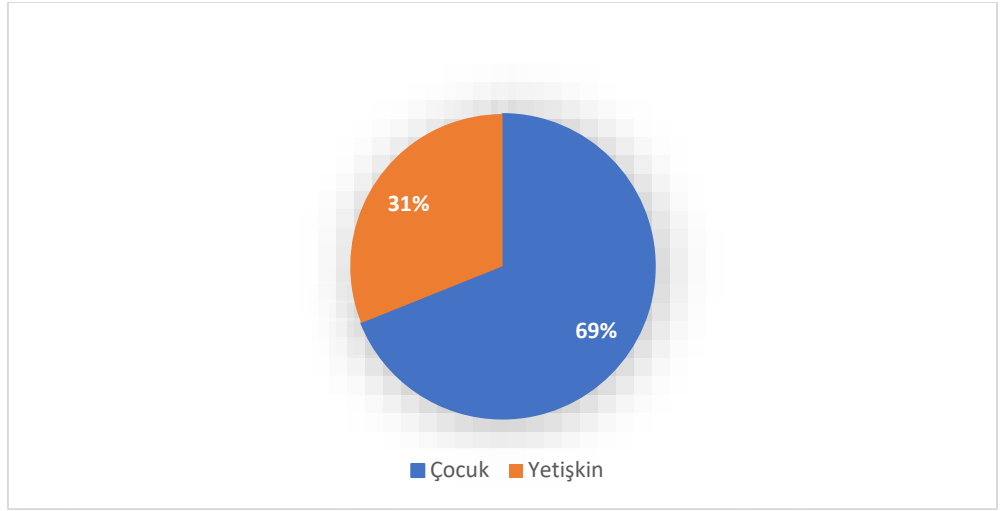
4.1.1. Demografik Veriler

Hastaların 192'si (%54,2) erkek 162'si (%45,8) kadındır. Yaş grupları 0-1 yaş, 1-5 yaş, 5-10 yaş, 10-15 yaş, 15-40 yaş, 40-65 yaş ve 65 yaş üzeri şeklinde belirlenmiştir. (Tablo 11.)

Tablo 12. Hastaların Yaş Grupları ve Cinsiyetlerine Göre Dağılımı

Yaş aralığı	Cinsiyet				Toplam	
	Erkek		Kadın		N	%
	N	%	N	%	N	%
0 – 1 Yaş	57	16,1	48	13,6	105	29,7
1 – 5 Yaş	33	9,3	29	8,2	62	17,5
5 – 10 Yaş	24	6,8	24	6,8	48	13,6
10 – 15 Yaş	18	5,1	11	3,1	29	8,2
Ara toplam (Çocuk)	132	37,3	112	31,6	244	68,9
15 – 40 Yaş	28	7,9	23	6,5	51	14,4
40 – 65 Yaş	22	6,2	17	4,8	39	11
65 Üzeri Yaş	10	2,8	10	2,8	20	5,6
Ara toplam (Yetişkin)	60	17	50	14,1	110	31,1
Toplam	192	54,2	162	45,8	354	100

Hastaların sosyodemografik özellikleri değerlendirildiğinde çocuk hastaların hâkim olduğu görülmüştür. Hastaların 244'ü (%68,9) çocuk, 110'u (%31,1) yetişkindir (Şekil 13).



Şekil 13. Hastaların yaş dönemlerine göre dağılımı

4.1.2. Örneklerin gönderildiği klinikler

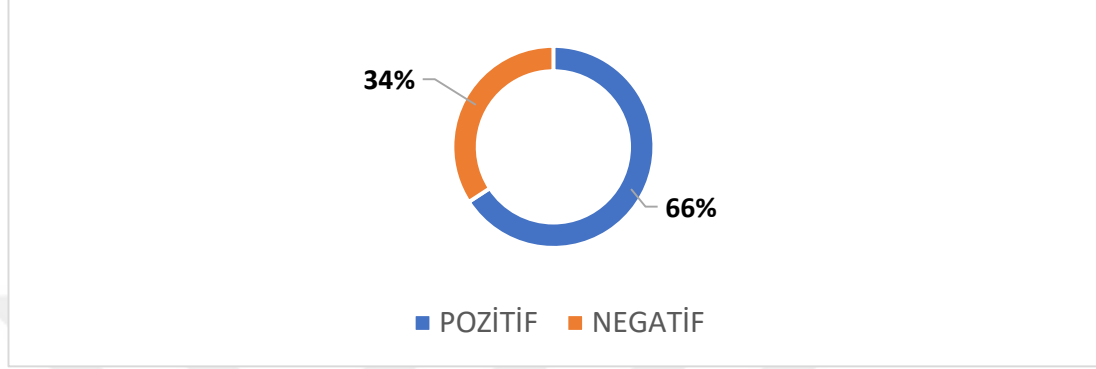
Laboratuvara rutin test amacıyla gönderilen ve kayıtları irdelenen örneklerin kliniklere göre dağılımı 130 (%36,7) kişi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Poliklinikleri ve Servisi, 64 (%18,1) Çocuk Yoğun Bakım Servisi, 55 (%15,5) Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Poliklinik ve Servisi, 44 Çocuk Acil Servisi, 15 (%4,2) Çocuk Hematolojisi ve Onkoloji Kliniği, 10 (%2,8) Nefroloji Kliniği ve 36 (%10,2) diğer klinikler şeklindedir (Tablo 12).

Tablo 13. İncelenen örneklerin kliniklere göre dağılımı

Klinikler	Cinsiyet					
	Kadın		Erkek		Toplam	
	n	%	n	%	n	%
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Poliklinikleri ve Servisi	58	16,4	72	20,3	130	36,7
Çocuk Yoğun Bakım Servisi	29	8,2	35	9,9	64	18,1
Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Poliklinik ve Servisi	27	7,6	28	7,9	55	15,5
Çocuk Acil Servisi	19	5,3	25	7,1	44	12,4
Çocuk Hematolojisi ve Onkoloji Kliniği	6	1,7	9	2,5	15	4,2
Nefroloji Kliniği	4	1,1	6	1,7	10	2,8
Çocuk İmmunoloji ve Alerji Hastalıkları Kliniği	2	0,6	4	1,1	6	1,7
Anesteziyoloji ve Reaminasyon Yoğun Bakım Servisi	3	0,8	2	0,6	5	1,4
Dahiliye Yoğun Bakım Servisi	3	0,8	2	0,6	5	1,4
Göğüs Hastalıkları Poliklinikleri ve Servisi	3	0,8	1	0,3	4	1,1
Göğüs Hastalıkları Yoğun Bakım Servisi	3	0,8	1	0,3	4	1,1
Böbrek Nakil Servisi	-	-	3	0,8	3	0,8
Çocuk Kardiyolojisi Kliniği	3	0,8	-	-	3	0,8
Çocuk Endokrinoloji Kliniği	1	0,3	-	-	1	0,3
Hematoloji Kliniği	-	-	1	0,3	1	0,3
Onkoloji Kliniği	1	0,3	-	-	1	0,3
Koroner Yoğun Bakım Servisi	-	-	1	0,3	1	0,3
Cerrahi Yoğun Bakım Servisi	-	-	1	0,3	1	0,3
Aşı Polikliniği	-	-	1	0,3	1	0,3
Toplam	162	45,8	192	54,2	354	100

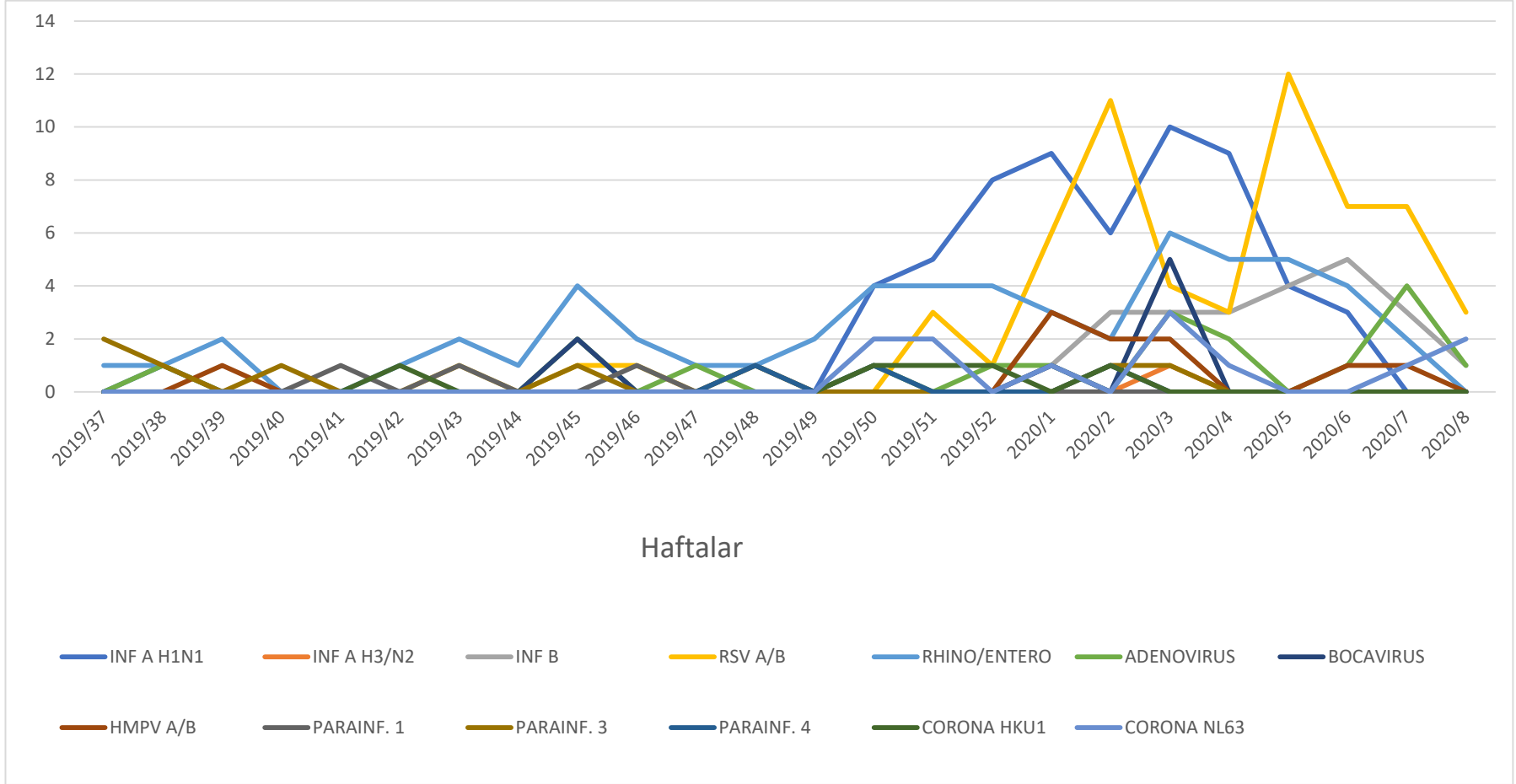
4.2. QIASTAT-DX® RESPIRATORY PANEL TEST SONUÇLARI

İncelemeye alınan 354 hasta örneğinin 121'inde (%34) herhangi bir solunum yolu viral etkeni saptanmazken, 233'ünde (%66) solunum yolu viral etkenleri tanımlanmıştır (Şekil 14).



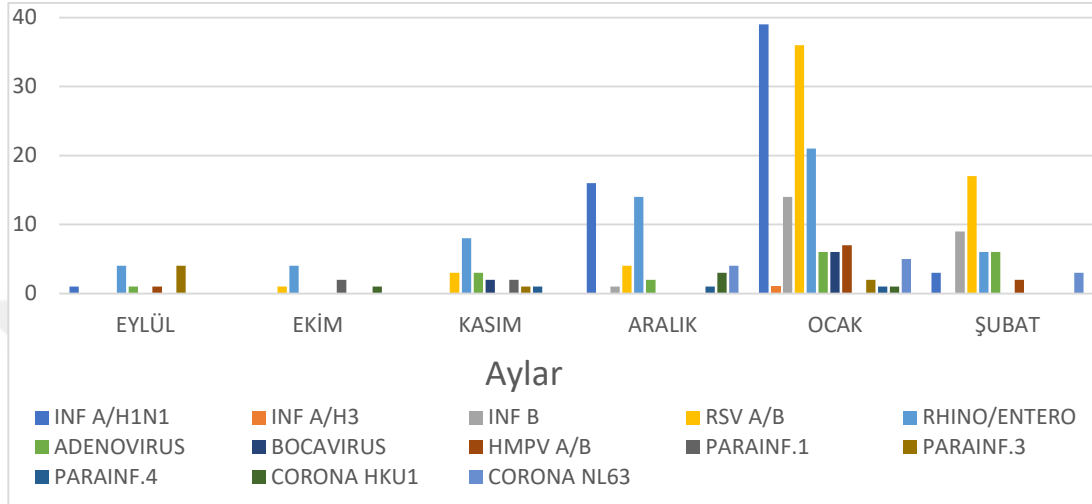
Şekil 14. Örneklerden solunum yolu virüsleri saptama oranı

Pozitif sonuç veren örneklerdeki virüslerin dağılımı; 64 (%27,5) İnfluenza A/H1N1, 4 (%1,7) İnfluenza A/H3N2, 24 (%10,3) İnfluenza B, 64 (%27,5) Respiratuar Sinsityal Virüs A/B (RSV A/B), 58 (%24,9) Rhinovirüs/Enterovirüs, 18 (%7,7) Adenovirüs, 12 (%5,2) Human Metapneumo Virüs (hMPV), 10 (%4,3) Bocavirüs, 4 (%1,7) Parainfluenza 1, 7 (%3) Parainfluenza 3, 3 (%1,3) Parainfluenza 4, 5 (%2,1) Coronavirüs HKU1 ve 13 (%5,6) Coronavirüs NL63 şeklindedir. Virüslerin kış sezonu haftalara göre dağılımı şekil 15' de gösterilmektedir.



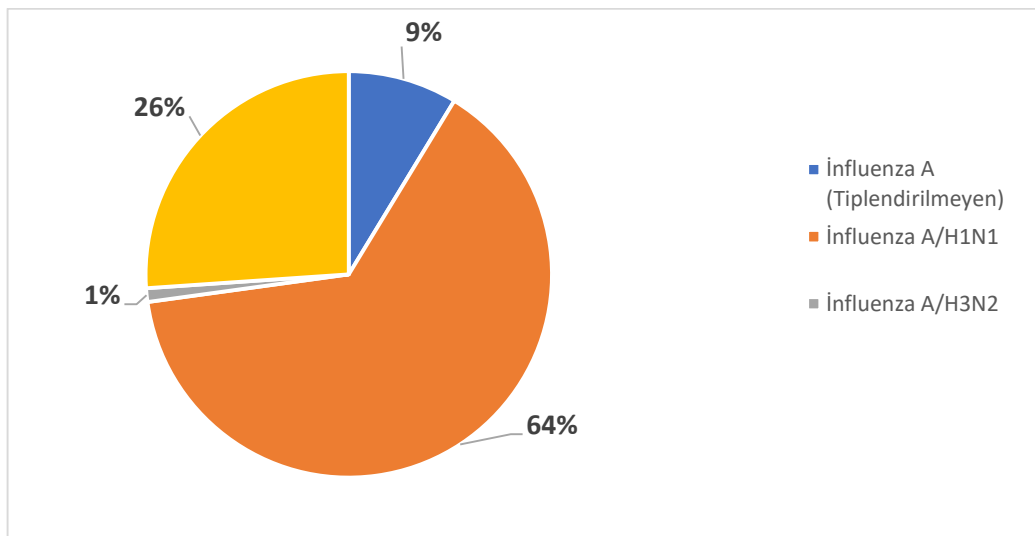
Şekil 15. Solunum yolu virüslerinin haftalara göre dağılımı

Grip ve benzeri semptomlar örneklerin toplandığı Eylül-Şubat ayları arasında, özellikle en sık başvurunun yapıldığı Aralık-Ocak-Şubat aylarındaki artışlarla gözlenmektedir. Solunum yolu virüslerinin aylara göre dağılımı şekil 16’ da gösterilmektedir.



Şekil 16. Solunum yolu virüslerinin aylara göre dağılımı

Hasta numunelerinden yapılan sendromik PCR sonucuna göre tespit edilen İnfluenza virüslerinin dağılımı 8 (%9) influenza A (tiplendirilmeyen), 59 (%64) influenza A/H1N1, 1 (%1) influenza A/H3N2, 24 (%26) influenza B şeklindedir. İnfluenza virüslerinin dağılımı şekil 17’ de verilmiştir.



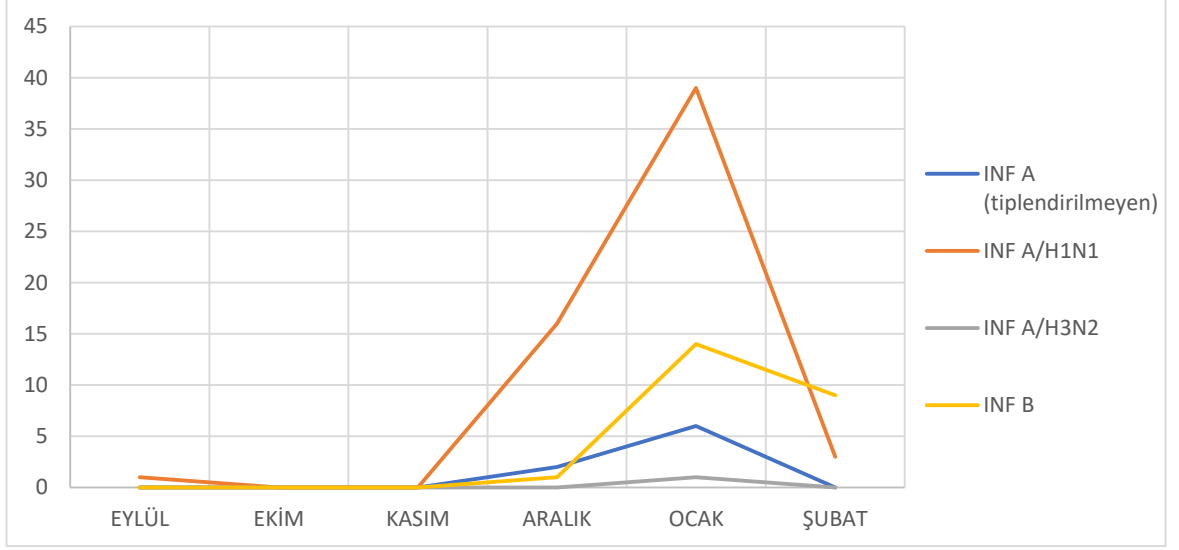
Şekil 17. Tespit edilen İnfluenza cins ve serotiplerinin dağılımı

İnfluenza A pozitif hastaların yaşlara göre dağılımı incelendiğinde; 0-5 ve 40-65 yaş gruplarında yoğunlaştığı görülmüştür (Tablo 13.).

Tablo 14. İnfluenza alt tiplerinin yaş gruplarına göre dağılımı

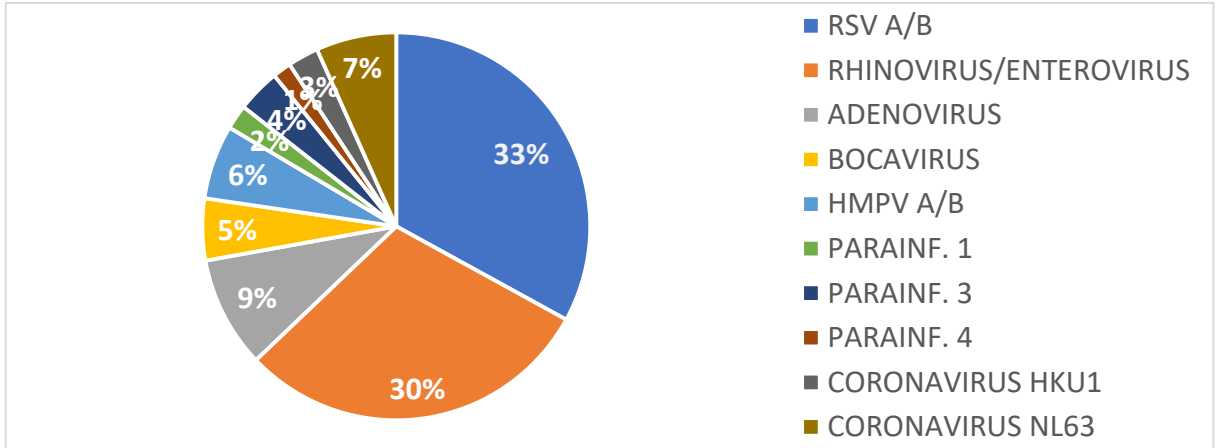
Yaş Aralığı	Subtipler									
	İnfluenza A (Tiplendirilemeyen)		İnfluenza A/H1N1		İnfluenza A/H3		İnfluenza B		Toplam	
	N	%	n	%	n	%	n	%	n	%
0 – 1 Yaş	3	3,26	13	14,13	0	0,00	1	1,09	17	18,48
1 – 5 Yaş	0	0,00	14	15,22	0	0,00	5	5,43	19	20,65
5 – 10 Yaş	2	2,17	6	6,52	1	1,09	10	10,87	19	20,65
10 – 15 Yaş	1	1,09	2	2,17	0	0,00	3	3,26	6	6,52
15 – 40 Yaş	0	0,00	6	6,52	0	0,00	5	5,43	11	11,96
40 – 65 Yaş	1	1,09	13	14,13	0	0,00	0	0,00	14	15,22
65 Üzeri Yaş	1	1,09	5	5,43	0	0,00	0	0,00	6	6,52
Toplam	8	8,70	59	64,13	1	1,09	24	26,09	92	100,0

İnfluenza serotiplerinin aylara göre dağılımı incelendiğinde Aralık ve Ocak aylarında artış görülmektedir. Özellikle influenza A diğerlerine göre daha sık rastlanan türdür (Şekil 18).

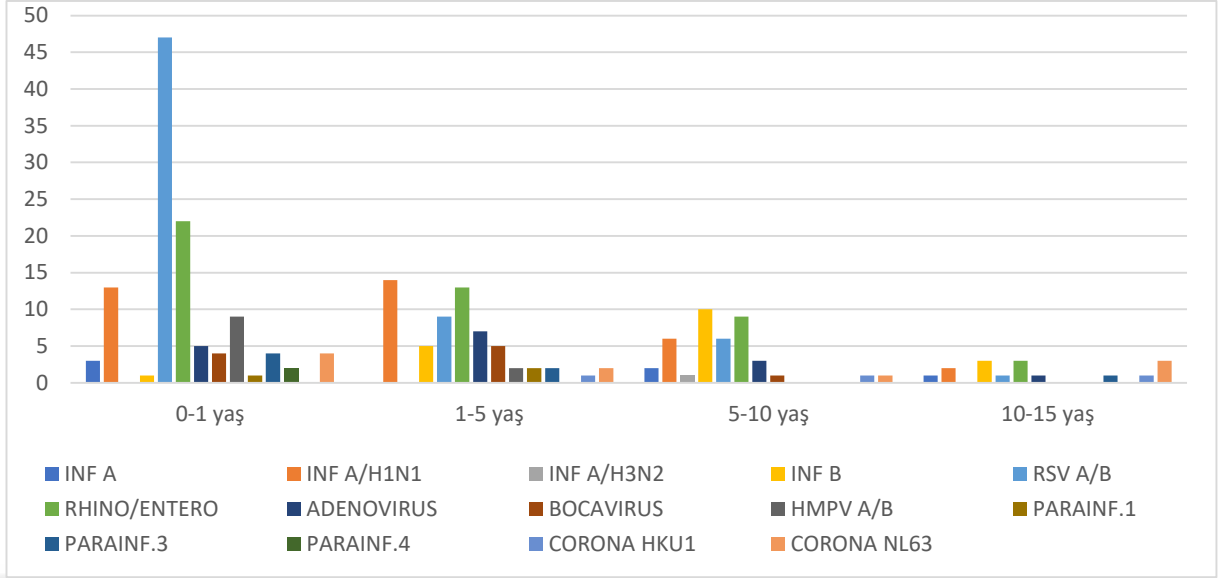


Şekil 18. Tespit edilen Influenza cins ve serotiplerinin aylara göre dağılımı

Tespit edilen diğer solunum yolu virüslerin dağılımı ise 64 (%33) RSV A/B, 58 (%30) Rhinovirus / Enterovirus, 18 (%9) Adenovirus, 10 (%5) Bocavirus, 12 (%6) HMPV A/B, 4 (%2) Parainfluenza1, 7 (%4) Parainfluenza3, 3 (%1) Parainfluenza4, 5 (%3) Coronavirus HKU1, 12 (%7) Coronavirus NL63 olarak belirlenmiştir (Şekil 19). RSV A/B ve Rhinovirus / Enterovirus daha sık görülmektedir. Bunun nedeni o dönemde daha çok çocuk hastalardan örnek gelmesidir ve bu virüs çeşitleri özellikle 0-5 yaş arasında yaygın gözlenmektedir (Şekil 20).



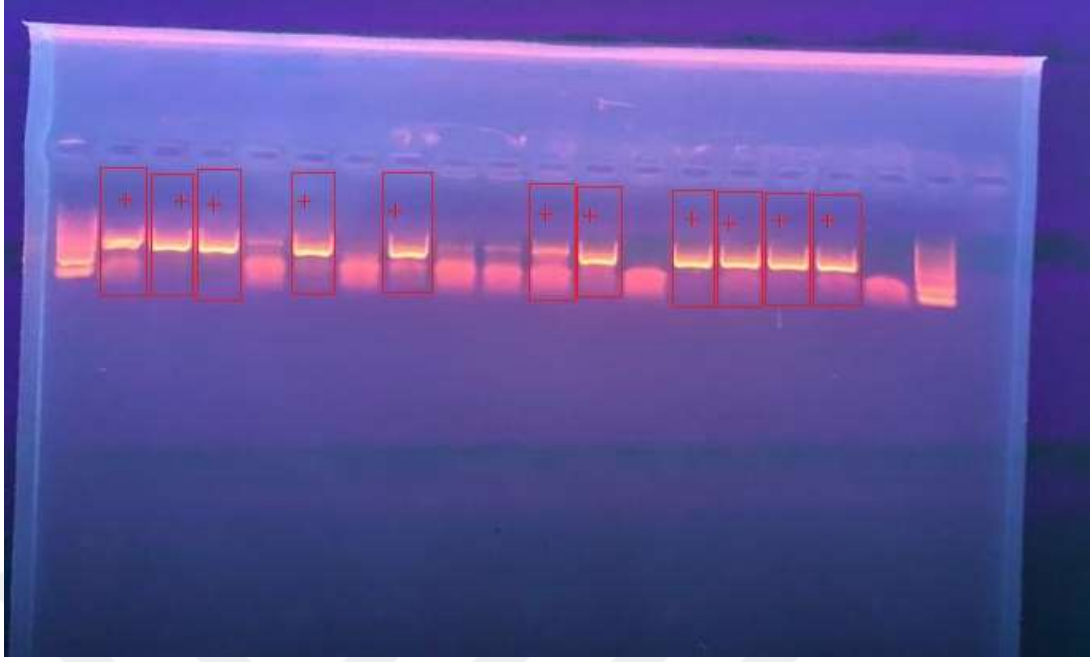
Şekil 19. Diğer solunum yolu virüslerinin (influenza dışı) dağılımı



Şekil 20. Çocuklarda solunum yolu virüslerinin yaşlara göre dağılımı

4.3. DNA DİZİ ANALİZİ SONUÇLARI

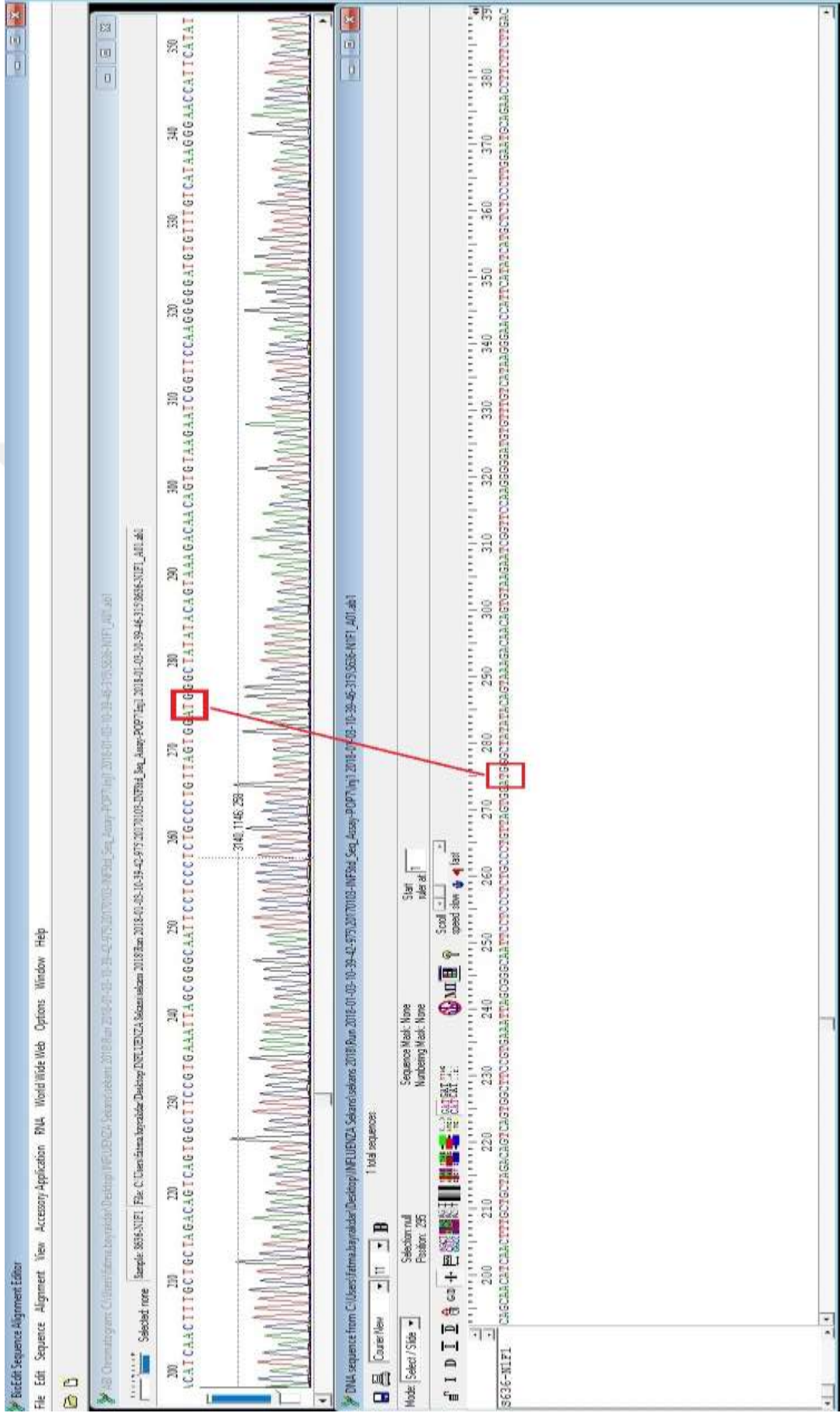
Bu süreçte ilk olarak viral hücre kültürü ile virüs izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Örneklerin Madin-Darby Canine Kidney (MDCK-SIAT) (Modifiye sialik asit reseptörleri olan) hücre kültürüne ekimi yapılmıştır. Üremiş kültürlerden 120 V'da %1,5'lik agaroz jelde yürütülen amplikonlarda 1410 bp'lik bant gözlenmiştir ve örneklerin İnfluenza A H1N1 virüsü açısından pozitif olduğu saptanmıştır (şekil 21).



Şekil 21. Agaroz jel elektroforez sonucu

4.3.1. H1N1 İzolatlarında Oseltamivir Direnç Sonuçları

Oseltamivir direncini saptamak için İnfluenza A/H1N1 suşlarında yapılan dizileme sonuçları kromotogram şeklinde şekil 22’de gösterilmiştir. Kromotogramda her bir renk farklı bir nükleotidi göstermektedir. H275Y mutasyonu bir tek nokta mutasyondur. İnfluenza A 2009 (H1N1) virüs’ünün NA geninin 823. pozisyonundaki “C” (sitozin) nükleotidinin “T” (Timin) nükleotidine farklılaşmasıyla meydana gelir. NA geninde meydana gelen bu tek nokta mutasyonu ile proteinin 275. pozisyonundaki “Histidin” amino asiti yerine “Tirozin” aminoasiti kodlanmış olur. Referans suşla karşılaştırıldığında bu şekilde bir değişim gözlenmediği için araştırılan 11 izolatın hiçbirinde dirence rastlanmamıştır.



Şekil 22. İnfluenza H1N1 izolatlarında direnç kromotogramı

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Akut solunum yolu enfeksiyonları, üst ve alt solunum yolu enfeksiyonları olmak üzere iki grupta incelenebilir. Akut solunum yolu enfeksiyonları enfeksiyon etkeni veya toksinleri sebebiyle sadece solunum yolu ile sınırlı kalmamakta, inflamasyona, akciğer fonksiyonlarında bozulmaya ve sistemik etkilere yol açabilmektedir (Simoes et al 2006).

Üst solunum yolu enfeksiyonlarında (ÜSYE) sık görülen viral etkenler; Rhinovirüs, RSV, hMPV, İnfluenza, Parainfluenza virüs, HCoV, Adenovirüs (ADV) ve diğer virüsler (%10) sorumludur (Denny Jr 1995). Alt solunum yolu enfeksiyonları (ASYE) çok yaygın görülen, özellikle gelişmekte olan ülkelerde çocukluklardaki hastaneye yatış ve mortalitenin önemli bir sebebi olan, tanı ve tedavileri önem arz eden bir hastalık grubudur (Fischer et al 2013). Türkiye’de ASYE %4,6 oran ile tüm ölümler içerisinde altıncı sırada yer almaktadır. Hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerdeki okul öncesi çocuklarda yapılan çalışmalar, solunum yolu enfeksiyonlarının çoğunun genel olarak viral etiyojolojiye sahip olduğunu göstermektedir (Waters et al 2013). Etkenlere göre karşılaştırıldığında belirtiler arasında spesifik bir fark bulunmadığından belli bir mevsimsel durum veya salgın yoksa tanıyı koymak çok zordur. Etkenlerin hızlı ve doğru saptanması tanıya giden yolda yol gösterici olacaktır. Böylece bakteriyel ve viral enfeksiyon ayırımı yapılabilir, gereksiz antibiyotik kullanımı ve bunların yüksek maliyetleri ve direnç sorunu gibi problemler önlenebilir (Özdamar ve Türkoğlu 2018).

Enfeksiyon hastalıklarının tanısında moleküler testlerin yeri büyüktür. Bu katkılar arasında tanısı zor ve konvansiyonel yöntemlerle üretilemeyen mikroorganizmaların (kültürde üretilemeyen veya güç üreyen virüsler) saptanabilmesi, duyarlılıktaki artışla çok düşük miktardaki mikroorganizmaların bile saptanabilmesi ve de birçok etkenin aynı anda ve hızlıca saptanabilmesi moleküler yöntemlerin getirdiği kolaylıklardır (Özdamar ve Türkoğlu 2018).

Multipleks Real time PCR test sonuçları değerlendirildiğinde hastanede yatan hastalardaki ağır pnömoni etkenlerinin belirlenmesinde bu testlerin kullanışlı olduğu

görülmektedir. Pnömoninin muhtemel etkenleri çocukların %76'sında bu yöntem kullanılarak teşhis edilmiştir. Bu grupta neoplastik hastalığı olan çocuklar sayılmadığı zaman bu oran %79,54'e yükselmektedir. Literatürde benzer yüzde oranlarındaki pozitif sonuçlarla sıklıkla karşılaşılmaktadır (Weigl, Puppe, Gröndahl and Schmitt 2000, Bierbaum et al 2012, Esposito et al 2013). Bierbaum, Königsfeld et al (2012), çalışmalarında solunum yolu semptomları olan 6 yaşından küçük çocukların olduğu grupta multipleks Real time PCR ile viral etkenler %76 oranında saptanmıştır. Mengelle, Mansuy, Pierre, Claudet, Grouteau, Micheau, Sauné and Izopet (2014), çalışmalarında ise solunum yolu enfeksiyonu (SYE) semptomları olan 914 çocukta toplanan örneklerin %90 i pozitif bulunmuştur.

Ülkemizde yapılan çalışmalarda ise; Çiçek ve ark. na göre (2015), 2002-2014 yılları arasında 2104 hastayı kapsayan çalışmalarında 1705 hastada viral etken tespit etmişlerdir. , 0-5 yaş arasındaki alt SYE tanısı olan 124 çocuktan alınan örneklerin 35 (%28,2)'inde viral ajan tespit etmişlerdir. Pelit, Bayraktar, Bulut, Karabulut ve Nuhoglu (2015) çalışmalarında, pediatrik hastalarda viral ajan pozitifliği %46,9 olarak gösterilmiştir. Yüksel H (2008) çalışmasında ASYE belirtileri olan çocukların %25,2'sinde viral ajan pozitifliği göstermiştir.

Bicer ve ark. na göre (2013), özellikle alt solunum yolu enfeksiyonu bulguları ile hastaneye yatırılan 9 yaş altı 155 çocuğun nazofaringeal aspiratını inceledikleri çalışmalarında 14 tane solunum yolu etkeni araştırmışlar ve 155 hastanın %66'sında (s: 103) etken tespit etmişlerdir. Akçalı, Yılmaz, Güler, Şanildağ ve Anıl (2013) ise İzmir'de yapılan çalışmalarında yine benzer çocuk hasta grubunda (s: 160) %42 oranında (s: 67) etken tespit edebilmişlerdir. Sancaklı, Yenigün ve Kırdar (2012) çalışmalarında, etken saptama oranları %67,8 olmuştur. Özdamar ve Türkoğlu (2018) çalışmalarında bu oran %87 olarak bildirilmiştir. Kanberoğlu, Güdeloğlu, Bağ ve Ecevit (2021) çalışmasında 152 hastanın 103'ünde (%67,8) multipleks PCR ile solunum patojeni saptanabilmiştir.

Bizim çalışmamızda ise 354 hastanın 233'ünde (%65,8) en az bir viral etken tespit edildi. Çalışmamızda akut alt solunum yolu enfeksiyonu tanısı ile izlenen olgularda viral etkenleri saptama oranı daha önceki çalışmalarla benzer bulunmuştur.

Solunum yolu enfeksiyonlarının etiyolojisi ve solunum yolu virüs prevalansı farklı çalışmalarda değişiklik göstermektedir. Fransa'da yapılan bir çalışmada en sık saptanan virüsler hMPV ve RSV bulunurken (Ju et al 2014), Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan çalışmalar İnfluenza virüs, RSV ve Parainfluenza virüsün en yaygın olduğunu göstermiştir. Almanya'da yapılan bir çalışmada ise en sık RSV tespit edilmiştir (Bierbaum, Königsfeld et al 2012). Çin'in çoğu bölgesinde solunum yolu enfeksiyonlu çocuklar arasında en sık saptanan solunum virüsleri İnfluenza virüs, RSV ve Rhinovirüs bildirilmiştir (Esposito, Daleno et al 2013). Rusya'nın batı kesiminde ise RSV, Rhinovirüs, Parainfluenza virüs ve İnfluenza virüs'ün anlamlı olarak saptandığı görülmüştür (Tam 2013).

Ülkemizde yapılan çalışmalarda da akut ASYE olan çocuklarda RSV, İnfluenza virüs ve Rhinovirüsler sık saptanan etkenler arasında yer almaktadır (Sancaklı, Yenigün ve ark. 2012, Akçalı, Yılmaz ve ark. 2013, Torun ve ark. 2013). Dünyada yapılan diğer çalışmalar ile benzer şekilde Rhinovirüs, RSV, Parainfluenza ve İnfluenza virüsden sonra en sık saptanan virüs Bocavirüs olmuştur (Jacques et al 2008, Calvo et al 2010, Qiu, Söderlund-Venermo and Young 2017). Kanberoğlu, Güdeloğlu ve ark. (2021) çalışmasında en çok saptanan etken Rhinovirüsler olup onu sırasıyla RSV, Parainfluenza virüsler ve İnfluenza virüsler izlemektedir. Bicer, Giray ve ark. (2013) çalışmasında da Respiratuvar sinsityal virüs (%32,0), Adenovirus (%26,2), Parainfluenza viruslar ilk iki sırada iken, Akçalı, Yılmaz ve ark. (2013) çalışmasında, en sık Respiratuvar sinsityal virus (%61), daha sonra Rhinovirusu saptamışlardır (%36). Sancaklı, Yenigün ve ark. (2012) tarafından yapılan çalışmada, en sık Rhinovirus (%26), ikinci sırada RSV (%10) etkeni bulmuşlardır. Özdamar ve Türkoğlu (2018) çalışmalarında, en sık rastlanan etken Rhinovirus, ikinci sırada Adenovirus olmuştur. RSV üçüncü sırada gelmiştir.

Uyar, Günaydın ve ark. (2000) çalışmasında en çok saptanan etkenler sırasıyla; RSV %40, Parainflenzavirüs türleri %28,6, İnfluenza B virüsü %11,4, Coronavirüs %8,6, İnfluenza A virüsü %5,7 ve ADV %5,7 şeklinde bulundu. Yüksel H (2008) çalışmasında en çok saptanan etkenler olarak RSV ve ADV (%31,5) bulmuşlardır. Bunları Parainflenzavirüs (%26,3) ve İnfluenza virüsü (%23,6) izlemiştir. Pelit, Bayraktar ve ark. (2015) çalışmasında ise en sık rastlanan virüs RSV (%35,3) iken hastaların %4,2'sinde İnfluenza A, %1,9'unda ise İnfluenza B tanımlanmıştır. Şık, Demirbuğa, Annayev, Cabiri, Deliceo ve Çıtak (2020) çalışmasında 19 (%23,8) hastada RSV B pozitifliği, 17 (%21,3) hastada ise RSV A enfeksiyonu saptandı. Diğer etkenler ise; Rhinovirüs (%32,5), Parainflenzavirüs 1 (%8,7), ADV (%7), hMPV (%6), İnfluenza A (%5) ve İnfluenza B (%5) olarak saptandı.

Çalışmamızda ise çocuklarda (0-15 yaş arası) saptanan solunum yolu enfeksiyon etkeni virüslerin dağılımı sıklık sırasına göre; RSV A/B (%23), Rhinovirüs/Enterovirüs (%17), İnfluenza A (%16), İnfluenza A/H1N1(%13), İnfluenza B (%7), Adenovirüs (%6), Bocavirüs (%4), hMPV A/B (%4), Coronavirüs NL63 (%4), Parainflenzavirüs 3(%3), İnfluenza A/H3N2 (%2), Parainflenzavirüs 1 (%1), Parainflenzavirüs 4 (%1), Coronavirüs HKU1 (%1) şeklindedir.

Solunum yolu viral enfeksiyonlarının tanısında multipleks PCR gibi moleküler yöntemler aynı anda çok sayıda ajanın test edilmesini sağlamakta ve bir hastada birden fazla ajanı saptayabilmektedir. Bazı virüslere sık ve üst üste maruziyet sonrası geçirilen enfeksiyonlar, klinik olarak geçirilmiş olsalar bile kullandığımız duyarlı yöntemler sayesinde laboratuvar olarak uzun süreler saptanabilmektedir. Mevcut virüse ek olarak yeni bir virüsle meydana gelen enfeksiyon ikili-üçlü enfeksiyonlar olarak nitelenmektedir. Koenfeksiyonlar olarak da bilinen aynı anda birden fazla etkenin saptandığı enfeksiyonlar, bu tür çalışmalarda çok önemli oranda saptanan ilginç ve anlaşılması gerekli durumlar olarak ortaya çıkmaktadırlar (Özdamar ve Türkoğlu 2018).

Frobert et al (2011), pediatrik YBÜ'deki çocukları dahil ettikleri bir çalışmalarında çoklu enfeksiyon oranı %35 olarak bildirilmiştir ve RSV %24,3'lük bir oranla çoklu

enfeksiyonlarda en sık rastlanan virüs olmuştur. Cevey-Macherel et al (2009) bir çalışmada 5 yaş altı çocuklarda PCR yöntemi kullanılarak pnömoni vakalarının %85'inin etkenleri araştırıldı, sonuçlar incelendiğinde %67'sinde virüsler, %52'sinde bakteriler, %33'ünde de her iki mikroorganizma etken olarak gösterildi. 5-14 yaşlarındaki çocukların olduğu İtalya'daki bir çalışmada moleküler analizle vakaların %77'sinde etken tespit edildi. Virüslerin varlığı örneklerin %65'inde, bakteriler ise %40'ında gösterildi. Virüs ve bakteri birlikteliğine ise çocukların %28'inde rastlanıldı (Tsolia et al 2004). Mengelle, Mansuy ve ark. (2014), birden fazla virüsün neden olduğu enfeksiyonların oranını, çalışmalarındaki çocukların %30'unda bildirmişlerdir.

Multipleks Real time PCR yöntemi ile virüs saptanırken duyarlılık %90'a ulaşmaktadır (Caliendo 2011). Çeşitli patojenlerin genetik materyalleri PCR yöntemi ile gösterildiği için patojenin neden olduğu eş zamanlı bir enfeksiyona veya enfeksiyonlu bir hastanın hala taşıdığı diğer patojene rastlanabilir. Bu aynı zamanda geçirilmiş bir enfeksiyondan sonraki viral genetik materyalin varlığının (viral çıkış yoluyla) belirlenmesinden de kaynaklanabilir. Pnömoni etkenlerinin de çocuklarda yaklaşık %30 oranında çoklu etken olduğu tahmin edilmektedir (Anders et al 2015). Bazı çalışmalar viral faktör tipiyle enfeksiyon riski arasında bir ilişki olduğuna dikkat çekmektedir. Martin, Kuypers, Wald and Englund (2012), farklı patojenlerin olduğu koenfeksiyonların %50'sinde adenovirus kaynaklı enfeksiyonlar bulunmuştur. Gowin et al (2017) ise çalışmalarında buldukları yüksek koenfeksiyon oranlarını, çalışma gruplarındaki spesifikiteyle açıklamışlardır. Bu gruptaki çocukların çoğunda kronik hastalık bulunduğu ve bu hastaların bazılarında da immün yetmezlik olduğu bildirilmiştir.

Ülkemizde yapılan çalışmalarda ise Bicer, Giray ve ark. (2013), hastaların %20'sinde (s: 21) koenfeksiyon, bunların yalnızca 3 tanesinde 3 patojeni aynı anda belirlemişler ve hastalığın ciddiyeti ve koenfeksiyon arasında bir ilişki saptamamışlardır. Akçalı, Yılmaz ve ark. (2013), çalışmalarında hastaların %10,4'ünde (s: 7) çoklu etken saptamışlardır. Aynı kişide 3 etkene rastlamamışlardır. Özdamar ve Türkoğlu (2018) çalışmasında, koenfeksiyon oranı %20 (s: 50) olarak belirlenmiş ve bunların 3 tanesinde 3 etken bir arada saptanmıştır. Sancaklı, Yenigün ve ark. (2012),

çalışmalarında %9 oranında çoklu etken ile karşılaşmışlardır. Şık, Demirbuğa ve ark. (2020), çalışmasında 13 hastada çoklu viral enfeksiyon bulunmuştur. Birden fazla etkenin saptandığı enfeksiyonlarda en sık konulan tanı Rhinovirüs ve RSV olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda ise 244 çocuktan 44'ünde birden fazla etkenin saptandığı enfeksiyona rastlanmıştır. En sık rastlanan Rhinovirüs/Enterovirüs ve RSV'dir. Hastaların 1'inde 4 etken, 5'inde 3 etken bir arada saptanmıştır.

Mevsimsel influenza virüsleri insanlar arasında dolaşan ve her yıl enfeksiyonlara neden olan virüslerdir. Özellikle bazı yüksek riskli bireylerde hafif veya şiddetli hastalığa ve hatta ölüme neden olabilir (Oshansky and Thomas 2012). Düzenli olarak meydana gelen influenza virüs salgınlarının şiddeti, virüsteki farklı gen bölgelerine göre değişebilmektedir. İnfluenza virüs salgınlarının en son örneği İnfluenza A (H1N1)'dir (Neumann, Noda and Kawaoka 2009).

İnfluenza A ve B iki ana tür olarak mevsimsel gribe neden olmaktadır. Bunlardan influenza A virüsleri yüzey proteinlerinde oluşturdukları farklılıklara göre pandemi oluşturabilme yeteneğine sahiptir. DSÖ verilerine göre dünya genelinde influenza görülme sıklığının artış gösterdiği dönem aralık-nisan ayları arasında iken Türkiye'de bu dönem Aralık-Mart aylarını kapsamaktadır. Bizim çalışmamızda da İnfluenza A ve B pozitifliğinin en fazla Aralık-Ocak aylarında olduğunu bulduk.

Çalışmamızdaki verilere bakıldığında; İnfluenzanın mevsimsel dağılım özelliği gösterdiği görülmektedir; İnfluenza A pozitifliği Aralık ve Ocak ayında kümelenmiştir. Bicer, Giray ve ark. (2013), İnfluenza alt tipinin ayrımını yapmadan bu virüsün sıklığını %12,6 olarak rapor etmişlerdir. Gülen, Yıldız, Çiçek, Demir ve Tanaç (2014), İnfluenza sıklığını A alt tipinde %36/%20 ve B alt tipinde ise %1/%4 olarak vermişlerdir. Çalışmamızda ise İnfluenza virüslerinin dağılımı 8 (%9) İnfluenza A (tiplendirilmeyen), 59 (%64) İnfluenza A/H1N1, 1 (%1) İnfluenza A/H3N2, 24 (%26) İnfluenza B şeklindedir.

Halk Sağlığı Müdürlüğü'nün haftalık influenza raporuna göre 2019/45. haftasına kadar dolaşımda influenza B virüsü yer alırken, 2019/45. haftasından itibaren influenza

A(H1N1) virüsü dolaşıma girmiştir. Literatürde Aralık- Mart ayları arasında görülen İnfluenza B virüsü çalışmamızda da benzer şekilde 50. Haftadan itibaren görülmeye başlamıştır (Haftalık İnfluenza Sürveyans Raporu 2019).

Antiviral ilaçlar, virüslerin çoğalmasını önlemek için doğrudan virüslere etki eden ilaçlardır. İnfluenza profilaksi ve tedavisinde, B tipi influenza virüslere etkili olmadığı için ayrıca A tipi influenza virüslerine direnç geliştirdiği için M2 inhibitörleri kullanılmamaktadır. Günümüzde direnç düzeyi düşük olarak bilinen NA inhibitörleri tercih edilmektedir. Bu antivirallerden Oseltamivir, virüs üzerinde olumlu etki gösterdiği için ve ciddi bir yan etkisi olmadığı için DSÖ tarafından tavsiye edilmektedir.

İnfluenza olgularında erken dönemde başlanan antiviral tedavi hayat kurtarmaktadır. Vietnam'dan bildirilen bir çalışmada pandemik H1N1 için PCR testi pozitif olan 292 hastaya oseltamivir verilmiştir ve tedavinin beşinci gününde hastaların %86'sının pandemik H1N1 için yapılan PCR testi negatif çıkmıştır (Hien et al 2010).

Jain, Kamimoto, Bramley, Schmitz, Benoit, Louie, Sugerman, Druckenmiller, Ritger and Chugh (2009), çalışmasında ciddi pandemik H1N1 sebebiyle hastaneye yatırılan hastaların büyük kısmına Oseltamivir verilmiştir ve tedaviye başlama zamanı ortalama 3 gün, yoğun bakım gereksinimi olan hastalarda 6 gün, ölen hastalarda (48 saat içinde tedavi başlanmamış) 8 gün olarak tespit edilmiştir.

Antivirallerin kullanıma girmesinden sonra NA inhibitörlerine karşı direnç takibi başlamıştır. Sheu et al (2008), 2004-2008 yılları arasında dünya genelinde izole edilen 2364 influenza A suşu ile yaptığı çalışmada NA inhibitörü direnci araştırılmıştır. Sonuçta 6 tane A/H1N1 izolatında H275Y oseltamivir direnç mutasyonu, 1 tane A/H3N2 izolatında da E119V Oseltamivir direnç mutasyonu tespit edilmiştir.

Suzuki et al (2011), Ocak 2008, Aralık 2009 yılları arasında, Japonya'da toplam 427 İnfluenza A (H1N1) virüsünü Oseltamivir direnci açısından taramış ve 2007-2008 İnfluenza sezonunda 72 mevsimsel İnfluenza A (H1N1) izolatının hiçbirinde direnç saptamamıştır. Fakat 2008-2009 sezonunda 282 mevsimsel İnfluenza A (H1N1)

izolatının hepsinde oseltamivir direnci saptamıştır. 2009-2010 sezonunda ise hiç mevsimsel Influenza A (H1N1) virüsü saptanmamış olup 73 pandemik Influenza A 2009 (H1N1) virüsünün hiçbirinde oseltamivir direnci saptanmamıştır.

Payungpom et al (2011), Nisan 2009- Aralık 2010 tarihleri arasında Tayland'da, pandemik Influenza A 2009 (H1N1) virüsü olduğu saptanan 1288 örnek RRT PCR yöntemi ile oseltamivir direnci açısından incelenmiş ve sadece 4 tanesinde (%0,31) direnç saptamıştır.

Hoang, Nguyen, Nguyen, Nguyen and Le (2013), 2009-2012 yılları arasında, Vietnam'da toplam 341 örnek Influenza A pozitif bulunmuş ve bunlardan 215 tanesinde pandemik Influenza 2009 (H1N1) virüsü saptanmıştır. Bu örnekler pyrosekans yöntemi ile oseltamivir direnci açısından araştırılmış ve 3 örnekte (%1,4) direnç (H275Y) saptanmıştır.

Mosqueda-Gómez et al (2015), 2009-2012 yılları arasında Guajanuta, Meksika'da toplam 575 Influenza A 2009 (H1N1) virüsünü oseltamivir direnci açısından incelemiş ve sadece 1 (%0,17) örnekte H275Y direnç mutasyonu saptanmıştır.

Huang et al (2015), Eylül 2013- Mart 2014 tarihlerinde, Çin'de 1123 Influenza A 2009 (H1N1) virüsünü oseltamivir direnci açısından taramış ve toplam 24 (%2,14) örnekte H275Y direnci saptanmıştır.

Chidlow et al (2010), pandemik H1N1 virüsü olduğu bilinen 388 örnekte yaptığı direnç çalışmasında 4 örnekte H275Y mutasyonu saptanmıştır.

Okomo-Adhiambo et al (2015), Ekim 2013-Nisan 2014 tarihleri arasında Birleşik Devletler'de toplanan 4968 pandemik influenza A/H1N1 virüsü ile yapılan çalışmada oseltamivir direnci incelenmiştir. Örneklerin 59 (%1,2) 'unda direnç saptanmıştır.

Mohan et al (2021), Ekim 2019- Eylül 2020 tarihleri arasında Amerika'nın Teksas eyaletinde toplanan 951 pandemik influenza A/H1N1 izolatıyla yaptıkları oseltamivir

direnç çalışmasında, 4 (%0,4) örnekte H275Y mutasyonu saptanmıştır. Kasım 2019-Mart 2020 arasında 18 eyaletten toplanan 282 virüs üzerinde yürütülen ek sürveyans çalışmasında ise 6 (%2,1) örnekte daha H275Y virüsü saptanarak ülke çapında tespit edilen dirençli örnek sayısı 10 olarak belirtilmiştir. Bunlardan 4'ü Teksas kaynaklı 52 virüs arasında tespit edilmiştir.

Guldemir, Kalaycioglu, Altas, Korukluoglu ve Durmaz (2013), post pandemik dönemde Türkiye'de yaptıkları çalışmada, pandemik influenza A/H1N1 virüsü saptanmış 233 örnekte oseltamivir direnci araştırılmıştır ve dirence rastlanmamıştır.

Öksüz (2017) ün yaptığı tez çalışmasında, pandemik influenza A/H1N1 olduğu saptanan 131 suş oseltamivir duyarlılığı ve direnci açısından incelenmiştir. Dirence rastlanmayan çalışmada 58 (%44,3) suş oseltamivire duyarlı bulunurken 73 (%55,7) suş'tan düşük RNA kalitesi sebebiyle sonuç alınamamıştır.

Bu tez çalışmasında da 2019-2020 sezonundaki influenza epidemisi sırasında üst solunum yolu enfeksiyonu semptomları ile Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesine başvuran 354 hastadaki viral etkenlerin dağılımının irdelenmesinin yanı sıra İnfluenza A (H1N1) pozitif olarak bulunan 11 (%3,1) hasta örneğinde, en yaygın kullanılan antiviral olan Oseltamivir direnci araştırılmıştır. İzolataların hiçbirinde Oseltamivir direncine rastlanmamıştır. Çalışmanın sınırlılığı ise kısıtlı sayıda seçilen hasta örneklerinde direnç analizinin yapılmış olmasıdır. Ülkemiz için daha fazla sayıda örnekler ile yapılacak olan yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Sonuçta;

- Solunum yolu enfeksiyonlarının yarısından fazlasında (%66) viral etken saptanmıştır.
- İncelenen örneklerin %12,7 oranında birden fazla viral etken saptanmıştır.
- En sık karşılaşılan viral etkenin çocuklarda RSV A/B (%23), tüm yaş gruplarında İnfluenza A/H1N1 virüsü (%27,5) saptanmıştır.

- Bu çalışmada incelenen hasta örneklerinde influenza A virüslerinde Oseltamivir direncine rastlanmamıştır.
- İNFLUENZA A/H1N1 suşlarının Oseltamivir direnci açısından belli aralarla analizinin yapılması ampirik tedavinin yönlendirilmesinde önemlidir. İNFLUENZA benzeri semptomlar ile başvuran hastalarda, oseltamivir tedavisine gerekirse sadece klinik öngörü ile başlanması, İNFLUENZA enfeksiyonunun tedavisi ve komplikasyonların önlenmesi açısından önemli olabilir.



KAYNAKLAR

- Acar N., Koçak T. (2020). Koronavirüsle (Covid-19) mücadelede beslenmenin bağışıklık sisteminin desteklenmesinde rolü. *Gazi Sağlık Bilimleri Dergisi*, (Özel Sayı):18-45.
- Akarsu Çelebi, D. (2009). Yöremizde Üst Solunum Yolları Enfeksiyonlu Hastalara Ait Nazal Sekresyonların Influenza ve Avian Influenza Yönünden İncelenmesi. AÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Erzurum, (Danışman: Ülkü Altoparlak).
- Akçalı S., Yılmaz N., Güler Ö., Şanlıdağ T., Anıl M. (2013). Alt solunum yolu enfeksiyonu olan çocuklarda solunum yolu viral etkenlerinin sıklığı. *Türk Pediatri Arşivi*, 48(3): 215-220.
- Aktürk H., Sütçü M., Badur S., Hançerli Törün S., Çıtak A., Erol OB., Somer A., Salman N. (2015). İnfluenza ve diğer solunum yolu virüslerinin klinik ve epidemiyolojik özelliklerinin değerlendirilmesi. *Türk Pediatri Arşivi*, 50(4): 217.
- Altaş AB., Bayrakdar F., Korukluoğlu G. (2016). Pandemi sonrası beş ardaşık sezonda İnfluenza sürveyansı: Türkiye Ulusal İnfluenza Merkezi bulguları. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 50(3): 401-417.
- Altındış M., Dal T. (2016). Yeni bir viral tehdit: Enterovirüs D68. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 73(3): 293-305.
- Anders KL., Nguyen HL., Nguyen NM., Van Thuy NT., Hong Van NT., Hieu NT., Hong Tham NT., Thanh Ha PT., Lien le B., Vinh Chau NV., Ty Hang VT., Van Doorn HR., Simmons CP. (2015). Epidemiology and virology of acute respiratory infections during the first year of life: A birth cohort study in Vietnam. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 34(4): 361.
- Aslan, S. (2006). İnfluenza Virüsünün Tanısında Hücre Kültürü, Hızlı Test, Real Time PCR Yöntemlerinin Karşılaştırılması ve İzole Edilen Virüslerin Tiplendirilmesi, İÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İstanbul, (Danışman: Prof. Dr. E Bozkaya).

- Badur S. (2012). Pandemik Influenza A (H1N1) 2009: Ülkemizde ve dünyada epidemiyolojik özellikleri. *İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi*, 73(0).
- Bai, Y., Jones JC., Wong S., Zanin M. (2021). Antivirals targeting the surface glycoproteins of Influenza virus: Mechanisms of action and resistance. *Viruses*, 13(4): 624.
- Balkan İ. (2013). Pandemik grip. *Journal of Experimental and Clinical Medicine* 29(3s): 193-200.
- Banatvala JE., Zuckerman AJ., Griffiths P., Schoub B., Mortimer P. (2009). *Principles and practice of clinical virology*, Wiley.
- Batrel, A. (2020). SARS-CoV-2: Bulaşma ve korunma. *Southern clinics of Istanbul Eurasia*, 31(1): 1-7.
- Bicer S., Giray T., Çöl D., Erdağ GÇ., Vitrinel A., Gürol Y., Çelik G., Kaspar Ç., Küçük Ö. (2013). Virological and clinical characterizations of respiratory infections in hospitalized children. *Italian journal of pediatrics*, 39(1): 1-10.
- Bierbaum S., Königsfeld N., Besazza N., Blessing K., Rücker G., Kontny U., Berner R., Schumacher M., Forster J., Falcone V., Van de Sand C., Essig A., Huzly D., Rohde G., Neumann Haefelin D., Panning M. (2012). Performance of a novel microarray multiplex PCR for the detection of 23 respiratory pathogens (SYMP-ARI study). *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 31(10): 2851-2861.
- Broor S., Bharaj P. (2007). Avian and human metapneumovirus. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1102(1): 66-85.
- Caliendo AM. (2011). Multiplex PCR and emerging technologies for the detection of respiratory pathogens. *Clinical infectious diseases*, 52(supply4): 326-330.
- Calvo C., Pozo F., Garcia ML., Sanchez M., Lopez Valero M., Perez Brena P., Casas I. (2010). Detection of new respiratory viruses in hospitalized infants with bronchiolitis: a three-year prospective study. *Acta paediatrica*, 99(6): 883-887.

- Cevey Macherel M., Galetto Lacour A., Gervais A., Siegrist CA., Bille J., Bescher Ninet B., Kaiser L., Krahenbuhl JD., Gehri M. (2009). Etiology of community-acquired pneumonia in hospitalized children based on WHO clinical guidelines. *European journal of pediatrics*, 168(12): 1429-1436.
- Chidlow GR., Harnett GB., Williams SH., Tempone SS., Speers DJ., Hurt AC., Deng YM., Smith DW. (2010). The detection of oseltamivir-resistant pandemic influenza A/H1N1 2009 viruses using a real-time RT-PCR assay. *Journal of virological methods*, 169(1): 47-51.
- Chu HY., Kuypers J., Renaud C., Wald A., Martin E., Fairchok M., Margaret A., Sarancino M., Englund JA., (2013). Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus transmission in childcare. *Journal of Clinical Virology*, 57(4): 343-350.
- Coşgun Y. (2021), Herpesvirüsler ve Diğer DNA Virüsleri, İçinde: *Hemşireler İçin Mikrobiyoloji*, Editör: Altındış M., Ankara Nobel Tıp Kitabevleri, Ankara, Syf:372-373.
- Crenshaw BJ., Jones LB., Bell CR., Kumar S., Matthews QL. (2019). Perspective on adenoviruses: epidemiology, pathogenicity, and gene therapy. *Biomedicines*, 7(3): 61.
- Çalışkan Eryeğen, K. (2011). Solunumsal Patojen Viruslar ve İnfluenza A H1n1 (Domuz Gribi)'Nin Multiplex Pzr Yöntemleri ile Tanısı, AKÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Afyonkarahisar, (Danışman: Prof. Dr. M Altındış).
- Çelebi Ö. (2009). Yöremizde Gribal Enfeksiyonlu Hastaların Üst Solunum Yolu Örneklerinde İnfluenza Virüs Araştırılması, AÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Erzurum, (Danışman: Doç. Dr. Ü Altıparlak).
- Çelebi Ö., Ayyıldız A. (2021). Yöremizde gribal enfeksiyonlu hastaların üst solunum yolu örneklerinde İnfluenza virus Araştırılması, *Van Medical Journal*, 28(2): 288-293.

- Çiçek C. (2014). Yeni bulunan eski solunum virüsü: Human metapneumovirus. *Ege Tıp Dergisi*, 53(2): 112-118.
- Çiçek C., Arslan A., Karakuş HS., Yalaz M., Saz EU., Pullukçu H., Çok G. (2015). Prevalence and seasonal distribution of respiratory viruses in patients with acute respiratory tract infections, 2002-2014. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 49(2): 188-200.
- Çiftçi E., Karbuş A., Kendirli T. (2016). İnfluenza ve oseltamivir kullanımı. *Türk Pediatri Arsivi*, 51(2): 63-71.
- Çıplak MA. (2011). Türkiye’de influenza A (H1N1, H3N2) Virus İzolatlarında Antiviral Direnç Mutasyonlarının Araştırılması, İÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İstanbul, (Danışman: Prof. Dr. S Badur).
- Demircili ME. (2018). Viral Enfeksiyonlarda Tanı Yöntemleri, İçinde: *Temel, Klinik ve Tanısal Tıbbi Viroloji*, Editör: Altındış M., Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, Syf: 22-23.
- Denny Jr FW. (1995). The clinical impact of human respiratory virus infections. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 152(4): 4-12.
- Devrim İ. (2005). Yeni tanımlanan solunum yolu virüsü insan metapnömovirüslerine bağlı enfeksiyonlar, *Hacettepe Tıp Dergisi*, 36(2): 163-167.
- Dikmen Uğraş A., Kına M., Özkan S., İlhan MN. (2020). COVID-19 epidemiyolojisi: Pandemi den ne öğrendik. *Journal of biotechnology and strategic health research*, 1(Özel Sayı): 29-36.
- Ducatez MF., Pelletier C., Meyer G. (2015) Influenza D virus in cattle, France, 2011-2014. *Emerg Infect Dis.*, 21(2):368-371.
- Esposito S., Daleno C., Prunotto G., Scala A., Tagliabue C., Borzani I., Fossali E., Pelucchi C., Principi N. (2013). Impact of viral infections in children with community-acquired pneumonia: results of a study of 17 respiratory viruses. *Influenza and other respiratory viruses*, 7(1): 18-26.

- Fischer Walker CL., Rudan I., Liu L., Nair H., Theodoratou E., Bhutta Z., O'Brien KL., Campbell H., Black RE. (2013). Global burden of childhood pneumonia and diarrhea. *Lancet*, 381(9875): 1405-1416.
- Frobert E., Escuret V., Javouhey E., Casalegno JS., Bouscambert Duchamp M., Moulinier C., Gillet Y., Lina B., Floret D., Morfin F. (2011). Respiratory viruses in children admitted to hospital intensive care units: evaluating the CLART® Pneumovir DNA array. *Journal of medical virology*, 83(1): 150-155.
- Gowin E., Bartkowska Sniatkowska A., Jonczyk Potoczna K., Wysocka Leszczynska J., Bobkowski W., Fichna P., Sobkowiak P., Mazur Melewska K., Breborowicz A., Wysocki J., Januszkiewicz Lewandowska D. (2017). Assessment of the usefulness of multiplex real-time PCR tests in the diagnostic and therapeutic process of pneumonia in hospitalized children: a single-center experience. *BioMed research international*, 2017.
- Gökçe, G. (2019). Nöraminidaz-Oseltamivir Etkileşiminin Homoloji Modellemesi, Moleküler Kenetleme ve Moleküler Dinamik Teknikleri ile Analizi, TOBB ETÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, (Danışman: Dr. Öğr. Üyesi E Ören).
- Grohskopf LA., Alyanak E., Broder KR., Walter EB., Fry AM., Jernigan DB. (2019). Prevention and control of seasonal influenza with vaccines: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices—United States, 2019–20 influenza season. *MMWR Recommendations and reports*, 68(3): 1.
- Guldemir D., Kalaycioglu AT., Altas AB., Korukluoglu G., Dumaz R. (2013). Monitoring genetic diversity of influenza A (H1N1) pdm09 virus circulating during the post-pandemic period in Turkey. *Japanese journal of infectious diseases* 66(4): 299-305.
- Gülen F., Yıldız B., Çiçek C., Demir E., Tanaç R. (2014). Ten year retrospective evaluation of the seasonal distribution of agent viruses in childhood respiratory tract infections. *Türk Pediatri Arşivi*, 49(1): 42.
- Haftalık İnfluenza (Grip) Sürveyans Raporu (2019). TC Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Ankara.

- Hall CB., Weinberg GA., Iwane MK., Blumkin AK., Edwards KM., Staat MA., Auinger P., Griffin MR., Poehling KA., Erdman D., Grijalva CG., Zhu Y., Szilagyi P. (2009). The burden of respiratory syncytial virus infection in young children. *New England Journal of Medicine*, 360(6): 588-598.
- Heim A. (2020). Adenovirusinfektionen. *Monatsschrift Kinderheilkunde*, 168(6): 514-523.
- Hershenson, M. B. (2013). Rhinovirus-induced exacerbations of asthma and COPD. *Scientifica* 2013.
- Hien TT., Boni MF., Bryant JE., Ngan TT., Wolbers M., (2010). Early pandemic influenza (2009 H1N1) in Ho Chi Minh City, Vietnam: a clinical virological and epidemiological analysis. *PLoS Med*, 7(5): e1000277.
- Hoang Vu M.P., Nguyen C.T., Nguyen le K.H., Nguyen T.K., Le Q.M. (2013). Oseltamivir resistance among Influenza viruses: Surveillance in Northern Vietnam, 2009-2012. *Western Pac Surveill Response J.* 4(2):25-9.
- Huang W., Li X., Cheng Y., Tan M., Guo J., Wei H., Zhao X., Lan Y., Xiao N., Wang Z., Wang D., Shu Y. (2015). Characteristics of oseltamivir-resistant Influenza A (H1N1) pdm09 virus during the 2013-2014 Influenza season in Mainland China; *Virology* 12:96-99.
- Jacques J., Moret H., Renois F., Leveque N., Motte J., Andreoletti L. (2008). Human Bocavirus quantitative DNA detection in French children hospitalized for acute bronchiolitis. *Journal of Clinical Virology*, 43(2): 142-147.
- Jain S., Kamimoto L., Bramley AM., Schmitz AM., Benoit SR., Louie J., Sugerman DE., Druckenmiller JK., Ritger KA., Chugh R., Jasuja S., Deutscher M., Chen S., Walker JD., Duchin JS., Lett S., Soliva S., Wells EV., Swerdlow D., Uyeki TM., Fiore AE., Olsen SJ., Fry AM., Bridges CB., Finelli L. (2009). Hospitalized patients with 2009 H1N1 influenza in the United States, April–June 2009. *New England Journal of Medicine*, 361(20): 1935-1944.

- Ju X., Fang Q., Zhang J., Xu A., Liang L., Ke C. (2014). Viral etiology of influenza-like illnesses in Huizhou, China, from 2011 to 2013. *Archives of virology*, 159(8): 2003-2010.
- Kanberoğlu Gİ., Güdeloğlu E., Bağ Ő., Ecevit Ő. (2021). Akut alt solunum yolu enfeksiyonu nedeniyle hastaneye yatan çocuklarda Multiplex-PCR ile saptanan enfeksiyöz etkenlerin değerlendirilmesi. *Pamukkale Tıp Dergisi*, 14(3): 10-10.
- Karaarslan F. (2019). Üst ve Alt Solunum Yolu Enfeksiyonu ile Çocuk Acilde İzlenen Hastalarda Viral Solunum Paneli ile Etkenlerin Araştırılması, İ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Uzmanlık Tezi, İstanbul, (Danışman: Doç. Dr. M Uysalol)
- Lukšić L., Kearns PK., Scott F., Rudan I., Campbell H., Nair H. (2013). Viral etiology of hospitalized acute lower respiratory infections in children under 5 years of age—a systematic review and meta-analysis. *Croatian medical journal* 54(2): 122-134.
- Martin ET., Kuypers J., Wald A., Englund JA. (2012). Multiple versus single virus respiratory infections: viral load and clinical disease severity in hospitalized children. *Influenza and other respiratory virses*, 6(1): 71-77.
- Mengelle C., Mansuy JM., Pierre A., Clauder I., Grouteau E., Micheau P., Saune K., Izopet J. (2014). The use of a multiplex real-time PCR assay for diagnosing acute respiratory viral infections in children attending an emergency unit. *Journal of Clinical Virology* 61(3): 411-417.
- Mohan T., Nguyen H., Kniss K., Mishin V., Merced Morales A., Laplante J., George K., Blevins P., Chesnokov A., Cruz J., Kondor R., Wentworth D., Gubareva L. (2021). Cluster of oseltamivir-resistant and hemagglutinin antigenically drifted Influenza A(H1N1) pdm09 viruses. *Emerging Infectious Diseases*, 27(7): 1953-1957.
- Moscona A. (2005). Oseltamivir resistance—disabling our influenza defenses. *New England Journal of Medicine*, 353(25): 2633-2636.

- Mosqueda-Gómez J.L., Belaunzarán-Zamudio P.F., Barba A., Córdova-Villalobos J.A., Cuellar-Rodríguez J.M., Ernesto Macías A. (2015). Surveillance of oseltamivir-resistant Influenza A (H1N1) pdm09 in Guanajuato State, Mexico from 2009 to 2012. *Rev Invest Clin.* 67(4):235-9.
- Murray P., Baron E., Jorgensen J., Landry M., Pfaller M. (2003). *Manual of Clinical Microbiology*, American Society for Microbiology Pres, Washington.
- Murray S., Skull S. (2002). Infectious disease: Poor health care worker vaccination coverage and knowledge of vaccination recommendations in a tertiary Australia hospital. *Australian and New Zealand journal of public health*, 26(1): 65-68.
- Neumann G., Noda T., Kawaoka Y. (2009). Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virüs, *Nature*, 459(7249): 931-939.
- Okomo-Adhiambo M., Fry AM., Su S., Nguyen HT., Elal AA., Negron E., Hand J., Garten RJ., Barnes J., Xiyan X., Villanueva JM., Gubareva LV. (2015). Oseltamivir-resistant influenza A (H1N1) pdm09 viruses, United States, 2013–14. *Emerging infectious diseases*, 21(1): 136-141.
- Oshansky CM., Thomas PG. (2012). The human side of influenza. *Journal of leukocyte biology*, 92(1): 83-96.
- Otlu B., Gürsoy NC. (2018). Sanger ve Yeni Nesil Dizileme (YND) Yöntemleri, Virolojide Kullanımı, İçinde: *Temel, Klinik ve Tanısal Tıbbi Viroloji*, Editör: Altındış M., Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, Syf: 355-364.
- Öksüz B. (2017). Influenza A 2009 (H1N1) Virüsünde H275Y Mutasyonunun Real-Time RT PCR Yöntemi ile Araştırılması, YÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans, İstanbul, (Danışman: Prof. Dr. G Çelik).
- Öz S., Altındış M. (2018). Respiratuvar Sinsityal Virüs, Parainfluenza Virüs, Metapneumovirüs, İçinde: *Temel, Klinik ve Tanısal Tıbbi Viroloji*, Editör: Altındış M., Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, Syf: 155-168.

- Özdamar M., Türkoğlu S. (2018). Detection of respiratory pathogens in lower respiratory tract infections by multiplex real time PCR in Kocaeli/Istanbul region in 2015-2017. *Medeniyet Medical Journal*, 33(3): 188-194.
- Özdemir M. (2011). Konya Bölgesinde Grip Hastalığı Etkeni İnfluenza Virüslerinin Farklı Yöntemlerle Araştırılması, SÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Konya, (Danışman: Prof. Dr. S Yavru).
- Özdemir M. (2018). İnfluenza Virüsleri, İçinde: *Temel, Klinik ve Tanısal Tıbbi Viroloji*, Editör: Altındış M., Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, Syf: 193-205.
- Özdemir M., Fezyioğlu B., Uğur AR. (2021) İnfluenza, Koronavirüs ve Diğer RNA Virüsleri, İçinde: *Hemşireler İçin Mikrobiyoloji*, Editör: Altındış M., Ankara Nobel Tıp Kitabevleri, Ankara, Syf:379-406.
- Özden, Ö. (2010). İnfluenza A/H1N1 2009 Pandemisinde Dokuz Eylül Üniversite Hastanesi Çocuk Acil Servisine Grip Benzeri Hastalık Kliniği ile Başvuran Hastaların Değerlendirilmesi, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Uzmanlık Tezi, İzmir, (Danışman: Doç. Dr. M Duman).
- Özışık L., Çalık Başaran N., Ünal S. (2016). Her yönüyle İnfluenza 2016: Türkiye. *İç Hastalıkları Dergisi*, 23: 1-11.
- Paketçi, C. (2008). Çocuk Polikliniğimize Başvuran Hastalarda Hızlı Test ile İnfluenza Tanısı. SBÜ Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Uzmanlık Tezi, İstanbul, (Danışman: Doç. Dr. A Say).
- Pandemik İnfluenza Ulusal Hazırlık Planı (2019). TC Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Ankara.
- Patient A. (2009). Swine influenza A (H1N1) infection in two children—Southern California, March–April 2009. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 58.
- Payungpom S., Poomipak W., Makkoch J., Rianthavorn P. Theamboonlers A., Poovorawan Y. (2011). Detection of Osektamivir Sensiteve/ Resistanant of Pandemic Influenza A Virus (H1N1) From Patients Admitted to Hospitals in Thailand, *J Virol Methods*. 177(2):133-9.

- Pelit S., Bayraktar B., Bulut ME., Dalgıç Karabulut N., Nuhuğlu A. (2015). Alt solunum yolu enfeksiyonu olan çocuk hastalarda viral etkenlerin immunofluoresan ve immunokromatografik yöntemler ile araştırılması. *Şişli Etfal Hastanesi Tıp Bülteni*, 49(2): 118.
- Pettersson E., Lundeberg J., Ahmadian A. (2009). Generations of sequencing technologies. *Genomics*, 93(2):105-111.
- Qiu J., Söderlund Venermo M., Young NS. (2017). Human parvoviruses. *Clinical microbiology reviews*, 30(1): 43-113.
- Russell C., Jones T., Barr I., Cox N., Garten R., Gregory V., Gust I., Hampson A., Hay A., Hurt A., Jong J., Kelso A., Klimov A., Kageyama T., Komadina N., Lpedes A., Lin Y., Mosterin A., Obuchi M., Odagiri T., Osterhaus A., Rimmelzwaan G., Shaw M., Skepner E., Stohr K., Tashiro M., Fouchier R., Smith D. (2008). Influenza vaccine strain selection and recent studies on the global migration of seasonal influenza viruses. *Vaccine*, 26: D31-D34.
- Sancaklı Ö., Yenigün A., Kırdar S. (2012). Alt solunum yolu enfeksiyonunda nazofaringeal örneklerde polimeraz zincir reaksiyonu sonuçları. *Cocuk Enfeksiyon Dergisi*, 6(3): 84-9.
- Satzke C., Turner P., Virolainen Julkunen A., Adrian P., Antonio M., Hare K., Henao Restrepo A., Leach A., Klugman K., Porter B., Sa Leao R., Scott J., Nohynek H., O'Brien K. (2013). Standard method for detecting upper respiratory carriage of *Streptococcus pneumoniae*: updated recommendations from the World Health Organization Pneumococcal Carriage Working Group. *Vaccine*, 32(1): 165-179.
- Sheu T., Deyde V., Okomo Adhiambo M., Garten R., Xu X., Bright R., Butler E., Wallis T., Klimov A., Gubareva L. (2008). Surveillance for neuraminidase inhibitor resistance among human influenza A and B viruses circulating worldwide from 2004 to 2008. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52(9): 3284-3292.
- Simoës E., Cherian T., Chow J., Shahid Salles S., Laxminarayan R., John T. (2006). Acute respiratory infections in children. Disease Control Priorities in Developing Countries. 2nd ed. Oxford University Press, New York. p483-497.

- Smith NM., Bresee JS, Shay DK, Uyeki TM, Cox NJ, Strikas RA. (2006). Prevention and control of Influenza recommendations of the advisory committee on immunization practices. *MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report*, 55(RR-10): 1-48.
- Sullivan S., Jacobson R., Dowdle W., Polad G. (2010). 2009 H1N1 Influenza. *Mayo Clinic Proceedings*, 85(1): 64-76.
- Suzuki Y., Saito R., Sato I., Zaraket H., Nishikawa M., Tamura T., Daput C., Capering-Daput I., Baranovich T., Suzuki T., Suzuki H. (2011). Identification of oseltamivir resistance among pandemic and seasonal Influenza A (H1N1) viruses by an His 275 try genotyping assay using the Cycling Probe Method, *J Clin Microbiol.*, 49(1):125-30.
- Şanlı K. (2010). İnfluenza virüsü ve domuz gribi. *Jinekoloji obstretrik pediatri dergisi*, 2(1): 4-12.
- Şık G., Demirbuğa A., Annayev A., Cabiri A., Deliceo E., Çıtak A. (2020). Çocuk yoğun bakım ünitesinde alt solunum yolu enfeksiyonu tanısıyla yatan hastalarda viral patojen sıklığı ve hastaların klinik özellikleri. *Cocuk Enfeksiyon Dergisi*, 14(1): 27-32.
- Tam P. (2013). Approach to common bacterial infections: community-acquired pneumonia. *Pediatric Clinics*, 60(2): 437-453.
- Thompson MG., Shay DK., Zhou H., Bridges CB., Cheng PY., Burns E., Bresee JS., Cox NJ. (2010). Estimates of deaths associated with seasonal influenza—United States 1976-2007. *MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report*, 59(33): 1057-1062.
- Tortora G., Funke B., Case C. (2016). Microbiology: An Introduction. (The control of microbial growth), *Pearson Education*, USA: 374.
- Torun S., Somer A., Salman N., Badur S., Kanturvardar M., Yekener E. (2013). Respiratory viruses; today's troubled agents, candidates for marker of diagnosis and prognosis. *Indian J Applied Research*, 3(10): 1-6.

- Treanor J. (2005). Principles and practice of infectious diseases. 7th ed. Ed. Sorrell, T. Churchill Livingstone, Philadelphia. s165.
- Trip H., Schonenberg D., Starreveld J., Versteegh F. (2009). An enterovirus epidemic in infants in the summer and fall of 2006. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 28(5): 469-472.
- Tsolia M., Psarras S., Bossios A., Audi H., Paldanius M., Gourgiotis D., Kallergi K., Kafetzis D., Constantopoulos A., Papadopoulos N. (2004). Etiology of community-acquired pneumonia in hospitalized school-age children: evidence for high prevalence of viral infections. *Clinical infectious diseases*, 39(5): 681-686.
- Tunç A., Atıcı F. (2020). Dünyada ve Türkiye’de pandemilerle mücadele: risk ve kriz yönetimi bağlamında bir değerlendirme. *Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Uluslararası Sosyal Bilimler Dergisi*, 5(2): 329-362.
- Us Dürdal A. (2010). Pandemik influenza infeksiyonunda etyopatogenez ve laboratuvar tanı yöntemleri. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 41: 13-27.
- Uyar Y., Günaydın M., Çetin M. (2000). Alt solunum yolu enfeksiyonu olan çocuklarda viral etiyolojinin indirek immünofloresan yöntemiyle araştırılması. *Mikrobiyol Bul*, 34: 339-345.
- Uzuner H., Karadenizli A. (2018). Bunyavirüsler, İçinde: *Temel, Klinik ve Tanısal Tıbbi Viroloji*, Editör: Altındış M., Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, Syf: 291-300.
- Van Doremalen N., Morris D., Holbrook M., Gamble A., Williamson B., Tamin A., Harcourt J., Thornburg N., Gerber S., Smith J., Wit E., Munster V. (2020). Aerosol and surface stability of SARS-CoV-2 as compared with SARS-CoV-1. *New England Journal of Medicine*, 382(16): 1564-1567.
- Wang R., Taubenberger J. (2010). Methods for molecular surveillance of influenza. *Expert review of anti-infective therapy*, 8(5): 517-527.

- Waters D., Theodoratou E., Campbell H., Rudan I., Chopra M. (2012). Optimizing community case management strategies to achieve equitable reduction of childhood pneumonia mortality: An application of Equitable Impact Sensitive Tool (EQUIST) in five low–and middle–income countries. *Journal of global health*, 2(2): 020402.
- Weigl J., Puppe W., Gröndahl B., Schmitt H. (2000). Epidemiological investigation of nine respiratory pathogens in hospitalized children in Germany using multiplex reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 19(5): 336-343.
- Yıldırım A. (2019). Hacettepe Üniversitesi İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi'nde 2016-2017 ve 2017-2018 Mevsimsel İnfluenza Sezonunda İnfluenza Enfeksiyonuyla İlişkili Olabilecek Semptomlarla Hastaneye Yatmış ve Nazofarengeal Sürüntü Örneğinde İnfluenza Virüsü Tespit Edilmiş Çocuk Hastaların Klinik ve Epidemiyolojik Özelliklerinin ve Hastalığın Aileye Sosyal Yükünün Değerlendirilmesi, HÜ Tıp Fakültesi, Uzmanlık Tezi, Ankara, (Danışman: Prof. Dr. A Kara).
- Yıldız PA. (2016). Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Acil servisinde 2013-2014 ve 2014-2015 Kış Mevsiminde İnfluenza Benzeri Hastalık Tanısı ile Yatan Hastalarda İnfluenza ve Diğer Solunum Viruslarının Araştırılması. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Uzmanlık Tezi, Ankara, (Danışman: Prof. Dr. F Aktaş).
- Yüksel H, Y. Ö., Akçalı S, Söğüt A, Yılmaz Çiftdoğan D, Urk V, Ertan P, Şanlıdağ T. (2008). Küçük çocuklarda toplum kökenli viral alt solunum yolu enfeksiyonu etkenlerinin sıklığı ve uzun dönem komplikasyonu ile ilişkileri. *Mikrobiyol Bul.* 42(3): 429-435.
- Zambon M. (1998). Laboratory diagnosis of influenza. *Textbook of Influenza. Oxford: Blackwell Science*, 291-313.
- Zhu N., Zhang D., Wang W., Li X., Yang B., Song J., Zhao X., Huang B., Shi W., Lu R., Niu P., Zhan F., Ma X., Wang D., Xu W., Wu G., Gao G., Phil D., Tan W. (2020). A novel coronavirus from patients with pneumonia in China 2019. *New England Journal of Medicine*.382: 727-733.