

T.C.
AFYONKARAHİSAR KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SOLUNUMSAL PATOJEN VİRUSLARIN İFAT VE MULTİPLEX PCR
YÖNTEMLERİ İLE TANISI

Biyolog Ömer KANDEMİR

MİKROBİYOLOJİ ve KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Mustafa ALTINDIŞ


Tez No: 2007-026

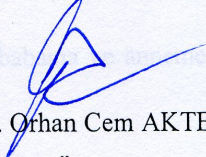
2007-AFYONKARAHİSAR

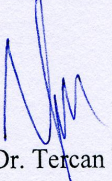
KABUL VE ONAY

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

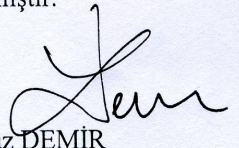
Tez Savunma Tarihi: 12 / 06 / 2007


Doç. Dr. Mustafa ALTINDIŞ
ÜYE


Doç. Dr. Orhan Cem AKTEPE
ÜYE


Prof. Dr. Tercan US
ÜYE

Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı yüksek lisans öğrencisi
Ömer KANDEMİR'in " Solunumsal patojen virusların IFA ve multiplex PCR yöntemleri
ile tanısı" başlıklı tezi 15./06/2007 günü saat 14.00 da Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve
Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.


Doç. Dr. Yavuz DEMİR
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Tez konusunun seçimi, planlanması ve yürütülmesi aşamasında engin bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Mustafa ALTINDIŞ'e, yetişmemde emeği geçen diğer bölüm hocalarım Yrd. Doç. Dr. İhsan Hakkı ÇİFTÇİ, Doç. Dr. Zafer ÇETİNKAYA ve Doç. Dr. Orhan Cem AKTEPE'ye, ayrıca gerek örneklerin toplanması gerekse laboratuvar çalışmalarında emeğini, bilgisini ve zamanını benimle paylaşan Dr. Raike KALAYCI'ya,

Eğitimim boyunca sabırla beni destekleyen Patoloji Bölümü'ndeki hocalarım ve laboratuvar personeline,

Bugünlere gelmemde çok büyük emekleri olan babama ve anneme her şey için çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	II
ÖNSÖZ	III
İÇİNDEKİLER	IV
SİMGELER VE KISALTMALAR	IX
ŞEKİLLER	X
TABLolar	XI
ÖZET	XII
SUMMARY	XIV
1. GİRİŞ	1
1.1. Respiratuvar İnfeksiyonların Epidemiyolojisi	2
1.2. Respiratuvar Viruslarda Patogenez	3
1.3. Respiratuvar Viruslar›n Tan›s›	4
1.3.1. Klinik Tan›	4
1.3.2. Laboratuvar Tan›s›	4
1.4. Respiratuvar Viruslar›n Yapt›klar› Hastal›klar	5
1.4.1. Rinit (Nezle=Soğuk Algınlığı, Common Cold)	6
1.4.2. Farenjit	7
1.4.3. Laringotrakeobronşit (Krup)	7
1.4.4. Bronşit	7
1.4.5. Bronşiolit	7
1.4.6. Viral Pnömoni	7
1.5. Respiratuvar Viral Patojenler	9
1.5.1. İnfluenza Viruslar	9
1.5.1.1. Morfoloji ve Genel Özellikleri	9
1.5.1.2. Antijen Yap›s›	10
1.5.1.3. Yüzey Glikoproteinleri	11
1.5.1.4. Viruslar›n Üremesi	11
1.5.1.5. Hastal›k ve Klinik Belirtiler	12
1.5.1.6. Patogenez ve İmmünite	13
1.5.1.7. Laboratuvar Tan›s›	14

1.5.1.7.1. Virusun Tanı için Örneklerin Toplanması ve Saklanması	14
1.5.1.7.2. Hızlı tanı Testleri	15
1.5.1.7.3. Embriyonlu Yumurtada Virus İzolasyonu	15
1.5.1.7.4. Hücre Kültüründe Virus İzolasyonu	15
1.5.1.7.5. Serolojik Tanı	15
1.5.1.7.6. Moleküler Biyoloji Yöntemleri	15
1.5.1.8. Epidemiyoloji	16
1.5.1.8.1. Antijenik Shift	16
1.5.1.8.2. Antijenik Drift	16
1.5.1.8.3. Avian İnfluenza	17
1.5.1.9. Tedavi, Korunma ve Kontrol	18
1.5.1.9.1. Tedavi	18
1.5.1.9.2. Korunma	18
1.5.1.9.3. Kontrol	19
1.5.2. Adenoviruslar	19
1.5.2.1. Genel Özellikleri	19
1.5.2.2. Antijenik Yapıları	20
1.5.2.3. Sınıflandırma	20
1.5.2.4. Replikasyon	21
1.5.2.5. Oluşturduğu Hastalıklar ve Klinik Bulgular	21
1.5.2.6. Patogenez ve İmmünite	23
1.5.2.7. Laboratuvar Tanı	24
1.5.2.7.1. Örneğin Alınması ve Muhafazası	24
1.5.2.7.2. Klinik Örnekten Direk Tanı	24
1.5.2.7.3. Adenovirus İzolasyonu	25
1.5.2.7.4. Serolojik Yöntemler	26
1.5.2.7.5. Moleküler Yöntemler	26
1.5.2.8. Epidemiyoloji	26
1.5.2.9. Tedavi, Korunma ve Kontrol	27
1.5.3. Parainfluenza Viruslar	28
1.5.3.1. Genel Özellikleri	28
1.5.3.2. Antijen Yapıları	29
1.5.3.3. Sınıflandırma	29
1.5.3.4. Replikasyon	30

1.5.3.5. Yaptığı Hastalıklar ve Klinik Bulgular	30
1.5.3.6. Patogenez ve İmmünite	31
1.5.3.7. Laboratuvar Tanı	31
1.5.3.7.1. Örnek Alınması ve Muhafazası	31
1.5.3.7.2. Klinik Örnekten Direk Tanı	32
1.5.3.7.3. Virus İzolasyonu	32
1.5.3.7.4. Moleküler Yöntemlerle Tanı	32
1.5.3.7.5. Serolojik Tanı	32
1.5.3.8. Epidemiyoloji	33
1.5.3.9. Tedavi, Korunma ve Kontrol	33
1.5.4. Rinoviruslar	33
1.5.4.1. Genel Özellikleri	34
1.5.4.2. Antijen Yapısı	34
1.5.4.3. Yaptığı Hastalıklar ve Klinik Bulgular	34
1.5.4.4. Patogenez ve İmmünite	35
1.5.4.5. Laboratuvar Tanı	35
1.5.4.5.1. Örnek Alınması ve Muhafazası	35
1.5.4.5.2. Virus İzolasyonu	35
1.5.4.5.3. Viral Antijenin Gösterilmesi	35
1.5.4.5.4. Serolojik Tanı	35
1.5.4.6. Epidemiyoloji	36
1.5.4.7. Tedavi ve Korunma	36
1.5.5. Respiratuvar Sinsityal Virus (RSV)	36
1.5.5.1. Genel Özellikleri	36
1.5.5.2. Antijenik Yapısı	37
1.5.5.3. Yaptığı Hastalıklar ve Klinik Bulgular	37
1.5.5.4. Patogenez ve İmmünite	38
1.5.5.5. Laboratuvar Tanı	39
1.5.5.5.1. Örneklerin Alınması ve Muhafazası	39
1.5.5.5.2. Tanı	39
1.5.5.6. Epidemiyoloji	40
1.5.5.7. Tedavi ve Korunma	40
1.5.6. Metapneumovirus	40
1.5.6.1. Genel Özellikleri	41
1.5.6.2. Yaptığı Hastalıklar ve Klinik Bulgular	41

1.5.6.3. Epidemiyoloji	42
1.5.6.4. Laboratuvar Tanı	42
1.5.6.5. Tedavi	42
1.5.7. Koronavirüsler	42
1.5.7.1. Sınıflandırma	43
1.5.7.2. Morfoloji	43
1.5.7.3. Replikasyon	43
1.5.7.4. Patogenez	43
1.5.8. Hantavirus	44
2. GEREÇ ve YÖNTEM	45
2.1. Çalışma Gruplarının Seçilmesi	45
2.2. Örnek Toplama Zamanı	45
2.3. Gereç	45
2.3.1. Örneklerin Alınması	45
2.4. Yöntem	46
2.4.1. PCR Çalışması	46
2.4.1.1. Ekstraksiyon Aşaması	47
2.4.1.1.1. İçerik	47
2.4.1.1.2. Çalışma	48
2.4.1.2. cDNA Eldesi	49
2.4.1.2.1. İçerik	49
2.4.1.2.2. Çalışma	49
2.4.1.3. PCR Aşaması	50
2.4.1.3.1. İçerik	50
2.4.1.3.2. Çalışma	50
2.4.1.4. Pürifikasyon Aşaması	50
2.4.1.4.1. İçerik	50
2.4.1.4.2. Çalışma	50
2.4.1.5. Denatürasyon Aşaması	51
2.4.1.5.1. Çalışma	51
2.4.1.6. Hibridizasyon Aşaması	51
2.4.1.6.1. İçerik	51
2.4.1.6.2. Çalışma	51
2.4.1.6.3. Yıkama İşlemi	51
2.4.2. İmmün Floresan Antikor (IFAT) Çalışması	52

2.4.2.1. İçerik	52
2.4.2.2. Çalışma	52
3. BULGULAR	55
4. TARTIŞMA	60
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	69
KAYNAKLAR	70

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
IFAT	: İndirek İmmunfloresan Antikor Testi
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ELISA	: Enzym Linked Immunosorbent Assay
EIA	: Enzym Immunoassay
RSV	: Respiratuvar Sinsityal Virus
CoV	: Koronavirüs
AdV	: Adenovirüs
SARS	:Severe Acute Respiratory Syndrome (Şiddetli Akut Solunum Sendromu)
PIV	: Parainfluenzavirüs
Flu	: İnfluenzavirüs
hMPV	: Human Metapnömovirüs
HA	: Hemaglütinin
NA	: Nöraminidaz
NT	: Nötralizasyon Testi
ELAHA	: Enzym Linked Amplicon Hybridization Assay
CA-DFA	: Culture Augmented Direct Florescent Antibody
m-RT- PCR	: Multipleks Revers Transkriptaz PCR
IC	: İmmunokromatografi
DID	: Double İmmündefüzyon
SRD	: Single Radyal Difüzyon
CF (KB)	: Kompleman Birleşmesi Deneyi
HPAIV	: High Pathogen Avian Influenza Virus
LPAIV	: Low Pathogen Avian Influenza Virus

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1	Solunum yollarında çeşitli respiratuvar virusların enfeksiyon oluşturduğu bölgeler	6
Şekil 1.2	İnfluenza virusun replikasyon siklusu	12
Şekil 2.1	Multiplex RT-PCR yönteminin işleyiş şeması	47
Şekil 2.2	IFAT'da inkübasyon tepsisi ve substrat pozisyon şeması	53
Şekil 2.3	FAT yönteminin işleyiş şeması	54

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1.1 Solunumsal virusların epidemiyolojik özellikleri	2
Tablo 1.2 Respiratuvar viral patojenlerin tanısında kullanılan örnekler ve laboratuvar testleri	5
Tablo 1.3 Solunum sistemi infeksiyonlarında viral etiyoloji	8
Tablo 1.4 İnfluenza virusun proteinleri	10
Tablo 1.5 6 Haziran 2007 tarihli WHO raporuna göre Avian influenza olgular ve ölü sayı	18
Tablo 1.6 Adenovirus alt gruplarının en sık izole edilen serotiplerinin insanda ilişkili olduğu hastalıklar	22
Tablo 1.7 Parainfluenza viruslarının yapısal proteinleri	29
Tablo 3.1. Örnek alınan hastaların demografik dağılımı ve PCR sonuçları	55
Tablo 3.2. Örnek alınan hastaların temel solunumsal bulguları, FAT ve PCR sonuçları	56
Tablo 3.3. Sol. örneklerden Multiplex PCR ile saptanan viruslar	57
Tablo 3.4. Kan örneklerinde solunumsal viruslara karşı oluşan IgM antikorlarının FAT ile pozitifliği	57
Tablo 3.5. Çocuklardan alınan örneklerde yedi solunumsal virusun FAT ve Multiplex PCR ile saptanan pozitiflik sonuçları	58
Tablo 3.6. Alınan örneklerde IFAT ve Multiplex PCR ile ortak çalışılan 4 solunumsal virusun sonuçları	59
Tablo 3.7. Çocuklardan toplanan 46 solunumsal örnek ve kan numunelerinde yedi solunumsal virus için FAT ve PCR sonuçları	59
Tablo 4.1. hMPV'nin farklı çalışmalardaki pozitiflik oranları	66

ÖZET

Antiviral tedavinin planlanması, hastane içi yayılımı önlemek, enfeksiyon takibi ve gözetimini sağlamak, hastane giderlerini ve hastanın hastanede kalış süresini azaltmak gibi sebeplerden dolayı respiratuvar viruslerin taranması ve tanınması oldukça önemlidir. Solunum yolu enfeksiyonu semptomları gösteren çocuklarda, floresan antikor tekniği veya kültürle izolasyon gibi standart laboratuvar metotları ile viruslar % 13- % 45 oranları arasında tespit edilebilmektedir. Bu çalışmada, akut solunumsal hastalık semptomları gösteren çocuklardan alınan nazofarengial sürüntü ve kan örneklerinde iki farklı yöntemle solunumsal viruslar ve onlara karşı gelişen IgM antikorlarının araştırılması ile klinik tanının desteklenmesi amaçlanmıştır.

Yeni geliştirilmiş ve kullanıma girmiş olan Multipleks kantitatif Revers Transkriptaz (RT) PCR Enzim Hibridizasyon Assay (Hexaplex Plus; Prodesse, USA) yöntemi ile nazofarengial örneklerden tek tüpte Respiratuvar Sinsityal Virus (RSV), İnfluenza Virus Tip A (FluA), İnfluenza Virus Tip B (FluB), Parainfluenza Virus Tip 1, 2 ve 3 (PIV1, PIV2 ve PIV3) ve Human Metapneumo Virus (hMPV) araştırılmıştır. Bu test yedi farklı solunumsal virusun araştırılması ve kantitasyonunda her virus için korunmuş bölgelerden hazırlanmış altı ve yarım primerler karıştırılarak hazırlanmıştır. Floresan antikor tekniği (FAT-Euroimmun GmbH, Almanya) ile de RSV, FluA H1N1, FluA H3N2, FluB, PIV1, PIV2, PIV3 ve Adenovirus (AdV)'e karşı kanda oluşmuş IgM antikorları araştırılmıştır.

Çalışma, bir yıllık dönemde, 46 hastadan alınan kan örnekleri ve nazofarengial sürüntü örnekleri ile gerçekleştirilmiştir. Örnek toplanan hastaların yaşları 1 ay- 13 yaş arasındadır (ortalama 16.4 ± 4.5 ay). Örneklerin % 52'si erkek, % 48'i bayan hastalardan oluşmaktadır.

Alınan 46 kan örneğinden 13 tanesi (% 28.3) FAT ile (MPV hariç), aynı sayıda nazofarengial sürüntü örneğinden 8 tanesi (% 17.4) multiplex PCR yöntemi ile (AdV hariç) bir veya daha fazla sayıda respiratuvar virus açısından pozitif olarak saptanmıştır ($P < 0.001$). Pozitif bulunan sonuçlar; multiplex PCR ile 8 FluA, 1 FluB, 5 hMPV, 3 PIV3 ve 1 RSV; FAT yöntemi ile 9 FluA H1N1, 8 FluA H3N2, 8 FluB, 3 PIV3 ve 2 RSV olarak saptanmıştır. Bulunan sonuçlar multiplex PCR ve FAT karşılaştırılması açısından değerlendirildiğinde; Multiplex PCR ve/veya FAT'da pozitif bulunan sonuçların sadece PCR'da pozitif bulunan sonuçlara oranı; RSV için

XIII

1/2 (% 50), FluA için 8/9 (% 88.9), FluB için 1/8 (% 12.5) ve PIV3 için 3/3 (% 100) olarak belirlenmiştir.

Sonuç olarak; Multiplex PCR ve FAT yöntemlerinin, çocuklarda respiratuvar viral patojenlerden kaynaklanan solunum yolu hastalıklarının hızlı laboratuvar tanısında tercih edilebilir olacağı kanısına varılmıştır.

Anahtar sözcükler: Solunumsal viruslar, IFAT, Multiplex PCR

SUMMARY

Accurate detection of respiratory viruses is important to guide antiviral therapy, prevent nosocomial spread, provide surveillance and in some cases, decrease hospital costs and lengths of stay. By using standard laboratory methods, such as staining with fluorescent antibodies (FAT) and isolation by culture, viruses have been detected in 13 to 45 % of children with symptoms of respiratory illness. In this study; two diagnostic methods used for respiratory viruses have shown acute respiratory tract infection symptoms in childrens.

Detection of IgM antibodies from blood by fluorescent-antibody (FAT-Euroimmun GmbH Germany) and Multiplex RT PCR assays (Hexaplex Plus, Prodesse Inc. USA) for detection of respiratory syncytial virus (RSV), influenza virus type A (FluA), influenza virus type B (FluB), parainfluenza virus types 1, 2, and 3 (PIV1, PIV2, and PIV3), human metapneumovirus (MPV) and adenovirus (AdV) from nasopharyngeal samples. A multiplex quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction-enzyme hybridization assay (RT-PCR) was developed and used to rapidly detect and quantitative RNA of seven viruses in nasopharyngeal specimens in a single test. Primers and probes originated from highly conserved regions of each viral genome. Six and a half primer pairs were mixed for the simultaneous detection and quantitation of RNA from seven different respiratory viruses. This was carried out in 46 nasopharyngeal and bloods specimens from children with respiratory illnesses collected over a 1-year period.

The median age of the patients from whom the specimens were collected was 16.4 ± 4.5 months (range 2 months to 13 years); Fifty-two percent of samples were from male patients, and 48 % were from female patients. Of these 46 blood specimens, 13 (28.3 %) were positive by FAT (2 for RSV, 9 for FluA-H1N1, H3N2, 8 for FluB, 3 for PIV3). Of these 46 nasopharyngeal specimens, 8 (17.4 %) were positive by Multiplex PCR (1 for RSV, 8 for FluA, 1 for FluB, 3 for PIV3, 5 for MPV, and 1 for both FluA and 5 for hMPV, AdV absent in Hexaplex Plus). The number of specimens positive only by PCR among specimens positive by PCR and/or FAT was 1 (50.0 %) of 2 for RSV, 8 (88.9 %) of 9 for FluA, 3 (100 %) of 3 for PIV3 ($P < 0.001$).

Use of both Multiplex PCR and FAT to identify viral respiratory pathogens in children will lead to improved diagnosis of respiratory illness.

Key Words: Respiratory viruses, IFAT, Multiplex PCR

1. GİRİŞ

Solunum yolu infeksiyonlar› tüm infeksiyonlar arasında en sık rastlanan hastalıklar arasındadır. Araştırmalar solunum yolu infeksiyonlarının iş gücü kaybı ve tedavi maliyeti ile ekonomiyi etkileyen hastalıklar arasında ilk sırada olduğunu göstermektedir. Akut solunum yolu hastalıklarının yaklaşık üçte ikisinde virusler etkindir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre her yıl 5 yaşın altındaki çocuklarda akut solunum yolu infeksiyonlarına bağlı dört milyon ölüm görüldüğü bildirilmektedir (1).

Erişkin ve çocuk hastalarda viral kökenli solunum yolu hastalıkları, önemli morbidite ve mortalite nedenidir. Antiviral ajanlar›n bir an önce tedavide kullanılması gereksiz antibiyotik tedavisinin azaltılması için, söz konusu viruslar›n etkin ve hızlı tanısının yapılması gereklidir. Bunun yanında solunumsal viruslar farklı mekanizmalarla bulaştığı için (temas, küçük veya büyük damlacık) tanılarının kısa sürede konmasıyla oluşan nozokomiyal enfeksiyonlar›n da önüne geçilmiş olacaktır. Ayrıca enfeksiyon takibi ve gözetimini sağlamak, hastane giderlerini ve hastanın hastanede kalış süresini azaltmak gibi sebeplerden dolayı respiratuvar viruslerin taranması ve tanısının konması oldukça önemlidir (2).

Solunumsal viral patojenlerin tanısında hücre kültür yöntemleri, çok uzun zaman alması ve gelişmiş laboratuvar olanakları gerektirmesi nedeniyle referans merkezleriyle sınırlı olarak uygulanabilmektedir. Bu etkenlere yönelik tanı daha çok serolojik testlerle konulmaktadır. Viruslara karşı gelişen antikorların saptanmasında başta ELISA ve IFAT yöntemleri sıklıkla kullanılmaktadır. Son zamanlarda laboratuvar uygulamalarına giren nükleik asit yöntemleri de bu etkenlerin tanısında kullanım alanı bulmuştur. Bu yöntemlerden özellikle IFAT ve multiplex PCR ile hızlı tanı koymak mümkündür (3).

Çalışmamızda, çocuklarda solunumsal viral patojenlere kısa sürede tanı koymak amacıyla nazofarengial sürüntü ve kan örneklerinde viral antijen ve antikorları saptamak için multiplex PCR yöntemi ve floresan antikor testi (FAT) uygulanmıştır.

1.1. Respiratuvar İnfeksiyonların Epidemiyolojisi

Respiratuvar viral infeksiyonların çok yaygın olmasının sebebi; çok sayıda infeksiyöz ajanın ve bunların çok sayıda serotiplerinin bulunması, bu ajanların kişiden kişiye etkin olarak bulaşabilme yeteneği ve influenza viruste olduğu gibi antijenik yapılarında değişikliklerin gerçekleşebilmesi olarak özetlenebilir.

Respiratuvar viral infeksiyonlar, yıl içerisinde belirli mevsimlerde yaygın olmakla birlikte sporadik vakalar ve nozokomiyal yayılım bütün yıl içerisinde görülebilmektedir. Ilıman bölgelerde influenza virus, respiratuvar sinsityal virüs (RSV), koronavirus (CoV) gibi zarflı virusler karakteristik olarak kış aylarında, rinovirus gibi zarfsız virusler ise ilkbahardan sonbahara değin geniş bir zaman aralığında yaygın, olarak infeksiyona neden olmaktadır (4) (Tablo 1.1).

Tablo 1.1: Solunumsal viruslerin epidemiyolojik özellikleri (5)

Virus	İnkübasyon periyodu (gün)	Bulaş yolu	Mevsimsel Dağılım	Nozokomiyal patojen
Adenovirus	4-7	Aerosol, direk	Yaz	Evet
Koronavirus	2-5	Damlacık	Kış	Küçük oranda
Influenza A ve B virusleri	1-4	Aerosol	Kış	Büyük oranda
Parainfluenza virus	3-6	Damlacık	Tip 1 ve 2, sonbahar; tip 3, ilkbahar ve yaz	Evet
RSV	2-8	Eller, damlacık	Sonbahar geç dönem ve ilk bahar	Büyük oranda
Rinovirus	1-5	Eller, damlacık	Sonbahar erken dönem ve ilk bahar	Evet

Viruslerin bulaşması açısından baktığımızda; kişiden kişiye yayılım virusün cinsine göre değişik yollarla olabilmektedir. Büyük damlacık yoluyla yayılım kısa mesafelerde etkin olmakla birlikte birçok respiratuvar virusün yayılımında sıklıkla karşılaşmaktadır. Özellikle influenza virus ve AdV'lerde yayılım havadaki küçük partiküller (aerosol) vasıtasıyla olmaktadır. Rinovirus ve RSV'de ise yayılım virusle kontamine eller ve eşyalarla temas sonucu virusların burun mukozası ve konjunktivaya yerleşmesi sonucu olmaktadır (Tablo 1.1).

İnfluenza virus başta olmak üzere parainfluenza ve RSV sıklıkla salgın oluşturan respiratuvar viral patojenlerdir. Özellikle kapalı ortamlarda bulunan popülasyonlarda (hastane, huzurevi, askeri kışlalar vs) salgın riski daha fazladır. Bu salgınlar, yaşlı hastalarda veya immünsüprese kişilerde yüksek oranda mortaliteye neden olabilmektedir (5).

1.2. Respiratuvar Viruslarda Patogenez

Birçok respiratuvar viral infeksiyonda hastalığın şiddeti viral replikasyonun hızına bağlı olmakla birlikte, çeşitli viruslerde hastalık tabloları değişik olabilmektedir. Rinovirus ve koronavirus daha çok üst solunum yollarında infeksiyona neden olurken, RSV, PIV, SARS CoV ve AdV alt solunum yolunu infekte etmektedirler. İmmünsüprese hastalarda ise bütün respiratuvar virusler genellikle alt solunum yolu infeksiyonuna neden olmaktadır.

Solunum sisteminde, burun, nazofarenks ve farenks; streptokok ve haemophilus gibi bazı patojenlerde dahil olmak üzere bakteriyel flora içerirler. Viral solunum sistemi infeksiyonları; üst solunum yollarındaki kalıcı bakteriyel flora üzerindeki etkileriyle bakteri kolonizasyon paternini değiştirirler ve solunum epiteline bakteri adezyonunu arttırlar, mukosilier temizliği azaltırlar ve fagositozu zayıflatırlar. Virusun konak defansını zayıflatması, normalde steril olması gereken yerlere de bakterilerin ulaşmasını ve sekonder bakteriyel infeksiyonların oluşmasını kolaylaştırır.

Viruslar, solunum yollarında alveollerde inflamasyona ve hemorajiye, hyalin membranda deformasyona ve değişik oranlarda epitel hasarına yol açmaktadırlar. Trakeobronşit ve solunum sisteminde epitel hasarı influenzanın tipik etkileridir. RSV ise yeni doğanlarda epitel hasarı ve dökülmesi, bronşial ödem ve küçük hava yollarının tıkanmasına neden olmaktadır. Rinovirus ve koronavirus nazal mukoza hasarına neden olmaktadır.

Hastalığın belirtileri ve şiddeti, hastanın immün sistemine, inflamatuvar mediatörlerin serbest bırakılmasına ve nörojenik reflekslere de bağlı olarak değişebilmektedir. Örneğin; çocuklarda RSV bronşiolitlerinde histamin, lökotrien C₄, eozinofilik katyonik protein ve virüse özgül IgE seviyelerinde artış görülmektedir. İnfluenzada kanda ve nazal sekresyonda viral replikasyon hızı ile uyum gösterecek şekilde, interlökin-6 (IL-6), interferon gamma (IFN- γ) ve tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) seviyelerinde artış gözlenmektedir. Ağır seyreden avian influenza infeksiyonlarında da TNF- α , IL-2, IL-6 ve IFN- γ 'nın serum düzeylerinde artış

görüldüğü tespit edilmiştir. İmmünizasyonda ise birçok respiratuvar viruse karşı serumda ve solunumsal sekresyonlarda nötralizan antikorlar mevcuttur. Genellikle immünite uzun ve birçok serotipte reinfeksiyon az görülmektedir. Bunun yanında PIV ve RSV'de reinfeksiyon sık görülebilmektedir. Bağışıklıkta hücresel ve humöral immünite rol oynamaktadır. İmmünkompromize hastalarda (AIDS, kemik iliği veya organ nakli yapılan hastalar vb.) ise respiratuvar viruslar uzun süren infeksiyonlara, ağır solunumsal rahatsızlıklara, organ nakillerinde uyumsuzluklara ve mortaliteye sebep olabilmektedirler (5).

1.3. Respiratuvar Virusların Tanı

1.3.1. Klinik Tanı

Respiratuvar viral infeksiyonlar; genellikle akut gelişen ve spontan olarak iyileşen infeksiyonlar olduğu gibi, ciddi komplikasyonlara da (otitis media, sinüzit, astım) tetikleme, kronik pulmoner hastalık) neden olabilmektedirler. Klinik tanıları; birbirine benzeyen klinik tablolar sergilemeleri nedeniyle oldukça zordur. Bu yüzden klinik tanı influenza epidemileri ve RSV'nin sebep olduğu bronşiolit salgınları gibi durumlarda konulabilmektedir. Virus ve sendrom arası ilişki kurmak klinik açıdan sınırlı olmaktadır. Bundan dolayı hastaneye başvuran hastalardan alınan örneklerde hızlı virolojik tanı teknikleri ile tanı konulabilmektedir (Tablo 1.1). Ayrıca klinik tanının konması açısından hasta verilerinin toplandığı süreyans programları geliştirilmiş ve toplum içerisinde hangi virusün etkin olduğu tespit edilerek klinik tanının konmasında kolaylık sağlanmıştır (6).

1.3.2. Laboratuvar Tanı

Birçok virusün çeşitli tekniklerle; burun ve boğaz sürüntüsü, nazal aspirat, burun yıkama sıvısı, balgam, bronkoalveolar lavaj, trakeal aspirat ve kan gibi örneklerden laboratuvar tanısı konulabilmektedir. Laboratuvar testleri erken teşhis konulan hastalardan alınan örneklerde daha duyarlı sonuçlar vermektedirler. SARS'ta ise hastalığın ilk evresinde alınan örneklerle yapılan çalışmalar yanlış negatif sonuçlar verebilmektedirler. Yetişkinlerde, çocuklara nazaran bazı virusler daha yavaş üremekte ve düşük titrede bulunabilmektedirler, bu yüzden yetişkinlerden alınan örneklerde virus izolasyonu daha geç olmakta ve hızlı tanı testlerinde de viral ürünler saptanamayabilmektedir. Hücre kültürü inokülasyon (shell vial) tekniği; AdV, influenza virus, PIV ve RSV için % 80 oranında özgüllük göstermektedir. IFAT ve EIA testleri; özellikle RSV ve influenza viruslerin tanı açısından oldukça duyarlı ve özgül yöntemlerdir. Nükleik asit amplifikasyon teknikleri ise birçok respiratuvar virus

açısından (SARS-CoV dahil) en özgül ve en duyarlı tanı yöntemleridir. Serolojik tanı yöntemleri ise direk tanı yöntemlerine göre daha geç sonuç veren yöntemlerdir. Antikorları tespit edebilen çok sayıda serolojik tanı yöntemi mevcuttur. Bunlar; nötralizasyon testi, hemagglütinasyon inhibisyon testi, kompleman fiksasyon testi ve ELISA teknikleridir (5) (Tablo 1.2).

Tablo 1.2 : Respiratuvar viral patojenlerin tanımlanmasında kullanılan örnekler ve laboratuvar testleri (5).

Virus	Örnek tipi	Hücre kültürü ile izolasyon zamanı (gün)	Hızlı tanı teknikleri ve moleküler teknikler	Serolojik teknikler
Adenovirus	Solunum sistemi, boğaz, konjunktiva, idrar, gaita, kan	2-10	EIA, IF, RT-PCR, IC	CF
Koronavirus	Nazofarenks	Rutinde yok	Rutinde yok, RT-PCR, IF	Rutinde yok (ELISA)
Influenza A ve B virusleri	Nazofarenks, alt solunum yolu	2-5	EIA, IF, nörominidaz testi, RT-PCR	CF, HAI, ELISA
Parainfluenza virus	Nazofarenks, alt solunum yolu	3-14	IF, RT-PCR	CF, HAI, ELISA
RSV	Nazofarenks, alt solunum yolu	3-14	EIA, IF, RT-PCR	CF, ELISA, NT
Rinovirus	Nazofarenks	2-7	Rutinde yok, RT-PCR	Rutinde yok (NT)

CF = Kompleman fiksasyon; EIA = enzim immunoassay; ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay; HAI = Hemagglütinasyon inhibisyon; IC = immunokromatografi; IF = immunofloresan; NT = nötralizasyon; RT-PCR = revers transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu

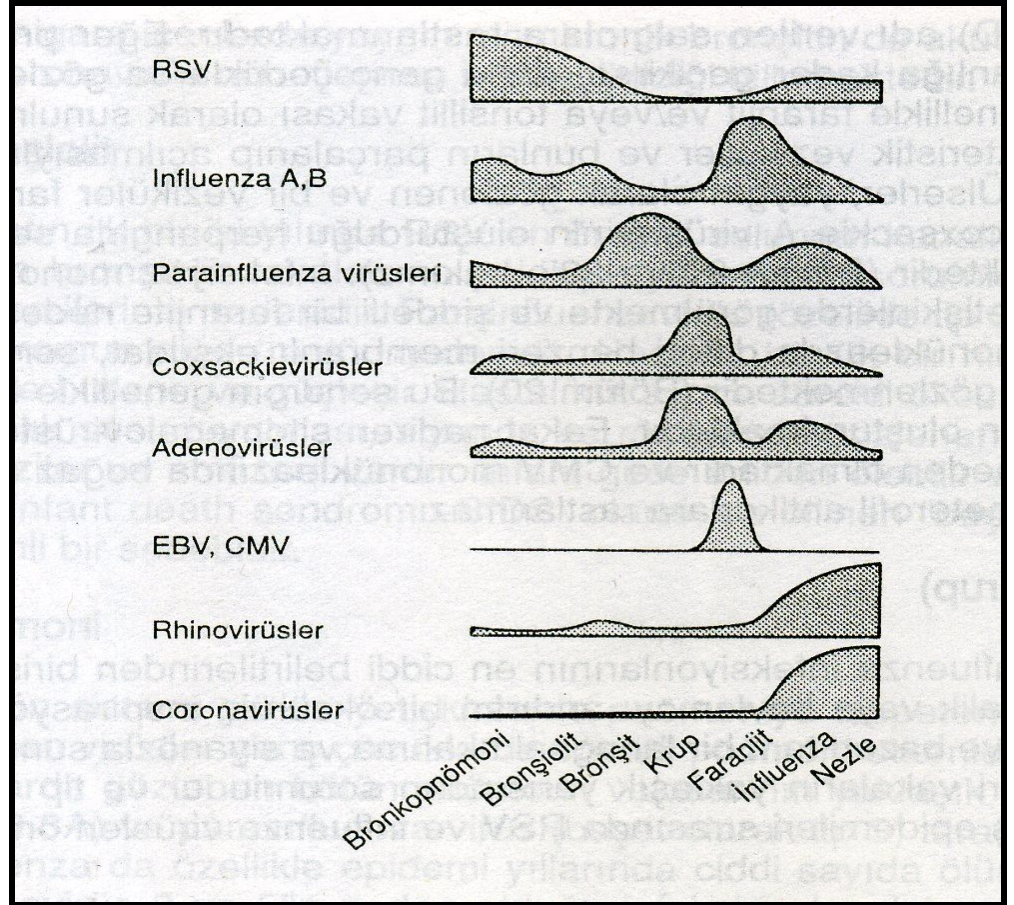
1.4. Respiratuvar Virusların Yapı ve Hastalıkları

Bazı viruslar solunum yollarında belirli bölgelerde infeksiyon oluştururken, çoğu virus bütün bölgelerde infeksiyon oluşturabilmektedir (6) (Şekil 1.1).

1.4.1. Rinit (Nezle=Soğuk algınlığı, Common cold)

Klasik olarak soğuk algınlığı fazla miktarda sulu burun akıntısı, burun tıkanıklığı, hapşırma, hafif boğaz ağrısı ve öksürükle karakterizedir. Ateş görülmez veya çok azdır. Bütün soğuk algınlığı infeksiyonlar viral nedenlidir. Rinovirusler bütün soğuk algınlığı vakalarının yaklaşık % 50'sinden sorumludur ve birkaç serotipi yılın her mevsiminde görülür. Koronavirüsler ise temel olarak kış aylarında hastalıklara neden olurlar ve soğuk algınlığı vakalarının % 15'inden sorumludur. Özellikle coxackie virus A21, A24, echovirus 11 ve 20 gibi bazı enterovirusler de yaz aylarında ateşle ve boğaz ağrısı ile seyreden soğuk algınlıklarına neden olurlar. Çocuklarda RSV, PIV ve bazı AdV subtipleri bütün üst solunum yolu infeksiyonlarının yaklaşık % 50'sinden sorumlu tutulmaktadır (6).

Şekil 1.1 : Solunum yollarında çeşitli respiratuvar virusların infeksiyon oluşturduğu bölgeler



1.4.2. Farenjit

Farenjit vakalarının çoğu viral orijinlidir. Boğaz ağrısı, halsizlik, ateş ve/veya lenfadenopati semptomları görülebilir. İnfluenza, PIV ve rinovirusler tüm yaşam boyunca farenjite neden olabilir. Ancak, diğer ajanlar belirli yaş gruplarında yaygındır. RSV ve AdV genç çocuklarda, herpesvirusler ise adolesan ve genç yetişkinlerde infeksiyon oluşturabilirler (6).

1.4.3. Laringotrakeobronşit (Krup)

Krup, PIV ve influenza infeksiyonlarının en ciddi belirtilerinden birisidir. Genç çocuklar; ateş, metalik veya havlamayı andıran öksürük, solunum güçlüğü ve bazen tam bir laringeal tıkanma ve siyanoz görülür. PIV vakaların yaklaşık yarısından sorumludur ve tip 1 tip 2'den daha yaygındır. Kış epidemileri sırasında RSV ve influenza virusleri önemli etiyolojik ajanlardır (6).

1.4.4. Bronşit

Akut bronşit; trakea ve bronşların inflamasyonu sonucu, ağır ve uzamış öksürüklü akut solunum hastalığı olarak tanımlanabilir. Her yaşta, tüm solunum yolu infeksiyonlarında olguların yarıdan fazlasında öksürük vardır. Ancak en fazla 5 yaş altı çocuklarda, yaygın solunum infeksiyonu ile birlikte görülür. En sık etken soğuk algınlığı virusları (Rinovirus ve Koronavirüs) ile daha invaziv olan İnfluenza ve Adenovirüslerdir. İnfluenza salgınlarında görülme oranı artar. Kızamık ağır klinik form oluşturması ile önemlidir (6).

1.4.5. Bronşiolit

Hayatın ilk yıllarında RSV en önemli solunum yolu patojenidir. İnfantlardaki bütün bronşiolit vakalarının neredeyse yarısından sorumlu olan RSV özellikle kış epidemilerinin nedenidir. PIV (özellikle tip3) ve influenza virus bronşiolitin diğer majör etkenleridir. Hastalık büyük bir hızla gelişebilir. Soluk alıp verme hızlanır ve güçleşir. Ayrıca öksürük, ekspirasyon sırasında ıslık sesi duyulması, siyanoz görülebilir. İnfant, gece aniden ölebilir ve dolayısıyla RSV, “sudden infant death sendromu (SIDS)” olarak da bilinen beşik ölümlerinin önemli bir sebebi olarak gösterilir (6).

1.4.6. Viral Pnömoni

Pnömoni genelde 50-60' lı yaşlarda görülür. Kışın olgu sayısı artmakla birlikte pnömoninin mevsimi olmadığı kabul edilir. Hastaların % 58-89'unda altta yatan bir veya birden fazla hastalık vardır. Erişkinlerde özellikle de çocuklarda viruslar, önemli etkenlerdir. Hastaneye yatan erişkinlerin %8'i, pediatri

polikliniklerinde tüm pnömonilerin %16'sında viruslar etkindirler. Çocuklarda hastane kökenli pnömoniler tanımlanmış ve yine en sık etkenin RSV ve PIV olduğu saptanmıştır. Aslında viral tanı için yeterli işlem yapılamadığı için gerçek oranlar daha da yüksek olabilir. Mevsim ve yaş grubuna göre farklı viruslar ön plana çıkabilmektedir. Erişkinlerde İnfluenza A, B, Adenovirus 4,7; çocuklarda RSV, PIV ve Flu A daha yaygın olarak görülmektedir (6)(Tablo 1.3).

Tablo 1.3: Solunum Sistemi İnfeksiyonlarında Viral Etiyoloji (7).

Virus	Nükleik Asit	Hastalık
Adenovirus	DNA	Soğuk algınlığı, bronşit, bronşiolit, faringokonjonktival ateş, pnömoni
Koronavirus	RNA	Soğuk algınlığı SARS
Orthomyxovirus Influenza	RNA	İnfluenza, soğuk algınlığı, farenjit, krup, bronşit, bronşiolit, pnömoni
Paramyxovirus Kızamık Parainfluenza RSV	RNA	Kızamık, pnömoni, bronşektazi Soğuk algınlığı, krup, bronşit, bronşiolit, pnömoni Soğuk algınlığı, krup, bronşit, bronşiolit, pnömoni
Picornavirus, Enterovirus Coxsackie Echo Rhinovirus	RNA	Soğuk algınlığı ve akut respiratuvar hastalık, Herpangina Soğuk algınlığı (?) Soğuk algınlığı
Herpes virus Herpes simpleks virus HSV Sitomegalovirus, CMV Varicella-Zoster (VZV) Epstein-Barr (EBV) HHV-6	DNA	Akut farenjit, Kronik ülseratif farenjit, trakeit, pnömoni Mononükleozis, Akut ve Kronik farenjit Pnömoni Mononükleozis, Akut ve Kronik farenjit Pnömoni
Filovirus	RNA	Farenjit
HIV	RNA	Primer infeksiyon sırasında farenjit

1.5. RESPIRATUVAR VİRAL PATOJENLER

1.5.1. İNFLUENZA VİRUSLAR

Grip; influenza virusunun üç tipinden biri tarafından meydana getirilen akut, bulaşıcı solunum yolu hastalıklarından birisidir. Hastalık genellikle akut bir başlangıçla epidemik formda oluşur ve hızlı bir şekilde bir coğrafik bölgeye yayılır. Epidemiler geniş bir yaş spektrumunu içine alır. Salgının genişliği fokal salgınlardan pandemilere kadar değişebilir. Virusun A, B ve C olarak adlandırılan üç immunolojik tipi olup epidemiler daha çok A, daha az olarak da B tipi ile meydana gelmektedir. Toplanan epidemiyolojik bulgular özel bir coğrafik bölgede oluşan salgının İnfluenza tip A (Flu A) ile her iki ile üç yılda, İnfluenza tip B (Flu B) ile her dört ile altı yılda bir meydana geldiğini göstermiştir (8). Her iki influenza virus tipinin epidemilerinin ılıman iklimlerde sonbahar sonu ile ilkbahar başlangıcı arasında meydana geldiği tespit edilmiştir. Tropikal iklimlerde ise hastalığın hüküm sürme mevsimi daha kısadır (9).

1.5.1.1. Morfoloji ve genel özellikler

İnfluenza virus, orthomyxovirus ailesindedir. Helikal simetrik, zarflı ve negatif polariteli tek zincirli RNA virusudur. Virus 80-120 nm çapında, pleomorfik, küresel yapıdadır. Yaklaşık olarak %1 RNA, %7 karbonhidrat, %22 lipid ve % 70 proteinden oluşmaktadır (10).

RNA içeriği olarak her üç tipin genomu, yaklaşık 900-2400 nükleotidden oluşan negatif polariteli tek sarmallı RNA segmentlerinden meydana gelmektedir. A ve B viruslarının sekiz segmenti, C virusunun ise 7 segmenti bulunmaktadır (10).

İnfluenza tip A virusunda bu segmentlerden üçü nükleik asit kopyalanmasından ve çoğalmasından sorumlu olan PB1, PB2 ve PA'dır. Diğer üç gen nükleoprotein, hemaglütinin ve nörominidaz proteinlerini kodlar ve sınırlama için kullanılır. Gen 7 matriks proteinlerini kodlar. Gen 8 ise yapışal olmayan NS1 ve NS2 proteinlerini kodlar. Protein içeriği; saf influenza virionlarının elektroforetik analizi sonucu molekül ağırlığı 25.000-100.000 dalton arasında değişen 8 ayrı polipeptid ortaya çıkarılmıştır. En büyük üç polipeptid P1, P2 ve P3 olarak adlandırılır ve virusun iç kısmında az miktarda bulunmaktadır. Virus RNA'sının polimeraz aktivitesi ve RNA'nın replikasyonu ile ilgilidir. Nükleoprotein polipeptidi, iç ribonükleoprotein komponentinin alt ünitesidir. Matriks polipeptidi virionda en fazla miktarda bulunan

polipeptiddir. Yüzeyle ilgili iki proteini bulunmaktadır. Bunlar hemaglutinin ve nörominidaz proteinleridir (11) (Tablo 1.4).

Tablo 1.4: İnfluenza virusun proteinleri (11).

Gen Segmenti	Protein Tanımı	Fonksiyon	Antijenite
1	PB2	RNA Sentezi	?
2	PB1	RNA Sentezi	?
3	PA	RNA Sentezi	?
4	HA	Hemaglutinin	Alt tip-spesifik
5	NA	Nöraminidaz	Alt tip-spesifik
6	NP	RNA Sentezi	Tip-spesifik
7	M1,M2	Matriks	Tip-spesifik
8	NS1.NS2	Non-Strüktürel	?

Lipid içeriği; yaklaşık lipid içeriğinin % 64'ü fosfolipid, % 33'ü kolesterol ve % 1-2'si glikolipid yapısındadır. Virionun lipid yapısı, genellikle virusun ürediği hücrenin yapısına göre değişkenlik göstermektedir. Karbonhidrat içeriği; virusun içeriğinde bulunan karbonhidratlar protein ve lipidlere bağlı olarak bulunmaktadır. Karbonhidratların hemen hepsi hemaglutinin polipeptidinde bulunmuştur (10).

1.5.1.2. Antijen yapısı

İnfluenza virusunun A, B ve C olmak üzere üç antijenik tipi vardır. Bunlar arasında antijen yapısı ve diğer özellikleri bakımından üzerinde en fazla çalışılan virus tipi, Flu A'dır. Virus partikülünde bulunan polipeptidlerden dördü, antijen özelliği taşır. İçte nükleoprotein ve matriks protein tipe özeldir ve antijenik olarak değişmezler. Nükleoprotein; virusun A, B ve C olarak tiplendirilmesinden sorumludur. Enfeksiyon sonrası, nükleoprotein ve matriks proteine karşı oluşan antikorlar kısa ömürlüdür ve koruyucu özelliğe sahip değildirler. Buna karşılık hemaglutinin ve nörominidaz antijenleri alt tipe özeldir ve değişkendir. Hemaglutinasyon inhibisyon antikorları, viral enfektiviteyi nötralize eder ve en önemlisi insanlarda influenzaya karşı bağışıklığı sağlar. Nöraminidaz ise enfekte

hücrede görülür. Özel antinöraminidaz antikorlarının deneysel olarak hastalığın şiddetini azalttığı gösterilmiştir. Şimdiye kadar influenza A viruslarda 16 HA ve 9 NA tipi belirlenmiştir (12).

1.5.1.3. Yüzey glikoproteinleri

Hemaglütinin ve nöraminidaz antijenleri konağın bağışıklığında, influenza viruslarının antijenik değişikliğinde ve enfeksiyonun serolojik tanısında önemli rol oynayan antijenlerdir. Hemaglütinin, ökaryotik hücre membranlarında bulunan N-asetil nöraminik asit (NANA) parçalarına bağlanır. Hücreye giriş endozomlar yolu ile, hemaglütinin ayağının açılımı ve plazma membran ve viral zarfın erimesi ile olur. Nükleokapsitler, nükleusta toplanır. Virionların bir araya gelmesi plazma membranında olur. Olgun virus tomurcuklanma yoluyla hücreden serbest bırakılır. Lipid zar tomurcuklanma sürecinde tamamlanır. Yeni oluşan virionların yüzey glikoproteinleri karbonhidrat yapılarının parçası olarak NANA'ya ihtiva eder. Nöraminidaz ise NANA'nın enzimatik artıklarını dağıtarak küme oluşumunu engeller. Böylece serbest enfektif partikül sayısında artış meydana gelir (13).

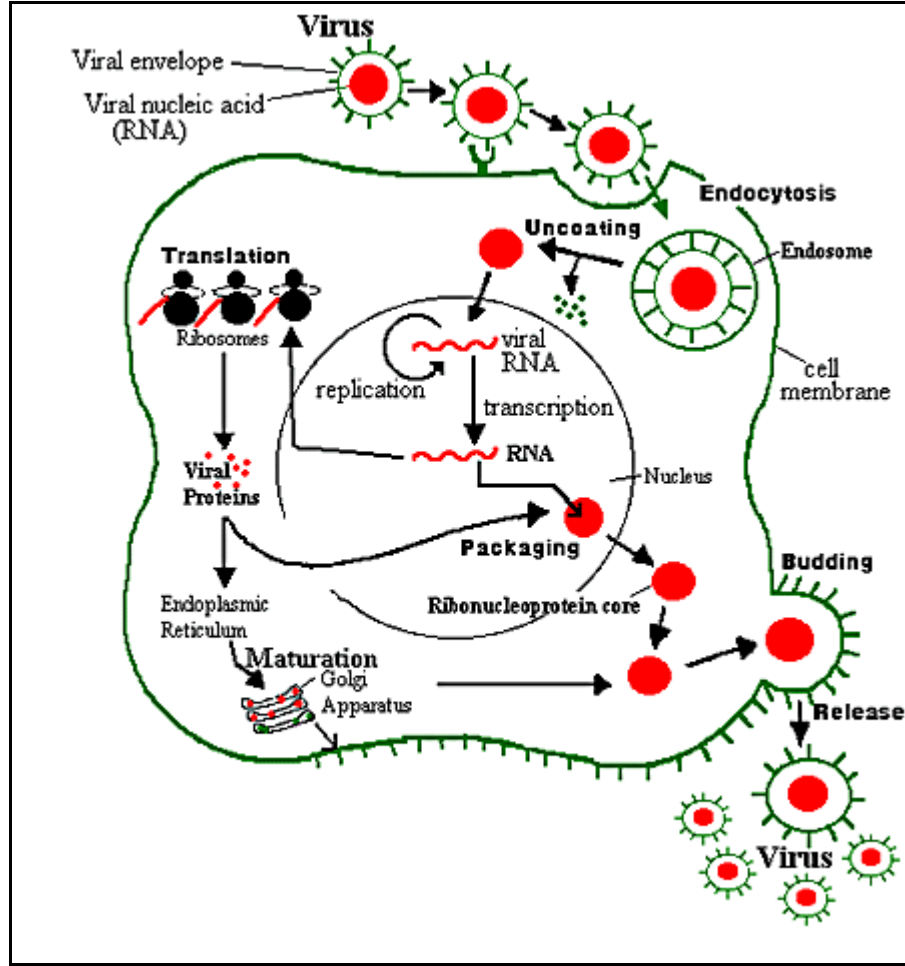
1.5.1.4. Virusların üremesi

İnfluenza viruslarının üremesi detaylı olarak incelenmiştir. Virusun latent periyodunun 3-6 saat olduğu ve virus üremesinin 12-72 saat içinde maksimum düzeye ulaştığı saptanmıştır. Virusun üreme siklusunda çeşitli adımlar vardır:

- 1- Adsorbsiyon
- 2- Penetrasyon
- 3- RNA sentezi
- 4- Protein sentezi
- 5- Lipid sentezi
- 6- Karbonhidrat sentezi
- 7- Birleşme
- 8- Tomurcuklanma
- 9- Serbest bırakılma

İnfluenza virusleri konak hücrenin sialioligosakkarit reseptörlerine FluA ve FluB'de HA yapıları ile bağlanırlar. Endositoz ve füzyonu takiben virus konak hücrenin sitoplazması içine girer, virusün replikasyonu konak hücre nükleusunda, viral proteinlerin sentezi ise sitoplazmada gerçekleşir. Yeni oluşan virus partikülleri viral zarfların konak hücrenin sitoplazma membranından alır (14).

Şekil 1.2: İnfluenza virusün replikasyon siklusu (15)



1.5.1.5. Hastalık ve Klinik Belirtiler

Influenza virus, ani başlangıçla kendini gösteren ve akut bir solunum yolu hastalığı olan gripin etkenidir. Ancak virus belirtisiz infeksiyondan, pnömoniye kadar değişebilen hastalık tabloları oluşturabilir. Duyarlı bir topluluk içerisinde konuşma, öksürme ve aksırma ile çıkarılan damlacıklar yolu ile kişiden kişiye bulaşır. Virus ile enfekte eller ve eşya ile de bulaşabilmektedir. Hastalık hemen her yaş grubunu etkilemektedir. Hastalığın şiddeti antijenite ile ilgilidir. Hastalığın kuluçka devri 18-72 saattir. Bu süre, vücuda giren virus miktarı arttıkça kısalmıştır. Bu süre sonunda hastalık üşüme, 38-40 °C'ye varan ateş, baş ağrısı, halsizlik, genel kas ağrıları, konjonktivada batma ve burun akıntısı ile aniden başlar. Hafif balgamsız bir öksürük vardır. Bazen mide ağrısı, ishal gibi mide-barsak şikayetleri görülebilir. Bu tablo "gastrik influenza" olarak adlandırılır. İnfluenza A, B ve C tipi viruslarının klinik belirtileri benzerse de

influenza A'nın etken olduğu enfeksiyonlarda hastalık daha şiddetli seyrederek, süresi genellikle daha uzundur. Flu B virus enfeksiyonları, Flu A'nın etken olduğu enfeksiyonlara oranla daha hafif seyrederek. İnfluenza komplikasyonları açısından da tehlikeli bir enfeksiyondur. Çoğunlukla influenza A virusünün etken olduğu enfeksiyonlarda krup, aspirin kullanan çocuklarda Reye sendromu, yine çocuklarda İnfluenza B enfeksiyonu sonrası akut miyozit bildirilmektedir. Genç erişkinlerde astım, daha ileri yaşlarda kronik bronşit, amfizem söz konusudur. Yaşlılarda streptokok, hemofilus gibi bakterilerle süper enfeksiyonların oluşabileceği bildirilmektedir. İnfluenza epidemileri sırasında solunum, glomerulonefrit, parotitis gibi komplikasyonlara bağlı olarak ani ölümler de olabilmektedir (15).

1.5.1.6. Patogenez ve İmmünite

Virus hastalığın bulaşmasından 1-2 gün önce ve belirtiler ortaya çıktıktan sonra üç gün kadar burun ve boğazda varlığını sürdürür. Solunum mukozasını kaplayan mukus tabaka NANA ve mukoproteinleri içermektedir. Enfeksiyon mukus tabakaya virusun yapışması ve lokal antikorlardan ve spesifik olmayan inhibitörlerden kurtulması ile başlar. Spesifik reseptör içeren HA mukus tabakaya yapışır ve NA virusun mukozal epitelyuma girişini sağlar (11).

Ölümcül primer influenza pnömonisi çocuklarda nadir gelişir. Fokal ve yaygın myokardit, nekroz bildirilmiştir ve yaygın beyin ödemi ölümcül influenza vakalarında bildirilmiştir. İnfluenzayı güçleştiren sinüzit ve otitis media patolojisinin pnömoneye benzediği bildirilmektedir. Özellikle influenza tip B ile enfekte çocuklarda Reye sendromunun geliştiği görülmüştür (10).

Doğal influenza enfeksiyonundan sonra lokal ve humoral antikorlarla, hemaglutinin, nöraminidaz, nükleokapsit matriks protein antijenleri tanımlanır. Enfeksiyondan sonra serum ve solunum salgılarında HA antikorları görülür ve bu antikorlar uzun yıllar kalıcı olurlar (16). Noraminidaz antikorları, hastalığın şiddetinin ve kişiden kişiye geçiş oranının azalmasında rol oynar. Enfeksiyondan sonra serum ve solunum salgılarında görülür. Enfeksiyondan önce, serumdaki NA antikorları, yüksek titrede ise klinik görünümü enfeksiyonu engelleyebilir (17).

Matriks protein ve nükleokapsit antikorları, korumada etkin değildir. Her ikisi de tip spesifiktir (11).

1.5.1.7. Laboratuvar Tanı

Epidemik vakalarda, hastalığın akut başlaması ve influenzanın semptomları klinik tanı için yeterlidir. Bununla birlikte sporadik vakalarda ise solunum sistemi enfeksiyonları yapan diğer virusların neden olduğu hastalığa benzer bir tablo oluşturduğu için tanı oldukça güçtür. Laboratuvar tanısı hastalığın başlangıcından 1-2 gün önceden 1-2 gün sonraya kadar mümkündür. Bununla birlikte hastalığın başlangıcından 7 gün sonraya kadar da virus üretilir (18).

1.5.1.7.1. Virusun tanı için örneklerin toplanması ve saklanması

Tüm virusların laboratuvar tanısında olduğu gibi en önemli işlem muayene maddesinin seçimi, alınması ve uygun koşullarda laboratuvara ulaştırılmasıdır (19).

Virus izolasyonu için örnekler hastalığın ilk üç günü içinde ve ateşli dönemde alınmalıdır. Memeli İnfluenza A virusları solunum yolu kolumnar epitel hücrelerinde replike olur, primer bulaşma solunum sekresyonları ile olur. Virusun izolasyonu için materyal olarak boğaz, burun yıkama sıvısı ve sürüntüleri kullanılır. Sürüntüler steril eküvyonlar vasıtasıyla alınır. Burun veya boğazda çubuk üzerine sarılmış olan pamuklu kalem ile materyal alınacak bölge kuvvetlice ovularak eküvyon içerisinde taşıma vasatı olan tüpe daldırılır. Burun yıkama sıvısından veya boğaz çalkantı suyundan virus izole etme şansı sürüntüden izole etmekten daha yüksektir. Sürüntü ve çalkantı şeklinde toplanan örnekler buzdolabında (+4°C'de) maksimum 4 güne kadar tutulabilir. Ama izolasyon yapılacak laboratuvara en kısa sürede ulaştırılması tanı açısından en uygun yöntemdir. Örnekler uzun süre saklanacaksa -70 °C'de tutulması uygun olur (19).

Serolojik tanı için birisi hastalığın başlangıcında diğeri ise bundan 15-20 gün sonra olmak üzere iki kan numunesi alınır. Serumlar ayrıldıktan sonra -20 °C'de muhafaza edilir (20).

İnflenzayı diğer solunum yolu enfeksiyonu etkeni olan; PIV, RSV, AdV, Enterovirus, Koronavirüs ve Rinovirüs'tan ayırt edebilmek için kesin tanı koymak gerekir. İnfluenza virusünün tanısında kullanılan çeşitli laboratuvar yöntemleri vardır (21).

1.5.1.7.2. Hızlı Tanı Testleri

Solunum sekresyonlarında virus antijenlerinin gösterilmesi esasına dayanır. En yaygın kullanılanlar floresan antikor veya ELISA yöntemleridir. Bu tekniklerin duyarlılıkları % 50-90, özgüllükleri ise % 90'ın üzerinde bildirilmektedir (21).

1.5.1.7.3. Embriyonlu Yumurtada Virus İzolasyonu

İnfluenza A ve B viruslarının izolasyonu için örnekler 11 günlük embriyonlu yumurtanın ilk üretim için amniyotik sıvısına ekim yapılır. Aynı zamanda daha sonraki üretimleri için allontotik sıvıya ekim uygun olmaktadır. Ekim yapılan yumurtalar üç gün süre ile 38 °C'de inkübe edilip bu süre sonucunda bu sıvılar alınp hemaglutinasyon uygulanarak tanıya gidilir (22).

1.5.1.7.4. Hücre Kültüründe Virus İzolasyonu

Influenza A ve B virusları primer rhesus maymun böbrek (PRf hücreleri) veya Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) hücre kültürlerinde ürer. Influenza virusları hücre kültürlerinde ürer ancak sitopatik etki yapmazlar. Virusun üreyip üremediği Enzyme Immunoassay (EIA), Floresan Antikor Testi (FAT), hemadsorbsiyon gibi yöntemlerle saptanır. Kültürler -70°C'de dondurularak saklanır (23).

1.5.1.7.5. Serolojik Tanı

Enfeksiyonun serolojik tanı akut devrede ve 2-3 hafta sonra alınan kan örnekleri arasında görülen dört kat veya daha fazla antikor artışı saptanması ile yapılır. Bunun için en çok Hemaglutinasyon İnhibisyon testi uygulanır. Ayrıca kompleman birleşmesi (KB), Double İmmüdifüzyon (DID), Single Radial Difüzyon (SRD) testleri de uygulanabilir. Son yıllarda Influenza hemaglutinine oluşan antikorları saptamada EIA tekniği kullanılmaktadır. Bu tekniğin avantajı IgA, IgG ve IgM antikorlarını göstermesi olmuştur (20).

1.5.1.7.6. Moleküler Yöntemler:

Solunum sekresyonlarında virus genetik maddesinin nükleik asit hibridizasyon veya polimeraz zincir reaksiyonu ile gösterilmesi mümkündür. Revers transcriptaz (RT) PCR, influenza virus RNA'sının saptanmasında kullanılan duyarlı ve özgül bir yöntemdir. Virusün tiplendirilmesi ve subtiplendirilmesinde kullanılmaktadır (24).

1.5.1.8. Epidemiyoloji

İnfluenza A ve B virusları bütün dünyada yaygın olarak, yaş farkı ve cinsiyet gözetmeksizin epidemilere neden olmaktadır. Salgınlar lokal, ülke çapında veya daha geniş yayımlı olabilmektedir. Virus kişiden kişiye solunum sekresyonları içerisinde, hava yoluyla geçiş yapmaktadır. Enfektivite periyodu semptom ve belirtilerin görülmesinden 1-2 gün sonrasına kadar sürmektedir. En çok görüldüğü mevsimler sonbahar, kış ve ilkbahar başlangıcıdır. Enfekte kişilerin çoğunluğunu çocuklar ve gençler oluşturmaktadır. Yaşlı kimselerde ise mortalite oranı yüksektir. İnfluenza A epidemileri sırasında okul çağı çocukların % 75'inden fazlası enfekte olabilmektedir. İnfluenza B virusu ise influenza A virusuna göre daha yavaş bir yayılım göstermektedir (25).

İnfluenza A epidemisi 2-3 yılda bir görülebilir ve bazen büyük pandemiye de neden olabilir. İnfluenza B ise daha küçük çapta, 4-6 yılda bir epidemi yapabilir (26).

İnfluenza epidemilerinin virusun antijenik yapısındaki değişikliklere bağlı olarak, toplumda duyarlı kişi sayısının oldukça fazla olmasından kaynaklandığı bilinmektedir. Antijenik değişiklik, virusun iki dış glikoproteini olan HA ve NA'da meydana gelir. HA'daki antijenik değişim, NA'dakinden daha fazla olmaktadır. Bu değişikliklerin büyük miktarlarda veya küçük miktarda olmasına göre antijenik shift ve antijenik drift oluşmaktadır (27).

1.5.1.8.1. Antijenik Shift

Farklı influenza suşları arasında gen parçalarının değişimi ile meydana gelen pandemilere yol açabilen antijenik değişimlerdir. Bu antijenik değişiklik segmentli olan nükleik asidin bir segmentinin tamamen değişmesi sonucu ortaya çıkar. Yeni virusun HA ve/veya NA antijenleri ile eski virusun antijenleri arasında benzerlik ya hiç yoktur veya çok azdır. Yeni ortaya çıkan bu virusa karşı toplumda bağışıklık yoktur. Virus toplumda yayılıp sirküle olduğunda epidemi oluşturabilir. Epidemi sonrasında toplumda bağışıklık artar ve antijenik driftin ortaya çıkmasına zemin hazırlar (28).

1.5.1.8.2. Antijenik Drift

Bir influenza alt tipinde meydana gelen küçük antijenik değişikliklerdir ve 2-3 yılda bir oluşmaktadır. Antijenik driftte nükleik asitte nokta mutasyonlar meydana

gelmekte ve virusta üretilen proteinlerdeki küçük yapı değişikliklerine bağlı olarak antijenik yapıda küçük değişimler meydana gelmektedir. Böylece toplumda yeni virusa karşı antikor taşıyan kişilerin az sayıda olması nedeniyle yeni virus toplumda etkisini kolayca göstermektedir (29). İlk influenza epidemisi M.S. 1173 yılında ilk pandemi ise 1580 yılında tariflenmiştir. En büyük pandemi 1918-1919 influenza mevsiminde görülmüştür ve milyonlarca insanın ölümüne yol açmıştır. Yirminci yüzyılda her biri yüksek morbidite ve mortaliteye neden olan dört pandemi görülmüş ve 1918 pandemisinde dünyada 20 milyondan fazla insanın influenzadan öldüğü bildirilmiştir (30).

1.5.1.8.3. Avian influenza

İnfluenza A virusu başta insan olmak üzere kanatlı (tavuk, hindi, evcil ördek) ve bazı memelilerde (domuz, at, balina, fok balığı, vizon, ren geyiği) infeksiyonlara neden olan etkidir. Deniz kuşları özellikle martılar ve göçmen kuşlar önemli rezervuar konaklardır. Yabani ördeklerde etken bulunmakta, fakat genellikle infeksiyon oluşturmamaktadır. Sessiz infeksiyonun görüldüğü yabani ördekler infeksiyonun evcil kümes hayvanlarına yayılmasında önemli rol oynarlar. Kanatlılar tüm influenza A subtipleri için konaktır ve en sık saptanan subtipler H5N1, H9N2, H7N7 ve H7N2 dir. Kanatlılarda influenza A'nın subtipleri ile görülen hastalığa "Avian influenza veya kuş gribi" adı verilmektedir (31).

İnsanda saptanmış olan Avian influenza virus subtipleri ve yayılışları:

Hong Kong'da, 1997 yılında üç günde 1.5 milyon kanatlı'nın ölümüne neden olan H5N1 (HPAIV) ile bir salgın meydana gelmiş ve bu salgın sırasında 18 olguda ilk kez kanatlıdan insana geçiş olduğu saptanmıştır. Olgulardan 17'sinde canlı kümes hayvanı satılan markette kümes hayvanlarına temas ve 1 olguda ise çiftlikteki hasta kümes hayvanına temas söz konusudur. Bu 18 hastadan 6'sı ölmüştür. Amerika Birleşik Devletleri'nde, 2002 yılında kümes hayvanları üretilen bir bölgede salgın görülmüş ve salgın bölgesinde hasta hayvanlara temas eden bir kişide H7N2 (LPAIV) saptanmıştır. Kasım 2003'de ise, New York'da solunum belirtileri ile hastaneye yatan bir hastada ilk olarak laboratuvar testleri ile H1N1 saptanmış, daha sonra yapılan doğrulama testi ile bunun H7N2 olduğu belirlenmiştir. Bu bulaşmayla ilgili infeksiyon kaynağı belirlenememiştir. H7N3 (HPAIV); Kanada'da, 19 Şubat 2004'de kümes hayvanlarında H3N3 salgını saptanmıştır. Aynı bölgede kümes hayvanları ile temas eden 10 kişide, konjunktivit ve/veya üst solunum yolları

infeksiyonu görülmüş ve hastaların tamamı iyileşmiştir. Asya ülkelerinde ise durum her geçen gün biraz daha ciddi seyretmektedir. DSÖ' ne gelen düzenli verilerde son yıllarda Avian influenza vakaları özellikle Asya kıtasında bu infeksiyonun varlığını göstermektedir (31). Bu ülkelerdeki insanlarda görülen avian influenza olguları ve ölümleri Tablo 1.5' de verilmiştir (32).

Tablo 1.5: 6 Haziran 2006 tarihli DSÖ raporuna göre Avian influenza olguları ve ölümleri (32).

Ülke	Hasta Kişi Sayısı	Ölüm Sayısı
Azerbaycan	8	5
Kamboçya	7	7
Çin	25	16
Djibuti	1	0
Mısır	34	14
Endonezya	99	79
Irak	3	2
Lao	2	2
Nijerya	1	1
Tayland	25	17
Türkiye	12	4
Viet Nam	93	42
Toplam	310	189

1.5.1.9. Tedavi, Korunma ve Kontrol

1.5.1.9.1. Tedavi

Yatak istirahati, bol sıvı alımı ve ateşin kontrol altına alınması tedavi için yeterlidir. Her 3-4 saatte bir salisilik asit ateş için etkili olmaktadır. Tedavide amantadine hidrokloride ve rimantadine hidrokloride'in etkili olduğu ve klinik belirtileri azalttığı bildirilmektedir. Geniş spektrumlu bir antiviral ajan olan Ribavirin influenza A ve influenza B enfeksiyonlarında başarı ile kullanılmaktadır (33).

1.5.1.9.2. Korunma

İnaktif virus aşılarının influenzadan korunmada etkinlikleri kanıtlanmıştır. Canlı attenüe aşılar üzerinde çalışılmaktadır, inaktif tüm virüsü içeren subunit aşılar kullanılmaktadır. Influenza aşısının içeriği her yıl yeniden gözden geçirilmekte ve saptanan influenza suşları esas alınarak ertesi yıl hazırlanacak aşının içeriği

düzenlenmektedir. Son yıllarda uygulanan aşuların içeriğinde iki kısım Flu A (H1N1 ve H3N2) ile bir kısım influenza B suşu bulunmaktadır (33).

1.5.1.9.3. Kontrol

İnfluenza toplumsal bir sağlık problemi oluşturduğundan dolayı kontrol altına alınması açısından önem arz etmektedir. ABD’de influenza’nın kontrol altına alınmasında aşı ile bağışıklamanın yanında koruma ve tedavi amaçlı ilaç kullanımı da gerekli görülmektedir (32-33).

1.5.2. ADENOVİRUSLAR

Adenoviruslar ilk olarak insan adenoid dokularından izole edilen, çeşitli sistemlerde hastalık oluşturan DNA’ya sahip virus grubudur (34). Adenovirus enfeksiyonları bütün mevsimlerde görülür ve okul çağındaki çocuklarda öncelikli olmak üzere bütün yaş gruplarında endemiktir ve bu enfeksiyonların % 50’si asemptomatiktir. Enfekte olan çocukların yaklaşık yarısında virus tonsiller dokuda latent olarak yerleşebilir. Adenoviruslar kış ve bahar aylarında solunum yolu enfeksiyonu salgılarına, yazın yüzme havuzlarından kaynaklanan faringokonjunktival ateş, yılın herhangi bir ayında oftalmolojik işlemler ya da göz travmaları ile ilişkili epidemik keratokonjunktivite yol açarlar (35). Adenoviruslar bebeklerde ve okul öncesi çocuklarda gastroenterite yol açabilmektedirler (36). İnfluenza virusunun 1933 yılında izole edilmesinden sonra yıllarca solunum yolu virusu izole edilememiştir (34). Adenoviruslar ise ilk defa haftalarca besiyerinde muhafaza edilen ve spontan dejenerasyona maruz kalan insan adenoidlerinden 1953 yılında izole edilmiş ve orijin aldığı dokuya hitaben isimlendirilmiştir. Aynı sıralarda akut solunum hastalığı ve primer atipik pnömoni olgularında hücre kültürlerinde adenovirus izole edilmiştir. Günümüzde insanlardan izole edilen 51 serotipi tanımlanmış olup en sık enfeksiyona yol açanları 1’den 8’e kadar ve 11, 21, 35, 37, 40 ve 41 serotiplerdir (37).

1.5.2. 1. Genel özellikleri

İnsan adenovirusları, Adenoviridae ailesinde Mastadenovirus cinsinde yer alan zarfsız, çift zincirli DNA içeren çiplak virüslerdir. Virus 70-90 nm çapında olup moleküler ağırlıkları 5,000 ile 120,000 arasında değişen 10’un üzerinde yapısal protein içerirler. DNA ve ilişkili proteinleri içeren öz yapısı 252 kapsomerden oluşan

ikozahedral bir kapsitle çevrilidir. Herbir virion 240 hekzon ve 12 pentondan oluşur (34).

Virion yalnız DNA ve proteine sahiptir. Farklı virus tiplerinin DNA moleküllerinin ağırlığı ve temel yapısı farklıdır. İnsan adenovirus serotiplerinin C+G oranı onkojenik potansiyeli ile orantılı olarak değişim göstermektedir. Tip 12, 18 ve 31 en yüksek onkojenik potansiyele % 48-49 gibi en düşük C+G oranına sahipken, orta derece onkojenik olan 3 ve 7 gibi tipler % 49-52'lik, zayıf onkojenik olan veya onkojenik olmayan 1, 2, 8 ve 9 gibi tiplerin ise C+G oranı % 57-59 olarak tespit edilmiştir (38). Mastadenovirusların ağırlığının % 87'sini, aviadenovirusların ağırlığının % 83'ünü proteinler oluşturur (34).

1.5.2.2. Antijenik yapılar

Antijenik yapılar kompleks olup hekzon, penton ve fiber antijenleri vardır. Adenovirus replikasyonu sırasında çok miktarda antijenik yapı oluşur ve eriyebilen antijenler olarak kültür ortamına salırlar. Bu proteinler kompleks yapılar olup, çok sayıda antijenik determinant taşırlar. Özellikle hekzon, verteks kapsomeri ve fiberler tip ve alt cinse spesifik antijen içerirler. Hekzon ve fiberler tipe özgü antijenik determinantlar virionun yüzeyinde bulunur ve serumda nötralizan antikorların oluşumuna yol açarlar. Fiber güçlü bir hemaglutininidir ve hemaglutinasyon-inhibisyon antikorlarının oluşumuna yol açar. Cinse özgü antijen hekzonlar üzerindeki ana determinant olup, kapsidin internal kısmında yer alır ve antikor oluşumuna yol açmaz (39).

1.5.2.3. Sınıflandırma

Adenoviridae ailesi Mastadenovirus ve Avianadenovirus olmak üzere iki cinsten oluşmaktadır. İnsan adenovirusları Mastadenovirus cinsi içerisinde yer almaktadır. İnsan adenovirusları çeşitli laboratuvar özelliklerine göre 6 alt gruba (Alt grup A-F) ayrılmıştır. Bu laboratuvar özelliklerinden bir kısmı; bazı hayvan eritrositlerinin (sıçan, maymun, fare, kobay) hemaglutinasyonu, antijenik özellik, onkojenik yetenek, fiber proteinin uzunluğu, grup içi ve gruplar arası DNA homoloji yüzdesi, restriksiyon enzimlerle kesilme sonrası band sayısı ve viral DNA'nın Guanin+Cytosin oranı şeklinde sayılabilir (40).

1.5.2.4. Replikasyon:

Bütün adenovirusların üreme özellikleri birbirine benzer. Duyarlı konak hücreye adsorbsiyon influenzaya göre nispeten yavaştır. Viral partikülün hücre içerisine girişi pinositozis yolu ile olmaktadır. İn vitro çalışmalarda virusun fiber proteininin hedef hücreye bağlanmasındaki yüksek afiniteden sorumlu olduğu gösterilmiştir. Ancak insan hücrelerinde özgül bir reseptör varlığı henüz gösterilememiştir (41).

Viral DNA'nın protein örtüden ayrılması, penetrasyondan hemen sonra sitoplazma içerisinde başlar. İlk olarak pentonlar daha sonra da heksonlar ayrılır. Virusun hekson antijeni vasıtasıyla sitoplazma içinde mikrotübüllere bağlanarak çekirdeğe transportu gerçekleştirilir, DNA hücre çekirdeğine taşınarak erken m-RNA sentezi gerçekleştirilir. Viral DNA'nın replikasyonu enfeksiyondan 6-8 saat sonra başlar ve 18-20 saat sonra maksimum düzeye ulaşır. Geç m-RNA'nın transkripsiyonu, DNA replikasyonunun başlamasından kısa bir süre sonra başlar. Genetik materyal nükleus içerisinde replike olurken virusun yapısal proteinleri sitoplazma içerisinde yapılmaktadır. Sitoplazmada sentez edilen yapısal proteinler hücre çekirdeğine taşınarak tüm virus yapımı gerçekleştirilir. Olgunlaşan viruslar hücreyi lizis yoluyla terk ederler (42). Rölatif olarak adenovirus replikasyonu verimsizdir. Bunun başlıca sebepleri sentezlenen viral DNA'nın ancak %10'unun olgun virionlar içerisine sokulabilmesi, sentezlenen viral ürünlerin çoğunun hücre kültür süresine salınmaması ve hücre içinde kalmasıdır (41).

1.5.2.5. Oluşturduğu Hastalıklar ve Klinik Bulgular

İnsanda birçok klinik sendromla ilişkili olduğu saptanan adenoviruslardan bir tip adenovirus farklı klinik sendromlara sebep olabildiği gibi, birden fazla adenovirus tipi de aynı klinik tabloyu meydana getirebilir (43).

Adenovirus alt grupları ve bunların en sık izole edilen tipleri ile insanda oluşturduğu hastalıklar tablo 1.6' da özetlenmiştir.

Akut ateşli farenjit, bebek ve çocuklarda en sık görülen şeklidir. Hastada ateş, farenjit, konjunktivit, nezle, öksürük görülebilir. Hasta çocuklarda eksudatif tonsillit gözlenebilir. Bazen lokalize semptomlar gelişmeyebilir. Semptomatik olarak hastalık influenza, parainfluenza, RSV, bazı enterovirus ve rinovirus grubunun bazı tiplerinin meydana getirdiği enfeksiyonlardan ayırt edilemeyebilir. Akut solunum yolu hastalığı ise aynı yaştaki çocuklarda daha düşük insidanda görülmesine karşılık genç

yetişkinlerde, özellikle askeri kamplarda ve yatılı okullarda hospitalizasyonu gerektirecek kadar ağır seyreden trakeobronşit ve pnömoni tablosu oluşturan influenza benzeri epidemiler oluşturabilir (44).

Tablo 1.6 : Adenovirus alt grupları ve en sık izole edilen serotiplerin insanda ilişkili olduğu hastalıklar (43).

Klinik Tablo	Alt grup içinde, ön planda sorumlu tutulan serotipler					
	A	B	C	D	E	F
Üst solunum yolu hastalığı		Tümü	Tümü			
Alt solunum yolu hastalığı		33, 21			4	
Boğmaca benzeri sendrom			5			
Akut solunum hastalığı		7,21			4	
Faringokonjunktival ateş		3,7			4	
Epidemik keratokonjunktivit				8,19,37		
Akut hemorajik konjunktivit		11				
Akut hemorajik sistit		7,11,21,35				
İmmün sistemi baskılananlarda enfeksiyon	31	Tümü	Tümü	29,30,37,43,45		41
Gastroenterit	31					40,41
Santral sinir sistemi hastalığı		3,7				
Seksüel temasla geçen hastalık			2	19,37		

Faringokonjunktival ateş, akut ateşli farinjitte benzer. Fakat bu hastalarda karakteristik olarak konjunktivit de bulunmaktadır. Hastalık bütün yaş gruplarında görülmekle birlikte çocuklarda bazen epidemik formda görülebilir. Epidemik formunda en büyük bulaş yolunun yüzme havuzları ve küçük göller olduğu düşünülmektedir (45). Gastroenteritler özellikle pediatrik yaş grubunda görülmekle birlikte rotavirüslerden sonra en önemli diyare nedeni olarak % 2-22 arasında değişmekle birlikte adenovirüsler gösterilmektedir. Gastroenteritin inkübasyon dönemi 8-10 gündür, diare 5-12 gün sürer. Kusma görülür ama ateş ve solunum semptomları görülmez (46).

Göz enfeksiyonları özellikle erişkinlerde görülür. Adenovirüslerin oluşturduğu başlıca göz enfeksiyonu akut folliküler konjunktivittir (45).

Akut hemorajik sistit, adenovirus tip 11 ve 21'in neden olduğu ve özellikle 6-15 yaş arası erkek çocuklarda hematüri ile karakterizedir. Ayrıca böbrek transplantasyonu yapılmış kişilerde de tariflenmiştir (43).

Pertussis benzeri sendrom adenoviruslar tarafından oluşturulan ve boğmacaya benzer bir klinik tablo ile seyreden bir hastalıktır. Özellikle adenovirus tip 5'in etken olduğu bilinmektedir. *Bordetella pertussis* pozitif boğmacalı hastalarda adenovirus enfeksiyonuna daha sık rastlanır. Adenovirus tip 2, 19 ve 37, herpes benzeri genital lezyonlardan izole edilmiştir. Lezyonlar genelde orşit, servisit veya üretritle seyreden ve yaklaşık 4 hafta süren bir hastalık tablosu oluşturmaktadır. Bu devrede seksüel yolla bulaşma söz konusudur (34).

Ayrıca çeşitli nedenlere bağlı olarak immünsüprese hastalarda da adenoviruslar, kabı ve yaygın enfeksiyona sebep olabilirler. Hasta kategorisine göre izole edilen virus tipleri farklılık gösterir (47).

Adenoviruslar hastane kaynaklı enfeksiyon etkeni olarak da son yıllarda göze çarpmaktadır. Bunun sebepleri; gaitada uzun süre salınımı, aerosollerle bulaşması ve bu hastalardan hastane personeline geçmesi olarak bildirilmektedir (48).

Yukarıda belirtilenlerin haricinde ilave olarak daha birçok hastalık adenovirus enfeksiyonu ile ilişkilendirilmiştir. Myokardit, böbrek hastalığı, artrit, tiroidit bu hastalıklardan bir kısmıdır (37).

1.5.2.6. Patogenez ve İmmünite

Virus göz, solunum, intestinal ve genitoüriner organların epitel hücrelerini enfekte etmektedir. Virus genellikle akut enfeksiyonlara sebep olmaktadır. Virus sıklıkla bazı lenfoid organlarda (adenoid doku, tonsiller gibi) seyrek olarak da böbrek ve lenfositlerde latent enfeksiyon yapabilmektedir (37).

Adenoviruslar, konjunktiva ve burun mukozası yoluyla organizmaya giriş yapar. Farinks ve konjunktiva gibi duyarlı dokulara ulaşır ve bu hücrelerde çoğalır. Sindirim kanalında da virusun belirgin bir üremesi vardır. Virus akut solunumsal hastalıkta ve faringokonjunktivit vakalarında dışkı yolu ile atılmaktadır (45, 49).

Enfeksiyonun inkübasyon dönemi 5-7 gündür. Enfeksiyon şiddeti konakçı cevabı, bulaş yolu, virusun primer lokalizasyon yeri, adenovirus tipi ve alınan doza bağlı olarak değişmektedir (34).

Bronşit, bronşiyolit ve pnömoni gibi alt solunum yolu enfeksiyonları, sıklıkla adenovirus enfeksiyonlarında komplikasyon olarak görülür. Ölümcül olabilen ağır pnömoni bebek ve çocuklarda, nadiren erişkinlerde görülür ve tip 3, 4, 7 ve 21 tarafından oluşturulur (49). Böbrek ve karaciğer tutulumu gibi ekstrapulmoner tutulum, özellikle bebeklerde ve bağışıklık yetersizliği olanlarda görülür. Bu tür hastalarda yaygın hastalık genellikle fatal seyirlidir (47).

Bağışıklık genelde tipe özgül antikorların oluşumu ile ilgilidir. Adenovirusların meydana getirdiği lokal enfeksiyonlarda mukozada oluşan Ig A antikorları korumada belirli bir süre etkinliğini koruyabilir. Salgısal antikorlar genellikle solunum yolu enfeksiyonlarında koruyucu rol oynamaktadır. Ig A antikor cevabı zayıf olan kişilerde klinik daha ağır seyreder. Ancak adenovirus enfeksiyonu sırasında oluşan Ig G antikorları uzun süre serotipe karşı koruma sağlar. AIDS hastalarında adenovirus enfeksiyonlarının ağır seyretmesi hücrel immünitenin de önemli olduğunu ortaya koymaktadır. İnsan adenovirusları onkojenik potansiyele sahip olmaları nedeniyle tümör genetiği çalışmalarında ilgi çekmiştir (43).

1.5.2.7. Laboratuvar Tanı:

1.5.2.7.1. Örneğin Alınması ve Muhafazası

Adenoviruslar çevre koşullarına dirençli viruslardır. Enfeksiyon bölgesinden kolaylıkla izole edilirler. Nazofarengeal aspirat ya da eküvyonla alınan örnek kullanılır. Bunun dışında göz sekresyonları, idrar, gaita, kan ve biyopsi örnekleri de tanıda kullanılabilir. Örneğin erken dönemde alınması ve transportun uygun şekilde yapılması gerekir. Serolojik tanı için birisi hastalığın hemen başında, diğeri bundan 2-4 hafta sonra olmak üzere iki kan örneği alınır, serumu ayrılarak hemen çalışılmayacaksa, -20°C'de muhafaza edilir (21).

Adenovirus enfeksiyonlarının laboratuvar tanısı direk muayene ile, serolojik yöntemlerle, virusun doku kültürlerinde üretilmesi ile ve nadir olarak da moleküler biyolojik tekniklerle yapılabilir (50).

1.5.2.7.2. Klinik örnekten direk tanı

Materyallerde bulunan adenoviruslar veya adenovirus antijenleri elektron mikroskopisi, floresan mikroskopisi, enzim immunoassay (EIA) veya radyoimmunoassay yöntemleri ile klinik örnekte saptanabilir. IFAT yöntemi hücre kültürlerine örneğin ekimi ve kısa süreli inkübasyon sonrası (24-72 saat) erken

antijenlerin saptandığı “Shell vial” tekniği başarı ile uygulanmaktadır. İzole edilen virusün identifikasyonunda, IFAT, EIA ve lateks aglutinasyonu ile adenovirus tan› konabilir. Lateks aglutinasyon testleri özellikle enterik adenovirus enfeksiyonlar›n›n tan›s›nda kullan›lmaktadır (51).

Gaitadan enterik adenovirus saptanmas›nda kullan›lan DNA hibridizasyon yöntemleri ile başarılı sonuçlar alınmış ve bu ayırımı sağlayabilen problemler ile yapılan çalışmalarda % 90'ın üzerinde duyarlılık ve özgüllük elde edilmiştir. Hibridizasyon yöntemleri ile 5-10 Adv DNA kopyas›n›n saptanabileceği gösterilmiştir. Son yıllarda, giderek daha geniş kullanım alan› bulan PCR'n, Adv laboratuvar tan›s›nda kullan›m›n› içeren yöntemler ve vaka raporları artış göstermektedir. PCR yöntemi kullan›larak, duyarlılık bir viral DNA kopyas›na kadar indirilebilmektedir. Duyarlılığın art›r›lmas›n›n yanı sıra bu yöntemle tip tayini de yapılabilmektedir. PCR ile in-situ hibridizasyonla tan› konan olgular›n 2 kat›ndan daha fazlas›nda Adenovirus saptanabildiği görülmüştür. Ayrıca optimal bir izolasyon sistemi olmamas› ve PCR'n izolasyona ihtiyaç göstermemesi daha önce farkedilmemiş adenovirusların saptanmasına da olanak sağlar (52).

1.5.2.7.3. Adenovirus İzolasyonu

Tan›da alt›n standart olarak etkenin izolasyonu kabul edilmektedir. Tip 40 ve 41 dışındaki adenoviruslar, HeLa, KB, A549 ya da Hep-2 gibi devaml› insan hücre dizilerinde, insan embriyonik akciğer fibroblastlarında (HELFI, W138, MRC-5) ve diğer embriyonik fibroblastik hücrelerde ürer; tipik sitopatik etki oluştururlar. Adenovirus enfeksiyonlar›nda klinik örneklerin erken dönemde alınmas› izolasyon şansını artırır. Adenovirus tipi, virus konsantrasyonu ve konak hücre hassasiyeti CPE çıkış hızını etkiler. Klinik örneklerden adenoviruslar›n üretilmesi 2-4 hafta alabilir. İnsan orijinli olmayan hücrelerde, virus titresi değişkenlik göstermektedir. Bunun nedeni de Adenovirus tip 40 ve 41 'in baz› erken proteinlerini bu hücrelerde sentez edememelerine bağlıdır. Bu sebeple Adenovirus tip 40 ve 41'in üretilmesi için, Adenovirus tip 5 genomunun E1A ve E1B bölgelerinin transformasyonu ile elde edilen ve Graham 293 hücre susu diye adlandır›lan insan embriyonik böbrek hücreleri kullan›lmaktadır. Adenoviruslarla infekte hücrelerde virusün çoğalmasına bağlı olarak hücre yuvarlaklaşması, genişlemesi ve üzüm salkımı şeklinde biraraya toplanma, yani agregasyon tipi CPE karakteristiktir. Maymun, insan ve s›çan eritrositleri

kullanılarak, aglutinasyon ile subgrup tan›s› yap›l›r. Hemaglutinasyon inhibisyon testi, nötralizasyon testi, EIA ve PCR ile tip tan›s› yap›labilir (53).

1.5.2.7.4. Serolojik yöntemler

Adenovirus enfeksiyonlar›n›n serolojik tan›s›nda en uygun test kompleman birleşmesi deneyidir. Daha duyarlı tan›, akut ve konvelesan serumlar›na uygulanan nötralizasyon testiyle konulur. İki serum arasında dört kat veya daha fazla titre artışının tespiti tanıda önemlidir. Hemaglutinasyon inhibisyon testi de pratik olarak nötralizasyon testi kadar duyarlıdır. EIA testleri de kompleman birleşmesi deneyinden hem daha duyarlı hem daha spesifiktir. Kompleman birleşmesi testi gruba özgül, nötralizasyon ve hemaglutinasyon inhibisyon testleri ise türe özgüldür (53).

1.5.2.7.5. Moleküler yöntemler

Özellikle kültürü yap›lamayan tip 40 ve 41'in tan›s›nda kullan›l›r (54).

1.5.2.8. Epidemiyoloji:

Adenoviruslar dünyan›n her yerinde yaygın olarak bulunmaktadır. Adenovirusların sebep olduğu solunum yolu hastalıkları kişiden kişiye solunum sekresyonlar› ile yayılır ve insan mastadenovirusların tek konağıdır. Sivillerin solunum yolu hastalıklar›n›n % 5-10'undan, askeri birliklerdeki veya yat›lı okullardaki solunum yolu hastalıklar›n›n % 50'sinden adenoviruslar sorumludur. Hastalık bütün yıl içerisinde endemik halde görülmektedir (55). Fakat okul çağı çocuklarındaki faringokonjunktival ateş salgınlarının çoğu hastalığın yüzme havuzlarından alınmas› sebebi ile yaz mevsiminde meydana gelirken (56), askeri birliklerde ve yat›lı okullarda görülen adenovirus pnömonileri kış mevsiminde ortaya çıkmaktadır. Bunların dışındaki adenovirusların yaptığı solunum yolu hastalıkları da kış ve ilkbahar mevsimlerinde görülmektedir (55).

Adenoviruslar tarafından oluşturulan enfeksiyonlar, epidemiler dışında sadece klinik kriterler ile belirlenemediğinden, genel epidemiyolojik çalışmalarda virusün saptanmas› veya serolojik kanıtlara ihtiyaç vardır. Adenovirus enfeksiyonlar›n›n bildirilmesi zorunlu olmadığından, henüz ulusal veya diğer genel popülasyon mortalite ve morbiditesini içeren bilgiler mevcut değildir. Epidemiyolojik verilerin büyük çoğunluğu, seçilmiş hasta popülasyonlarından elde edilmiştir. Adenoviruslar›n baz› tiplerinin epidemiyolojik özelliklerinde farklılıklar gözlenmiştir. Adenovirus tip

1, 2 ve 5 sıklıkla endemik olarak saptanmakta iken AdV tip 3, 7 ve 8 epidemiler şeklinde seyredebilir. İlk infeksiyon çocukluk çağında meydana gelir ve yaklaşık 10 yaş civarında toplumun büyük bir kesiminde, bir veya birden fazla AdV tipine karşı antikor cevabı oluşur. Kontrol grubu olarak asemptomatik çocuklar alındığında sıklıkla AdV izole edildiği gözlenmiş ve hasta kişiden AdV izolasyonunun her zaman hastalıkla ilişkili olamayacağı fark edilmiştir. Adenovirüslerle infekte çocukların yaklaşık yarısında virus tonsiller veya adenoid dokuda latent kalabilmektedir. Diğer önemli bir epidemiyolojik özellik de klinik bir tablo oluşturmadan virüsün infeksiyondan aylar sonra da gaitadan salınımıdır. Bu özellik virüsün pediatrik yaş grubunda bu kadar endemik olmasından sorumlu olabilir (57).

Geniş epidemiyolojik çalışmalarda asemptomatik çocuklarda en sık izole edilen viral etken olarak adenovirüsler saptanmıştır. Çocuklarda AdV infeksiyonlarının % 50'si semptomatik hastalık oluşturmaktadır. Bebeklerdeki infeksiyonların % 5'i, 2-4 yaş arasındakilerin ise % 3'ü adenovirüslere bağlıdır (57).

1.5.2.9. Tedavi, Korunma ve Kontrol

Korunma ve kontrolde hasta kişinin izolasyonunun, çok sayıda sağlam taşıyıcı bulunmasından dolayı adenovirüslerin yayılmasında engelleyici bir rolü yoktur. Adenovirüs infeksiyonlarında kontrol veya korunma amaç ile uygulanan çeşitli yöntemlerin arasında konakçının immünizasyonu en etkin yol olarak görülmektedir (58).

Ribavirinin başarılı olduğunu bildiren vaka raporları mevcuttur (59). Adenoviral aşı çalışmaları, ekonomik zararları ve iş gücü kaybı nedeniyle en çok askeri topluluklarda yapılmıştır. Bu aşılarda AdV 3, 4 ve 7'ye karşı etkili bulunmuştur. En kapsamlı çalışmalar oral verilebilen canlı atenue aşılarda olmuştur. Buradaki amaç virüsün solunum yoluna girmeden replike olabildiği gastrointestinal sisteme ulaşmasıdır. Ancak bu canlı aşılarda adenoviral hastalıkların yayılmasına yol açma riski mevcuttur. Yeni rekombinant antijen virus aşılarda ise denetlenmektedir (60).

Günümüzde bu virüslerle ilgili olarak çok sayıda, aydınlatılması gereken ve çözümlenmemiş noktalar mevcuttur. Adenovirüs infeksiyonlarının patogeneğinde hümmoral veya hücresele immünitenin nasıl rol aldığı henüz tam olarak bilinmemektedir. Latent AdV infeksiyonunun hayatın daha sonraki devrelerinde reaktivasyon ihtimali tartışmaya açıktır ve oluşabilecek onkojenik potansiyel

tamamen gözard› edilemez. Genital sistemde infeksiyon oluşturan tiplerin yeni doğana geçişi bilinmemektedir. Adenovirusların kendi aralarında ve diğer viruslarla bu kadar sık rekombinasyona girmesi ve doğabilecek sonuçların ayd›nlat›lmas› gerekmektedir (58).

1.5.3. PARAINFLUENZA VİRUSLAR

Parainflenzavirusları paramyxoviruslara bağlı, etere duyarlı RNA'ya sahip, 150-200 nm büyüklüğünde solunum yolunun önemli bir patojenidir (61).

İlk olarak 1955 yılında kruplu (laringotrakeobronşit) yenidoğanlardan izole edilmiştir. Çocuklarda respiratuvar patojen viruslar arasında, RSV'tan sonra en sık hospitalizasyona sebep olan viruslard›r (61).

Bu virusa 'krup'la ilgili virus' denmiş ve hücre kültürlerinde tipik sinsityal sitopatik etki oluşturduğu gözlenmiştir. Daha sonraları solunum yolu hastalığı olan çocuklardan farklı antijenik yapıda 3 virus daha izole edilmiştir. Bu virusların enfekte ettikleri hücrelerin kobay eritrositlerini absorbe etme özellikleri olduğu gösterilmiş ve '*hemadsorbsiyon viruslar›*' adı da verilmiştir. Daha sonraki yıllarda bu viruslar tek grup altında toplanmış ve bir zamanlar beraber gruplandırıldıkları influenza viruslarına olan benzerliklerinden dolayı parainfluenza virusu (PIV) adı verilmiş ve PIV1, PIV2, PIV3, PIV4 olmak üzere 4 tipe ayrılmıştır. PIV4 ise PIV4A ve PIV4B olarak 2 alt tipe ayrılmıştır (62).

1.5.3.1. Genel Özellikleri

Parainfluenza viruslar› zarfl› ve pleomorfik viruslard›r. Çaplar› 120-300 nm aras›ndadır. Nükleokapsidi tek sarmall›, segmentsiz ve negatif polariteli RNA'ya sahiptir. Nükleoprotein helikal simetridedir. Ayrıca virusun iç kısm›nda RNA'ya bağıml› bir RNA polimeraz bulunur. Dış zarf protein ve lipidlerden meydana gelmiştir. Lipidler virusun ürediği hücreye bağlı olarak değişim göstermektedir (62).

Parainfluenza genomu sekiz veya dokuz protein kodlar. Bu proteinlerin alt› tanesi yapısaldır. Viral zarfta virusa özgü 2 glikoprotein bulunmaktadır ve bunlar 10 nm uzunluğunda iki çıkıntı yapmıştır. Bu çıkıntı proteinlerden birisi hem hemagglütininin hem de nöraminidaz aktivitelere sahiptir. Bu protein HN proteini olarak isimlendirilir. HN glikoproteini virusün konak hücre yüzeyinde sialik asit içeren reseptörlere bağlanmasını sağlar. Diğer glikoprotein yapı ise virusun hemolitik özellikleri ve konak hücre ile birleşmesinde rol oynayan Füzyon (F) proteindir. F glikoproteini virusün hücre içine penetrasyonu, hemoliz ve konak hücreler arasındaki

hücre füzyonu (sinsitya oluşumu) ile ilişkilidir. Diğer yapısal proteinler NP (nükleoprotein), P (polimeraz fosfoprotein), L (büyük protein), M (matrix), proteinleridir. NP nükleokapsitte görev alır ve RNA'ya sıkıca bağlanmış olarak bulunur. M protein viral zarfın hemen alt kısmında yer alır ve viral zarftaki glikoprotein yapılar ile nükleokapsit arasındaki bağlantıda rol oynar. M protein ayrıca HN ve F proteinlerinin konak hücre sitoplazma membranında oluşmasını ve virusün tomurcuklanarak konak hücreden ayrılma aşamalarının başlamasını sağlar (63)(Tablo 1.7).

Tablo 1.7: Parainfluenza viruslarının yapısal proteinleri (63)

Protein	Lokalizasyon	Fonksiyonu
HN	Zarf	Bağlanma Hemaglutinasyon Nörominidaz aktivitesi
F(F1,F2)	Zarf	Füzyon Hemoliz Penetrasyon
NP	Nükleokapsid	Yapısal komponent RNA ile kompleks oluşturma
P	Nükleokapsid	Polimeraz kompleks komponenti
L	Nükleokapsid	Polimeraz kompleks komponenti
M	Zarfın iç tarafında	Biraraya toplanma

1.5.3.2. Antijen Yapı

İnsan parainfluenza viruslarının nötralizasyon, hemaglutinasyon inhibisyon ve kompleman birleşme testi ile ayrılan 4 serotipi vardır. Tip 1, 2 ve 3 antijenik olarak homojen ve stabildir. Tip 4'ün ise 4A ve 4B diye iki subtipi bulunmaktadır. Bu subtipler nötralizasyon ve hemaglutinasyon inhibisyon testi ile ayrılır. Parainfluenza virusları üç ayrı antijene sahiptir. Bunlar; HN proteini, F ve NP antijenleridir. İlk ikisi yüzey çukurlukları olup zarfta bulunurlar. NP ise nükleokapsitle ilişkilidir (64).

1.5.3.3. Sınıflandırma

Paramyxoviridae ailesi *Paramyxovirinae* ve *Pneumovirinae* alt ailelerine ayrılır. *Paramyxovirinae* alt ailesinde Respirovirus, Rubulavirus ve Morbillivirus olarak adlandırılan üç cins, *Pneumovirinae* alt ailesinde ise Pneumovirus ve

Metapneumovirus cinsleri yer alır. Parainfluenza viruslarından PIV-1, PIV-3 Respirovirus; PIV-2, PIV-4A, PIV-4B Rubulavirus cinsinde yer alır (57).

1.5.3.4. Replikasyon

Virus konak hücre yüzeyindeki sialik asit içeren reseptörlere HN glikoproteinleri ile bağlanır. F glikoproteinleri yardımı ile penetre olur ve hücre füzyonu gerçekleşir. Viral zarf konak hücrenin dışında kalır, nükleokapsit hücre sitoplazması içine geçer. Nükleokapsitin açılmasıyla serbest kalan viral RNA sitoplazmada replike olmaya başlar. Genetik maddenin replikasyonu iki aşamada gerçekleşir. Önce (-) RNA'dan komplementer (+) RNA kopyalanır. Komplementer RNA genomik RNA sentezinde kalıp ödevi görür, yeni virus RNA'lar sentezlenir (65).

Virusün sentezlenmesinde ilk aşama olan virusün konak hücreye bağlanıp, girmesinde HN ve F glikoproteinleri rol oynar. Negatif viral RNA'nın mRNA'ya transkripsiyonunda görevli RNA'ya bağımlı RNA polimerazın aktivitesinde P protein L protein ve NP proteinin de rolü vardır. mRNA'lar konak hücre ribozomlarına (poliribozom) giderek viral proteinlerin sentezlenmesini sağlarlar. Konak hücrenin sitoplazmasında da virus nükleik asitleri (RNA) replike olarak (+) RNA'dan (-) RNA'lar oluşturur. Bu işlemler olurken virus zarfında yer alan glikoprotein yapılar da konak hücrenin sitoplazma membranında yerlerini alır. Yeni oluşan (-) RNA dizilen ribozomlarda sentezlenen proteinler ile çevrilerek konak hücrenin sitoplazma membranından zarfın alıp tomurcuklanarak konak hücreden ayrılırlar (65).

1.5.3.5. Yaptığı Hastalıklar ve Klinik Bulgular

Gönüllüler üzerinde yapılan çalışmalarda kuluçka süresi 3-6 gün olarak tespit edilmiş olup, salgınlarda bu sürenin 1-4 güne kadar indiği tespit edilmiştir.

Parainfluenzaların sebep olduğu enfeksiyonlar küçük çocuklarda daha ağır seyreder ve ateşli solunum yolu hastalığı, farinjit, bronşit, bronşiolit, laringotrakeobronşit (krup), pnömoni ve bronkopnömonidir. En sık görülen semptomlar başlangıçta ateş ve öksürüktür. Kaba solunum sesleri, farinks mukozasının eritemi ve rinit karakteristik klinik tablolardır (5).

PIV tip 1, laringotrakeobronşit ile ilgili predominant ajandır. Çocuklar 6 ay ile 3 yaş arasında bu enfeksiyona yakalanabilirler. PIV tip 2, akut laringotrakeobronşit ile ilgilidir. Çocuklar 6 ay-3 yaş arasında enfeksiyon açısından riskli gruptur (66).

PIV tip 3, 1 yaşın altındaki bebeklerde bronşiolit ve pnömoni, 1-3 yaş arası çocuklarda laringotrakeobronşite, daha büyük çocuklarda trakeobronşite neden olabilmektedir. PIV tip 4 ise, hafif solunum yolu enfeksiyonlarına neden olabilir. Bu enfeksiyonlarda en büyük komplikasyon nadiren görülen ve fatal olan larinks tıkanmasıdır. Solunum yolu dışında da PIV enfeksiyonları saptanmıştır. Nadir de olsa parotit, menenjit görülmüştür (67).

1.5.3.6. Patogenez ve İmmünite

PIV enfeksiyonlarında virus enfekte damlacık yoluyla veya direk temas ile bulaşır ve üst solunum yolundan vücuda giriş yaparak solunum yolu epiteline yerleşir. Burun ve boğaz muköz membranları parainfluenza virus enfeksiyonunun ilk yerleştiği bölgelerdir ve bu bölgede ürer. Küçük çocuklarda larinks, trakea, bronş, bronşiol ve akciğerlere de yayılabilir. Böylece daha ağır seyreden enfeksiyonlar meydana getirebilir. Hastalığın normal seyrinde ilk belirtiler 2-4 günlük bir inkübasyon süresinden sonra ortaya çıkar ve iyileşme yavaş olur (68).

PIV 1 ve PIV 2 ile larinks ve üst solunum yolu enfeksiyonu görülür. Larinkste bir krup sendromuna neden olabilir. PIV 3'de ise alt solunum yolu enfeksiyonu, bronkopnömoni, bronşiolit daha çok olur ve otitis media PIV 3'de daha çok görülür. Primer olarak PIV tip 1, 2 ve 3 ile meydana gelen ağır solunum yolu enfeksiyonları 3 ve 5 yaşları arasında meydana gelir (68). HN ve F proteinlerine karşı nötralizan antikorlar ve sitotoksik T hücreleri oluşur, NP ve M proteinlerinin de sitotoksik T hücreleri yanıtı oluşturdukları gösterilmiştir (69).

PIV 1 veya PIV 2 ile enfekte yeni doğanlarda nazofarengeal spesifik sekretuar IgA saptanmıştır. Diğer taraftan IgA içeren sekresyonlarda nötralizan aktivite IgA seviyesi ile direkt orantılı bulunmamıştır. Bu durum bütün nötralizan aktiviteli sekresyonların IgA içermemesi yüzündendir (70).

PIV ile reinfeksiyonlar sıkça görülmektedir. Reinfeksiyonda çocuklar, primer infeksiyonda görülenden daha kuvvetli immun yanıt geliştirmektedirler (71).

1.5.3.7. Laboratuvar Tanı

1.5.3.7.1. Örnek alınması ve muhafazası

Parainfluenza virusları solunum yolu sekresyonlarında bol miktarda bulunduğu için hastalığın başlangıcında alınan bu sekresyonlar tanı materyali olarak kullanılabilir. Sekresyonlar ya bir kateter vasıtasıyla veya yumuşak bir lastik parça içerisine çekmek suretiyle alınır. Nazofarengeal sürüntü veya boğaz sürüntüleri de

materyal olarak kullanılabilirler. Alınan örnekler en kısa sürede ve optimal şartlarda (+4°C'de) laboratuvara ulaştırılmalıdır (72).

Serolojik tan› için ise akut ve konvelesan kan örneklerinden alınan serumlar kullan›lır. Serumlar çalışılana kadar -20°C'de muhafaza edilir (67).

1.5.3.7.2. Klinik örnekten direk tan›

Sekresyonların direk muayenesi büyük önem taşımaktadır. Çabuk sonuç alındığından elde edilen bilgiler klinik olarak daha faydalıdır. Direk muayenede IF, elektron mikroskopisi, ELISA ve immünperoksidaz deneylerinden faydalan›lır.

IF solunum sekresyonların›n tetkikinde en fazla kullanılan metottur (73).

1.5.3.7.3. Virus İzolasyonu

PIV'lar belli hücre kültürlerinde ürerler ve sinsityal sitopatik etki oluştururlar ve bu şekilde hücre kültürlerinde saptan›rlar. Bir zamanlar primer rhesus maymun böbrek (MK) hücre kültürleri tek seçenek iken, şimdi sekonder maymun hücre kültürleri (LLC-MK2) çok fazla kullan›lmaktadır. Ayrıca mukoepidermoid insan akciğer karsinom hücreleri (NCI-H292) de kullan›lmaktadır. Hücre kültürlerinde virusların varlığı, kobay eritrositleri kullanılarak yapılan hemadsorbsiyon deneyleri ile veya özgül immünolojik reagenler ile saptan›r. Örnek hücre kültürüne ekildikten iki gün sonra monoklonal antikorlar kullan›larak ve immunoperoksidaz boyamas› ile daha çabuk identifikasyon sağlanabilir. Daha hızlı tanıya gerek var ise o zaman viral antijenlerin immünolojik metodlarla saptanmas› önerilir. PIV1, PIV2 ve PIV3 için Radioimmunoassay (RIA), enzimimmunoassay (EIA) ve immunofloresan testi geliştirilmiştir (74).

1.5.3.7.4. Moleküler Yöntemlerle Tan›

Tan›da PCR'da kullan›lmaktadır. Bu teknikte viral RNA'ya komplementer DNA, reverse transkriptaz ve bir oligonükleotid primer kullan›larak üretilmektedir. Sonra bu ürün (DNA) çoğalt›lmakta ve agaroz jel elektroforez veya nükleik asid hibridizasyon veya direkt sekanslama yöntemleri ile bu ürün saptanmakta ve izole edilen suşların kesin tan›s› ile epidemiyolojik çalışmalara yön verilmektedir (75).

1.5.3.7.5. Serolojik Tan›

Akut ve konvelesan serum titrelerindeki 4 kat artış anlamlı olarak kabul edilir. Serolojik olarak HI testi, nötralizasyon testi, EIA testi ve kompleman fiksasyon testi kullan›lır. EIA yönteminde ya infeksiyonun akut fazındaki serum örneğinde özgül IgM

veya konvalesen dönemdeki IgG sınıflarının (IgG1, G2 ,G3 ,G4) seviyesinde akut faz dönemindeki IgG sınıflarının seviyelerine göre artışı gösterilerek tanı konulur. En duyarlı yöntem EIA'dır (76).

1.5.3.8. Epidemiyoloji

Parainflenzanın dört tipi de geniş bir coğrafik dağılıma sahiptir. PIV tip 1 ve PIV tip 2'nin sonbahar-kış aylarında, PIV tip 3'ün ise ilkbahar aylarında salgınlara neden olduğu bilinmektedir. RSV'den sonra çocuklarda en sık alt solunum yolu enfeksiyonuna neden olan virustür. Tip 3 prevalandır ve çocukların hemen hemen yarısı ilk sene içinde enfeksiyon geçirmektedir (77).

ABD'indeki bir çalışmada ilk 2 yaşta PIV3 enfeksiyonunun fazla olduğu, hastalanma riskinin % 30 civarında olduğu belirtilmiştir. 2 yaştan sonra bu oranın düştüğü belirtilmiştir. PIV1 ve PIV2 enfeksiyonlarının 2 yıllık sikluslarla oluştuğu bildirilmiştir (77).

Dünyadaki krup vakalarının 1/3'ünün parainfluenza virusları (Özellikle PIV tip 1) tarafından oluşturulduğu bilinmektedir (78).

İmmün yetmezliği olanlarda persistan ve ciddi PIV enfeksiyonları gelişebilir. Kemik iliği transplantasyonu olanlarda da ciddi PIV enfeksiyonları bildirilmiştir (79).

1.5.3.9. Tedavi, Korunma ve Kontrol

Solunum yolu enfeksiyonlarının tedavisinde destekleyici tedavi uygulanır. Halen semptomatik tedavi uygulanmaktadır. Bakterilerle oluşan sekonder enfeksiyonlarda uygun antibiyotikler kullanılabilir. Aşı çalışmalarında, formalinle inaktive parainfluenza aşısı ile serum antikor seviyelerinde yükselme saptanmış, ancak aşının koruyuculuğu yeterli bulunmamıştır. Korunmada aktif bağışıklık için aşı geliştirilmesi çalışmaları devam etmektedir (67).

1.5.4. RİNOVİRUSLAR

Rinoviruslar genellikle burunda lokalize olduklarından bu ismi almışlardır. *Picornaviridae* ailesinde yer alırlar. Soğuk algınlığı ve üst solunum yolu enfeksiyonlarının önemli etkenlerinden biridir. Bugün 100'ün üzerinde serotipi olup burun ve boğazdan izole edilmişlerdir.

İlk defa Kruse 1914 yılında nezleli bir hastanın burun akıntısının bakterisiz filtratının sağlam kişilerin burunlarına damlatılması sonucu bu kişilerin enfeksiyon

geçirdiğini göstermiştir. 1954 yılında Mogabatr tarafından maymun böbrek hücrelerinden Rinovirus tip 1A izole edilmiştir. Son yıllarda tüm yaşlardaki immüno-kompromize hastalarda alt solunum yolu hastalıkları ile ilişkilendirilmektedir. Kronik akciğer hastalığı ve astım, ayrıca sinüzit ve otitis mediada etken olduğu bildirilmektedir (80).

1.5.4.1. Genel Özellikleri

Virus partikülü RNA ve bunu çevreleyen protein bir kapsidden ibarettir. Virus ikozahedral simetriye sahip olup 22-30 nm. çapındadır. Kapsid 60 kapsomerden oluşmuştur. Nükleokapsitte VP1, VP2, VP3 ve VP4 olarak gösterilen dört protein içerirler. VP1, VP2 ve VP3 genetik maddeyi örten protein tabakada, VP4 ise içte yer alır. Nükleik asit tek zincirli pozitif polariteli, 7200 nükleotid uzunluğunda RNA'dır (81).

Rinoviruslar diğer pikornaviruslardan birçok yönden ayrılırlar. Bu viruslar düşük pH'da inaktive olurlar, fakat 50°C'de enfektivitelerini korurlar. Rinovirusların % 80-90'ı ortak bir reseptör kullanmaktadır. İntrasellüler adesiyon molekül 1 (ICAM-I) en önemli reseptörleridir. ICAM-I çok farklı hücrelerin yüzeyinde bulunmaktadır. Virus diğer RNA viruslarında olduğu gibi konak hücrenin sitoplazmasında çoğalır (82).

1.5.4.2. Antijen Yapısı

Rinovirus infektivitesi, çeşitli spesifik antiserumlarla nötralize edilebilir. Tip 2 ve 14'e karşı monoklonal antikolarla yapılan çalışmalarda, Rinovirusun iki ikozahedral asimetrik ünitesinin birbirine bitişik iki yarısında 3, 4 veya 5 immünojenik bağlanma yeri gösterilmiştir. Yeni serotiplerin tanımlanması nötralizasyon reaksiyonuna dayanır. (83).

1.5.4.3. Yaptığı Hastalıklar ve Klinik Bulgular

Hastalığın kuluçka süresi 1-5 gün olup ortalama 2 gündür. Enfeksiyon kendisini üst solunum yollarında dolgunluk ve irritasyon, baş ağrısı, öksürük, boğaz ağrısı, burun akıntısı şeklinde gösterir. Çok az bir ateş artışı olur veya ateş görülmez. Hastalığın oluşumunda hiçbir serotip predominant değildir. Spesifik serotiplerle salgınlar nadirdir. Rinoviruslar yılın birçok ayında hastalık oluştururlar ve sonbaharda en üst düzeye ulaşırlar. Alt solunum yolu enfeksiyonları da görülebilir.

Hastalık 2-3 gün sürer, semptomlar hızla düzelir. Sigara içenlerde öksürük sıklığının arttığı ve hastalık süresinin uzadığı bilinmektedir (80).

1.5.4.4. Patogenez ve İmmünite

Rinoviruslar organizmaya üst solunum yolları aracılığı ile ve kontamine ellerle direk temasla girerler. Burun mukozası ve farinkste ürer ve orada yerleşirler. Virus sadece burun sekresyonlarında mevcut olup diğer vücut sekresyonlarında görülmez. Yaptıkları histopatolojik değişiklikler mukozaya mahsus olup başlıca bulgular mukozaya kan hücumu, ödem, hafif hücre infiltrasyonu ve epitel dökülmesidir. Edinilmiş bağışıklık tipe özgüdür. Bağışıklık serumdaki Ig M'den daha çok burun mukozasındaki Ig A'nın titresi ile yakın ilişkilidir. Herhangi bir tipe enfeksiyonu takiben birkaç hafta için heterotipik Rinoviruslara ve birkaç yıl homotipik virusa direnç oluşur (80).

1.5.4.5. Laboratuvar Tanı

1.5.4.5.1. Örnek alınması ve muhafazası

Tanı için materyal alınması işlemi semptomların başlamasından itibaren 3 gün içerisinde yapılmalı ve örnek en kısa zamanda laboratuvara ulaştırılmalıdır. Bu esnada +4°C'de muhafaza edilmelidir. Örnek olarak burun yıkama sıvısı veya faringeal sürüntü kullanılabilir. Örnek uzun süre saklanacaksa -80°C'de saklanmalıdır (85).

1.5.4.5.2. Virus İzolasyonu

Rinoviruslara duyarlı olmaları nedeniyle insan orijinli olan WI-38, WI-26 ve MRC-5 gibi diploid hücre kültürleri izolasyon için uygun ortamlardır. İnsan embriyonu böbrek ve akciğer hücre kültürleri de kullanılmaktadır. Virus identifikasyonu, ısıya duyarlılık ve asit pH ve lipit solventlere rezistan oluşu ile yapılır. Rinoviruslar en iyi 33 °C de ürerler, düşük pH'ya hassasdır ve kloroform, eter gibi solventlere de dayanıklıdır (85).

1.5.4.5.3. Viral Antijenin Gösterilmesi

Viral antijenin doğrudan klinik örnekten gösterilmesi, pek çok Rinovirus serotipi varlığı nedeniyle zordur. ELISA ile direkt olarak örnekten Rinovirus gösterilebilir. Nükleik asit hibridizasyonu ile klinik örnekten % 90'a varan oranda Rinovirus gösterilmiştir (73).

1.5.4.5.4. Serolojik Tanı

Serumdaki antikorlar veya burun yıkama örneği için standart serolojik test nötralizasyon testidir. Hemagglütinasyon inhibisyon testi kullanılmakla birlikte,

nötralizasyon testi kadar hassas değildir. Ayrıca bazı Rinoviruslar hemaglutinasyon özelliği göstermez. Kompleman fiksasyon testinde Rinoviruslarla, enteroviruslar arasında heterotipik antikor gösterebilir. İnsan EI ve 2 antijenleri kullanılarak hazırlanmış ELISA serum ve nazal Ig G ve Ig A'lar için kullanılmıştır. Rinovirusun pek çok serotipinin olması nedeniyle doğal enfeksiyon tanısı koymada problemler olmaktadır (76).

1.5.4.6. Epidemiyoloji

Rinoviruslar bütün dünyada yaygın halde bulunmaktadır. Enfeksiyonların aniden değiştiği sonbahar başı ve ilkbahar başında meydana gelir.

Rinoviruslar her yaş grubunda enfeksiyon oluşturabilmektedir.

Virus yayılımı inhalasyonla olabileceği gibi, bulaşta enfekte ellerin eşyalara ve diğer kişilerin ellerine teması da etkili olduğu bilinmektedir (86).

1.5.4.7. Tedavi ve Korunma

Spesifik bir tedavisi yoktur. Çok sayıda serotipinin olması, yanıtın kalıcılığı olmaması aşı hazırlanmasını güçleştirmektedir. Hastalık tablosunun ağır olmaması da tedavi ve aşı için zorunluluk getirmemektedir. En iyi korunma yöntemi, salgınlarda dikkatli olma, el yıkama ve kontamine objelerin dezenfeksiyonudur (87).

1.5.5. RESPIRATUVAR SİNSİTYAL VİRUS (RSV)

İlk olarak 1956 yılında izole edilen virus, yenidoğan ve küçük çocuklarda sıklıkla olmak üzere, alt solunum yollarında enfeksiyon oluşturan önemli bir patojendir. Virus hücre kültürlerinde geniş sinsiyumlar oluşturması sebebiyle respiratuvar sinsiptyal virus adını almıştır. RSV, paramyxoviridae ailesi, pneumovirinae alt ailesinin pneumovirus cinsinde yer almaktadır (88).

1.5.5.1. Genel Özellikleri

Morfolojik olarak diğer paramiksoviruslara benzer 120-300 nm. çapında, pleomorfik yapıdadır. Negatif polariteli, tek sarmal RNA içeren genomu vardır. 13,5 nm. çapında helikal bir nükleokapside sahiptir. Üzerinde 12-15 nm. uzunlukta çukurluklar bulunan lipid bir zarfa sahiptir. Diğer Paramyxoviruslardan farklı olarak, hemaglutinin ve nöraminidaz bulunmaz (88).

Genom 10 viral protein kodlamaktadır. Bu proteinlerden N, P ve L nükleokapsid; F, G, M, M 2 zarf; SH virionla ilgili proteinlerdir. NS1 (1C), NS2 (1B) yapısal olmayan proteinlerdir. N proteini orta büyüklüktedir ve nükleokapsidin majör yapısal proteinidir. P ve L proteinleri transkripsiyon ve replikasyonda yer alırlar. N proteinine karşı monoklonal antikorlar immunofloresan yönteminde intrasitoplazmik inklüzyon cisimlerini boyar. Diğer RSV proteinlerinin tersine P proteini ileri derecede fosforiledir ve nispeten asidiktir. P'ye karşı monoklonal antikorlar da intrasitoplazmik inklüzyon cisimlerini boyar. L proteini çok büyüktür ve nispeten hidrofobiktir. Büyüklüğü ve nükleokapsitteki lokalizasyonu nedeni ile L proteininin viral RNA bağımlı RNA polimeraz olduğu düşünülmektedir (89).

1.5.5.2. Antijenik Yapı

Farklı RSV suşlarına, monoklonal antikor panellerinin uygulanması, özellikle G glikoproteinlerindeki farklılıklara dayanarak RSV suşlarının iki subtip ayrılmasına yol açmıştır. RSV suşları, subgrup A (Long ve A2 suşları ile karakterize) ve subgrup B (18537 suşu ile karakterize) olarak gruplandırılmıştır. Nükleotid ve aminoasit dizi analizi, her sub grubun F glikoproteininin % 53 antijenik ilişki gösterdiğini ve % 89 amino asit dizi homolojisi bulunduğunu göstermiştir (88). Oysa A ve B grubunun G glikoproteinleri % 5 oranında antijenik ilişki ve % 53 amino asit dizi homolojisi gösterirler. Retrospektif analizlere göre bu suşlar on yıllardır vardır ve tüm dünyada RSV epidemileri sırasında birlikte bulunurlar. Bir alt tipe bağlı infeksiyon belirli bir coğrafik bölgede ya da dönemde belirgin olabilir (90).

Antijenik varyasyonun önemi henüz kesinlik kazanmamıştır. Sub grubun A virusu ile infeksiyon subgrup B ile çapraz reaksiyon veren güçlü antikor yanıtına yol açar. Oysa Subgrup B virusu ile primer infeksiyon sonucu oluşan antikorlar subtip A suşları ile daha az çapraz reaksiyon verirler. İzolatların identifikasyonu hücre kültüründe sinsityum oluşumu RSV için karakteristiktir. Parainfluenza ve kızamık virusları da sinsityum oluştururlar ancak RSV için kullanılan Hep-2, A549 ve Vero hücrelerinde sinsityum oluşturmaları nadirdir (91).

1.5.5.3. Yaptığı Hastalıklar ve Klinik Bulgular

RSV özellikle bebeklerde solunum yolu hastalığının en önemli etkenlerinden birisi olarak görülmektedir. Özellikle 6 ayın altındaki bebeklerde bronşiolit ve pnömoni etkenidir. Orta kulak iltihabı, küçük çocuklarda görülen bir

olduğu gösterilmiştir. Ayrıca yeni doğanlarda F ve G proteinlerine karşı azalmış bir antikor yanıtı gözlenirken genellikle serum ve burun salgısında nötralizan antikorlar da oluşmadığı gösterilmiştir. Halbuki erişkinlerde doğal primer infeksiyondan sonra F ve homolog G proteinlerine karşı oluşan antikorlar ve homolog suşa karşı oluşan nötralizan antikorlar hastalık oranı ile ters orantılıdır. Hastalığa karşı korunmanın homolog G proteinine karşı oluşan antikorlar aracılığı ile olduğu düşünölmektedir (95).

Aşılananlarda yapılan serolojik çalışmalar yeterli antikor yanıtının oluşmadığını göstermiştir, bu durum aşı hazırlanmasında formalinin RSV proteinlerinin önemli epitoplarını değiştirmesi sonucu koruyucu olmayan antikor yapımına bağlanmıştır. RSV infeksiyonlu çocukların nazal sekresyonlarında nötralizan antikorlar saptanmış, fakat koruyuculuğu tam olarak gösterilememiştir. Hücresel immünite çalışmalarında inaktif aşının artmış bir lenfoproliferatif immün yanıt oluşturduğu gözlenmiş ve spesifik sitotoksik T lenfositlerinin ocuk ve erişkin hastalarda geliştiği de gösterilmiştir. Bu spesifik sitotoksik T hücrelerinin hedefi N, F ve M2 proteinleridir. İmmünite konusundaki çalışmalar ve çeşitli muhtemel immün mekanizmalar açıklanmaya çalışılmaktadır (96).

1.5.5.5. Laboratuvar Tanı

1.5.5.5.1. Örneğin Alınması ve Muhafazası

Virus solunum yolu hastalığına sebep olduğundan hastalığın başlangıcında alınacak olan solunum yolu sekresyonlarında bol miktarda bulunur. Bu sebeple nazofarenks sürüntüsü veya boğaz sürüntüsü, boğaz çalkantı suyu, akciğer biyopsi parçası tanı için materyal olarak kullanılabilir. Alınan sürüntüler +4°C’de uygun besiyerinde muhafaza edilip en kısa zamanda laboratuvara ulaştırılmalıdır (97).

1.5.5.5.2. Tanı

RSV enfeksiyonunun kesin tanısı viral antijenlerin araştırılması, virusun hücre kültüründe üretilmesi, serolojik testler ve son zamanlarda sık kullanılan ve başarılı sonuçlar alınan moleküler çalışmalarla konulabilir (97). Hücre kültürü uzun zaman alması sebebiyle pek tercih edilen bir yöntem değildir. Bunun yerine IFAT, EIA veya PCR kullanılmaktadır (98,99). Serolojik tanı ise hastalığın takibinden ziyade epidemiyolojik çalışmalarda kullanılmaktadır (100).

1.5.5.6. Epidemiyoloji

Virus bütün dünyada yaygın olup özellikle bebek ve çocuklarda solunum yolu hastalığının önemli bir etkenidir. Virus genellikle yıllık salgınlar yapar. Bu salgınlar genellikle kış veya ilkbahar aylarında olur. Epidemilerde genellikle A ve B grubu viruslar bir arada salgın yaparlarsa da grup A daha fazla izole edilmektedir. Yaş, cinsiyet ve sosyoekonomik durum hastalığın ciddiyetinde ve seyrinde etkili faktörlerdir. En ciddi hastalık formları yeni doğanlarda görülür. Erkek çocuklarda insidans daha yüksektir (101).

Virus hastalığın başlangıcından kısa bir süre önceden yaklaşık iki hafta sonrasına kadar yayılabilir. Tüm yaş grupları RSV ile enfeksiyona duyarlıdır. RSV ile enfeksiyon sonucu oluşan hastalığa bağlı hospitalizasyon genellikle 2-6 aylık bebeklerde görülür. Bronşiolit ve pnömoniye bağlı hastaneye yatış oranı, primer RSV enfeksiyonu geçiren bebeklerde 24/1,000 kadar yüksek olabilir. Endüstrileşmiş bölgelerde bebeklerde ve sigara dumanına maruz kalanlarda da RSV ile enfeksiyon daha ağır seyretmektedir (102). Hayatın ilk yılında, bebeklerin % 50'si, ikinci yılın sonunda da hepsi RSV enfeksiyonuna yakalanmış olur. Özgül lokal ve sistemik antikor ve nötralize edici antikorlar RSV ile enfeksiyonu takiben oluştuğu halde, reinfeksiyon sık görülür. Pediatri, yataklı kliniklerde RSV enfeksiyonunun nozokomiyal yayılımında önemli bir problemidir (103).

1.5.5.7. Tedavi ve Korunma

Tedavide destekleyici tedavi kullanılır. Aerosol şeklinde uygulanan ribavirin yarar sağlamaktadır (104). Hem tedavi, hem de profilaksi için immunglobulin kullanılabilmektedir. Canlı attenüe virus aşısı denenmiş, ancak başarılı olmamıştır (105).

1.5.6. METAPNEUMOVİRUS

Human metapnömovirus (hMPV) ilk olarak 2001 yılında, solunum yolu yakınmaları olan çocuklardan izole edilmiştir (106). Daha sonraki araştırmalar virusün dünyada çocuklar arasında 2-4 ve 5-9 yaş grubunda yaygın olarak bulunduğunu, toplumdan kazanılan akut solunum yolu enfeksiyonlarına neden olduğunu, yenidoğanda RSV ile koinfeksiyon oluşturması bronşiolitin ağırlaşmasında rol oynadığını göstermektedir (107-109).

1.5.6.1. Genel Özellikleri

hMPV genusu zarflı, segmentsiz, tek zincirli, negatif polariteli, s›ras› ile 3' ucundan itibaren N (nukleokapsit), P (fosfoprotein), M (matrix), F (fusion), M2 (seconder matrix), SH (small hidrofobik), G (glikoprotein), L (large polimeraz), 5' ucuna genlerden oluşan RNA genomu içerirler (110, 111). Lineer genomik RNA molekülü helikal ribonükleoprotein complexinde P ve L proteinleri ile ilişkili olan N proteini ile kapside s›k›ca tutunmaktadır (112). Ribonükleoprotein kompleksi genom replikasyonu için gerekli olan mRNA transkripsiyonunun yapıldığı bölgedir (113).

hMPV, *Paramyxoviridae* ailesi *Pneumovirus* alt ailesinde yer almaktadır. Filogenetik olarak hRSV, hMPV'ye en yakın insan virusüdür. Klinik belirtileri de RSV ile örtüşmektedir (114). Hastalık hafif solunum yakınmalarından, ağır öksürük, bronşiolit ve pnömoniye kadar değişen belirtiler ile yüksek ateş, miyalji ve kusma yapabilmektedir. Dolay›s› ile bazı hastalar›n hastaneye yatmas› ve mekanik ventilasyon gerekmektedir (115, 116). hMPV yaşlı insanlarda da RSV benzeri hastalığa neden olmaktadır. Yaşlılarda öksürük, ateş solunum yolu şikayetleri öne çıkan belirtilerdir (117). İngiltere'de yapılan bir çalışmada 40-64 yaş arasında öksürük, farinkste ağrı hissi, balgam çıkarmada artış, letarji, burun ak›nt›s› ile seyreden enfeksiyonlu hastalardan % 70 oran›nda hMPV saptandığı, RSV'de olduğu gibi immunkompromize hastalarda artan morbiditeye neden olduğu bildirilmektedir (118).

1.5.6.2. Yaptığı Hastalıklar ve Klinik Bulgular

hMPV dünya üzerinde yaygın bir patojendir. Özellikle çocuklar ve erişkinlerde bu virus şiddetli öksürük, bronşiolit ve pnömoni benzeri semptomlarla nazofarengial yolda hafif yada şiddetli akut enfeksiyona neden olmaktadır (115-117). hMPV son yıllarda akut bronşiolitli akut solunum yolu enfeksiyonu bulunan çocuklardan izole edilmiş yeni bir solunum virusudur. hMPV ya tek başına viral patojen olarak ya da RSV ile koinfekte identifiye edilebilmektedir (119). Mevsimsel dağılımda diğer solunum yolu viral etkenleri ile benzerlikler göstermektedir (120).

Diğer solunumsal viral patojenler ile ya da RSV + hMPV' nin neden olduğu bronşiolitler arasında klinik laboratuvar açısından herhangi bir farklılık yoktur. Tek başına hMPV pozitifliği ile RSV hMPV birlikte pozitifliği arasında hastalığın şiddeti açısından da bir fark yoktur. Benzer şekilde kalp atım sayısı, solunum sayısı wheezing, deri rengi, O₂ saturasyonu indekslerinde de önemli farklılıklar gözlenmez.

RSV'ye bağlı bronşiolitli infantların bronkoalveoler lavaj sıvılarının analizinde önemli oranda hMPV koinfeksiyonu da bulunmaktadır. hMPV; çocuklarda alt solunum yolu hastalığı olarak ağır bronşiolit ve pnömoniye sebep olan önemli bir patojendir. hMPV varlığı ile birlikte klinik ve epidemiyolojik karakteristik özellikler de dikkate alınmalıdır. Klinik bulgular orta derecede ısı artışı, burun akıntısı, şiddetli öksürük, krup, taşidispne, taşikardi, diffüz wheezing ve raller ile birlikte lökositoz ve hipoksemi bulguları görülebilmektedir (114).

1.5.6.3. Epidemiyoloji

hMPV'ün genotiplendirilmesinde P proteininin toplumda 4 subtipinin varlığı belirlenmiştir. hMPV, çocukların alt solunum yolu infeksiyonlarında önemli bir patojendir. Nozokomiyal infeksiyonlara yol açmaktadır (114).

Son yapılan çalışmalarda hMPV'ün 2 ay-77 yaş arası hastalarda solunum yolu rahatsızlığına neden olabildiği belirlenmiştir (121-123). Epidemiyolojik olarak toplumda RSV ile birlikte sirkülasyon halinde bulunmaktadır (124,125). 2001 yılında Hollandalı araştırmacılar hem üst solunum yolu infeksiyonu hem de ağır bronşiolit ve pnömoni semptomları gösteren alt solunum yolu infeksiyonlu 28 çocuktan hMPV izole etmişlerdir ve yapılan serolojik çalışmalarda bu virusun en az 50 yıldır insanlar arasında sirkülasyon gösterdiğini ve 5 yaşındaki Hollandalı tüm çocukların bu virusa maruz kaldığını iddia etmişlerdir (106).

1.5.6.4. Laboratuvar tanısı

hMPV hücre kültürlerinde güç üremektedir. Hızlı antijen bakılması için kit geliştirme çalışmaları devam etmektedir. Seroloji retrospektif tanıyı sağlamaktadır, bu nedenle kesin tanı PCR ile yapılmaktadır (114).

1.5.6.5. Tedavi

Henüz spesifik tedavisi yoktur. Semptomatik tedavi veya solunum desteği uygulanabilir. Invitro çalışmalar poliklonal immunglobulin ve ribavirin ile kombine tedavinin uygulanabileceğini göstermektedir. Henüz aşısı yoktur (126).

1.5.7. KORONAVİRUSLAR

Koronaviruslar ilk olarak 1965 yılında Tyrrell ve Bynoe, 1966 yılında Hamre ve Procknovv tarafından insan embriyonu silli trakea veya nazal epitelyumu ve primer insan böbrek hücre kültürlerinde üretilmişlerdir. Günümüzde bu ailede

yaklaşık 15 tür yer almaktadır. Koronavirüsler insanlardan başka sığır, domuz, kedi, köpek kemiriciler ve kuşlar (bazısı özellikle civcivlerde ciddi patojen) da hastalığı oluşturmaktadır.

1.5.7.1. Sınıflandırma

Koronaviridae ailesinden Koronavirüs (omurgalı infeksiyöz bronşit virusu) ve Torovirüs'lar (at virusu) yer almaktadır.

1.5.7.2. Morfoloji

Koronavirüs partikülleri yaklaşık 60-220 nm büyüklükte, düzensiz görünümde, 20 nm uzunluk 10 nm genişlikte "club shaped" peplomerlidir. Koronavirüs ismi virüsün görüntüsünün taca benzetilmesi nedeniyle verilmiştir. Tek zincirli, segmentsiz, (+) özellikli RNA virüslerdir, virionda polimeraz bulunmaz.

Zarfa üç glikoprotein yer alır. S protein: majör antijenidir, reseptör bağlama ve hücre füzyonundan sorumludur. E protein: virüs zarfı ile ilişkili küçük proteindir. M protein: virüsün tomurcuklanarak zarfın alınmasında rol oynayan membran proteindir. HE protein ise hemaglutinin esterase'dir. Genetik madde esas protein N fosfoprotein ile birliktedir.

1.5.7.3. Replikasyon

Çoğu insan koronavirüsleri hücre kültüründe üremez, ancak 229E ve OC43 suşları bazı hücrelerde üretilebilir. Replikasyon influenza virüsünde olduğu gibi yavaştır. Virüsün son şeklini alması golgi cihazında olur ve tomurcuklanarak hücreden ayrılır.

1.5.7.4. Patogenez

Koronavirüsler insanlarda sıklıkla solunum yolu infeksiyonlarına neden olur. "Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS)" bunlara dahildir. Ayrıca nadiren enterik infeksiyonlar ve nörolojik sendromlara neden olabilirler.

Bulaşma solunum sekresyonlar, fekal oral yol ve mekanik yolla olur. Virüs çoğunlukla epiteliyal hücrelerde çoğalır. Ancak nadiren böbrek, karaciğer, kalp ve gözü de infekte edebilmekte ve nörolojik komplikasyonlara yol açabilmektedir. SARS, alt solunum yollarında viral pnömoniye neden olmaktadır.

Koronavirüs infeksiyonları tüm dünyada ve sık görülür. Soğuk algınlığı olgularının yaklaşık % 25'inde koronavirüslerin etken olduğu bildirilmektedir. İnfeksiyonun insidensi mevsimseldir, çoğunlukla kış aylarında görülür. Sıklıkla çocuklarda, daha az olarak yetişkinlerde rastlanır. Koronavirüslerde antijenik değişim bilinmemektedir (127).

1.5.8. HANTAVİRUS

İnsana kemiricilerden bulaşan bu virus “hantavirus pulmoner sendromu” denilen akut pnömoni tablosuna yol açar. Bu sendrom hızlı ilerleyen solunum yetmezliği, pulmoner ödem, hemokonsantrasyona bağlı şok tablosu ile karakterizedir. Periferik kanda trombositopeni, belirgin sola kayma, immunoblastik lenfositler görülür. Tanı virusa özgün IgM ve IgG antikorlarının varlığı, mononükleer hücrelerde veya infekte dokuda PCR ile RNA’sının saptanması ile konulur. İntravenöz ribavirin tedavisi deneysel olmakla birlikte başka bir antiviral tedavi sistematik olarak çalışılmamıştır (128).

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Çalışma Gruplarının Seçilmesi

AKU Tıp Fakültesi Hastanesi ve S.B. Afyonkarahisar Zübeyde Hanım Doğum ve Çocuk Hastanesi'ne bronşit-bronşiolit ön tanısı ile yatırılan 1 ay - 13 yaş arası (ortalama:16.4 ay \pm 4.5 ay) 22' si kız olmak üzere toplam 46 hastadan solunumsal patojenler anket formu (Form 1) doldurularak kan ve nazofarengial örnekler alınmıştır. Örnek alınan hastalarda grip aşısı yapıp yapılmadığı sorgulanmış ve grip aşısı olmayan hastalardan örnek alınmıştır.

2.2. Örnek Toplama Zamanı

Çalışmaya alınan örnekler Ekim 2005- Mayıs 2006 tarihleri arasında toplanmıştır. Respiratuar viral infeksiyonların özellikle yaygın olduğu sonbahar başlangıcından ilk bahar ortasına kadar olan dönem örnek toplamak için uygun sezon olarak belirlenmiştir.

2.3. Gereç

2.3.1. Örneklerin alınması

Çalışmada kan ve nazofarengial sürüntü olmak üzere iki tip örnek kullanılmıştır.

Kan örnekleri laboratuvara ulaştırılincaya kadar +4°C'de muhafaza edilmiştir. Laboratuvarda santrifüj edilip serumu ayrıldıktan sonra mikrosantrifüj tüplerine aktarılarak çalışma zamanına kadar -20°C'de saklanmıştır.

Nazofarengial sürüntüler swablar aracılığıyla alınarak steril mikrosantrifüj tüplerindeki 1 ml MEM (Minimal Essential Medium) vasatına aktarılmış ve laboratuvara ulaştırılincaya kadar +4°C'de muhafaza edilmiştir. Laboratuvarda ise çalışma zamanına kadar -20°C'ye konularak saklanmıştır.

MEM Vasatının İçeriği:

- %2 Fetal Bovine Serum
- 100 U/ml Penicillin
- 100 µg/ml Streptomycin
- 40 µg/ml Neomycin
- 20 µg/ml Amphotericin B

2.4. Yöntem

Bu çalışmadaki amaç iki hızlı tanıma metodunun respiratuvar virüslerin tanıma açısından değerlendirilmesinin yapılması amaçlanmıştır.

1. metod: Multiplex RT PCR ile (Hexaplex Plus, Prodesse Inc. Waukesha WI) respiratuvar sinsityal virus (RSV), influenza A (FluA), influenza B (FluB) parainfluenza virus tip 1, 2 ve 3 (PIV1, PIV2 ve PIV3) ve human metapneumovirusun (MPV) nazofarengial örneklerden taranması.

2. metod: Floresan antikor tekniği (FAT- Euroimmun GmbH, Almanya) ile kanda Ig M antikorların taranması.

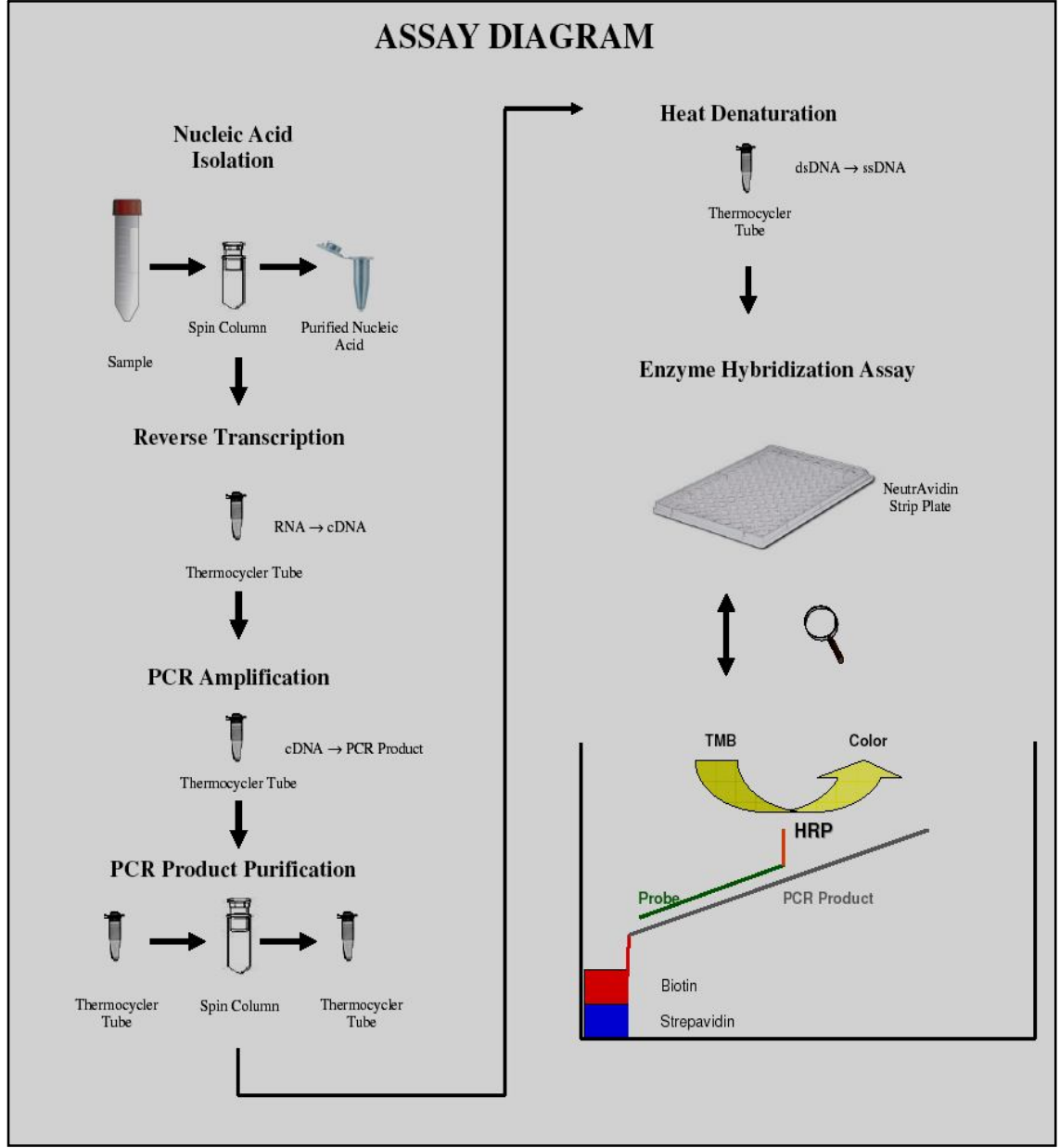
2.4.1. PCR Çalışma Basamakları

Bu çalışmada nazofarengial sürüntü örnekleri Multiplex RT PCR ile çalışılmıştır. Bu yöntemle; amplifikasyon tüpü içerisine klinik örnekte bulunabilecek her mikroorganizma geni üzerindeki farklı hedef bölgeler için özgül olan primerler kullanılarak çok sayıda hedef aynı anda çoğaltılabilmektedir.

PCR şu aşamalardan oluşmaktadır:

- **Ekstraksiyon:** Virüslerden saf nükleik asit elde edildiği aşamadır. DNA veya RNA'nın silika membran yapısındaki filtrelerde tutulması sonucu elde edilir.
- **cDNA Eldesi:** RNA veya DNA'dan, komplementer DNA elde edilmesi aşamasıdır. Termal cykler'da gerçekleştirilir.
- **PCR:** Elde edilen DNA dizilerinin çoğaltılması aşamasıdır. Termal cykler'da gerçekleştirilir.
- **Pürifikasyon:** Çoğaltılmış DNA dizilerinden, daha küçük baz çifti içeren küçük DNA dizilerinin elde edildiği aşamadır.
- **Denatürasyon:** Çift zincirli nükleik asidi tek zincirli hale getirme aşamasıdır. Isı ile denatürasyon yapıldıktan sonra buz bloğa alınarak, zincirlerin tekrar birleşmesi engellenir.
- **Hibridizasyon:** Tek zincirli nükleik asitlerle floresan işaretli problemlerin birleşmesi aşamasıdır.
- **Okutma işlemi:** Spektrofotometrede 450 nm dalga boyunda okutulur. (Şekil 2.1)

Şekil 2.1: Multiplex RT-PCR yönteminin işleyiş şeması (*)



(*)<http://www.prodesse.com/docs/pi/pi310ce.pdf> ' den düzenlenmiştir.

2.4.1.1. Ekstraksiyon Aşaması

2.4.1.1.1. İçerik

- High pure viral nucleic acide kit
- High pure viral nucleic acide wash buffer
- Proteinaz K
- Poly (A)
- Elution buffer
- Binding buffer

2.4.1.1.2. Çalışma:

High pure viral nucleic acide kit'e 20 ml etanol eklenmiştir.

High pure viral nucleic acide wash buffer'a 40 ml etanol eklenmiştir.

Proteinaz K'ya 5 ml Elution Buffer eklenmiştir.

Poly (A)'ya 0,5 ml elution buffer eklenmiştir.

Proteinaz K ve Poly A çözdürüldükten sonra -20 °C de saklanmıştır.

Önce çalışma solüsyonu hazırlanmıştır:

50 µl Poly A ve 2,5 ml Binding Buffer birleştirilmiştir, Bir örnek için 400 µl olmak üzere, 46 örnek hazırlanmıştır.

a. Boş mikrosantrifüj tüplerine 50 µl proteinaz K dağıtılmıştır.

b. Tüm tüplere 400 µl çalışma solüsyonu eklenmiştir.

c. Ayn> tüplere 400 µl örnek eklenip vortexlenmiştir.

d. Benmari 72°C'ye ayarlanmış ve karışımlar 10 dk benmaride bekletilmiştir.

e. Benmariden ç>kar>ld>ktan sonra her tüpe 100 µl binding buffer eklenip vortexlenmiştir.

f. High pure spin filter tubes (spin kolon)'a karışım olan tüplerden 500 µl aktarılmıştır. Spin kolonlar boş kolon ve filtre olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. Karışıma önce 500 µl aktarılıp 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Daha sonra solüsyonun kalan k>sm> (450 µl) aktarılmış ve tekrar 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir. İkinci santrifüjde filtreler boş kolonlara konulup, bir önceki santrifüjde kullanılan kolon ve sıvı atılmıştır.

Filtreler silika membran yap>s>nda olup (-) elektrik yüklüdür. DNA ve RNA (+) yüklü olduğu için bu materyalleri tutma özelliğine sahiptir. Ayrıca mikroporlar içerir ve DNA ve RNA kütesinin filtrede kal>p s>v>n>n tüpe geçmesini sağlar.

g. İkinci santrifüjden sonra filtreli tüpler tekrar boş spin kolonlara aktarılıp üzerine 500 µl inhibitör removal buffer eklenmiş ve 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir.

h. Daha sonra filtreler çıkarılıp boş kolonlara yerleştirilmiş ve 450 µl wash buffer eklenip 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Filtreler tekrar boş kolonlara aktar>lp tekrar 450 µl wash buffer eklenmiş ve 8000 rpm de 1 dk santrifüj edilmiştir. İkinci santrifüjden sonra 13000 rpm'de 10 sn santrifüj edilmiştir. Bu santrifüjler spin kolonlar boşaltılmadan yapılmıştır. Bunun sebebi kalan fazla etanolün uçmasını sağlamaktır.

›. Hasta say›› kadar mikrosantrifüj tüpü dizilmiştir. Filtreler mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır. Filtrelerin üzerine 50 µl elution buffer eklenip 8000 rpm’de 1 dk santrifüj edilmiştir. Böylece RNA’lar alttaki mikrosantrifüj tüplerine geçmiştir. Filtreler at››p mikrosantrifüj tüplerinin kapakları kapatılmıştır.

2.4.1.2. cDNA Eldesi

RNA’lar cDNA’ya çevrilmiştir. (+) kontroller RNA olduğu için bu aşamada çalışmaya (+) kontroller de katılmıştır.

2.4.1.2.1. İçerik

Pozitif Kontroller:

İnfluenza A, İnfluenza B, RSV A, RSV B, hMPV, Parainfluenza 1, Parainfluenza 2, Parainfluenza 3

Ayrıca bu aşamada içerikte 2 tane RT-Mix (for revers transcription), RNase, DNase ve 1 tane de free water bulunmaktadır. Bunların tümü -20 °C’de saklanıp kullanılacağı zaman açılmıştır. RT-Mix haricindekiler vortexlenmiştir. Kontroller, RNase ve DNase free water ile 1/10 oranında dilüe edilmiştir.

Pozitif kontroller 30 µl olup 270 µl free water ile dilüe edilmiştir.

2.4.1.2.2. Çalışma

24 örnek + 8 kontrol için 32 adet küçük mikrosantrifüj tüpü (0,1 ml lik) alüminyum bloğa yerleştirilmiştir. Alüminyum blok + 4°C’de muhafaza edilmiş ve çalışılacağı zaman çıkarılmıştır.

Mix solüsyon örnek başına

11 µl RT mix

4 µl MgCl₂

1 µl MuLV Revers Transkriptaz (50 U/ µl)

1 µl reverse IT blend şeklinde karıştırılıp, 17 µl tüplere aktarılmıştır.

17 µl mix konmuş tüplerin her birine 3 µl örnek ve kontroller eklenip thermal cyclers’a konulmuştur.

Buradaki işlemler sırası ile:

22 °C’de 10 dk,

42 °C’de 30 dk,

95 °C’de 5 dk,

4°C’de bir gece bekletilmiştir. 4°C çalışma ve muhafaza ortamı olarak alg›lanabilir. Böylece RNA, cDNA’ya dönüştürülmüştür. Cihazdan çıkan tüpler soğuk spora alınmıştır.

2.4.1.3. PCR aşaması

2.4.1.3.1. İçerik

PCR için ayrı bir mix mevcuttur (Hexaplex Supermix).

Örnek başına 39,5 µl supermix, 0,5 µl enzim konulmuştur (Enzim Taq DNA polimeraz enzimidir). Toplam örnek başına 40 µl mix elde edilmiştir.

2.4.1.3.2. Çalışma

Ayrı mikrosantrifüj tüplerine soğuk ortamda 40 µl mix ve 10 µl cDNA konulmuştur.

Rotor Gene PCR cihazına yerleştirilmiş ve amplifiye edilmiştir. Buradaki işlemler sırası ile;

95 °C'de 10 dk,

95 °C'de 1 dk / 55 °C'de 30 sn / 72 °C'de 45 sn,

94 °C'de 1 dk / 60 °C'de 30 sn / 72 °C'de 30 sn,

72 °C'de 7 dk, (Bu döngü 30 kez yapılmıştır)

4 °C'de çalışma ve muhafaza şeklindedir.

2.4.1.4. Pürifikasyon aşaması

2.4.1.4.1. İçerik

Binding buffer,

Wash buffer (24 ml etanol eklenmiştir),

Elution buffer

2.4.1.4.2. Çalışma

a. PCR için kullanılan solüsyonun 5 katı binding buffer eklenmiştir. Bizim kullandığımız miktar 50 µl olup bu karışım 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarılarak üzerine 250 µl binding buffer eklenmiştir.

b. Daha sonra bu karışım spin kolona aktarılmıştır. Bu aşamada filtreler daha sıkıdır. Bunun nedeni RNA ekstraksiyonunda filtrelenmesi gereken RNA veya DNA'nın uzun baz dizilerinden oluşmasıdır. Bu aşamada ise 200 baz çiftlik küçük nükleik asitler yakalanmaya çalışılmıştır. Spin kolonlar 13000 rpm'de 30 sn santrifüj edilmiştir.

c. Filtreler boş kolonlara aktarılmıştır. Üzerine 600 µl wash buffer eklenmiştir. 13000 rpm'de 30 sn santrifüj edilmiştir. Filtreler tekrar boş kolonlara aktarılıp 13000 rpm'de 30 sn boş olarak santrifüj edilmiştir. Amaç fazla alkolün uçurulmasıdır.

d. Filtreler boş mikrosantrifüj tüplerine aktarılıp üzerlerine 50 µl elution buffer eklenmiştir (boş mikrosantrifüj tüplerinin kapakları santrifüj esnasında kırılmaması için kopartılmıştır). 13000 rpm'de 30 sn santrifüj edilmiştir.

Filtreler atılıp mikrosantrifüj tüplerinin kopartılan kapakları tekrar kapatılmıştır.

2.4.1.5. Denatürasyon aşaması

2.4.1.5.1. Çalışma

Mikrosantrifüj tüpleri 95 °C'lik ısı bloğuna yerleştirilmiştir. 5 dk bekletildikten sonra DNA tek sarmal hale gelmiştir. Isı bloğundan sonra 5 dk buz bloğunda bekletilmiştir (tekrar çift sarmal hale gelmesini önlemek amacıyla).

Buz bloğundan sonra tüpler tekrar 95 °C'lik ısı bloğuna alınmıştır. 5 dk bekletilip tekrar buz bloğuna alınıp ve 5 dk bekletilmiştir.

2.4.1.6. Hibridizasyon aşaması

2.4.1.6.1. İçerik

-20 °C'den hibridizasyon problemleri çıkarılmıştır. Bunlar; hMPV probe, HPIV probe, İnfluenza virus pooled probe, Hexaplex plus internal probe, Hexaplex plus RSV probe'dur.

+4 °C'den hibridizasyon buffer ve Neutravidin coated strip plate çıkartılmıştır.

Her örnek ve kontroller için:

3,5 µl probe

66,5 µl buffer karışımı hazırlanmıştır.

2.4.1.6.2. Çalışma

Toplamda	Buffer	Probe
İnternal kontrol	1729 µl	91 µl
PIV	1929 µl	102 µl
İnfV	1862 µl	98 µl
RSV	1862 µl	98 µl
hMPV	1796 µl	95 µl

ELISA tepsiğine 65 µl probe+buffer karışımı eklenmiştir.

Üzerine 5'er µl örnek konup pipetleme işlemi bittikten sonra Elisa tepsiğinin üzerine bant yapıştırılmıştır. 42 °C'lik etüvde 25 dk inkübe edilmiştir.

2.4.1.6.3. Yıkama işlemi

1 lt distile suya 10x wash solution eklenmiştir. ELISA tepsiği 5 er kez bu solüsyonla yıkanmıştır.

Substrat A ve substrat B 1/1 oranında karıştırılmıştır. 200 µl ELISA tepsilerine konulmuştur.

Substrat pozitif örneklerde mavi renk değişimine neden olmuştur. Ayrıca kontrollerde mavi renk değişimi gözlenmiştir.

Substratlar konulduktan sonra 15 dk karanlık ortamda oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.

Üzerlerine 50 µl stop solüsyonu eklenip, spektrofotometrede 450 nm dalga boyunda okutulmuştur.

Pozitif örneklerde ve kontrollerde stop solüsyonu konulduktan sonra sarı renk değişimi gözlenmiştir.

İnternallerin ve kontrollerin 400'ün üzerinde olması çalışmanın güzel ve etkili yapıldığını göstermiştir.

2.4.2. İmmun Floresan Antikor (FAT) Çalışması

Respiratory Tract Profile seti (FAT- Euroimmun GmbH, Almanya) ile kanda Ig M antikorlarının varlığı araştırılmıştır.

2.4.2.1. İçerik

Fosfat buffer solüsyonu (PBS)

Tween 20 solüsyonu

Eurosorb solüsyonu

İnkübasyon tepsileri

Konjugatlar

2.4.2.2. Çalışma

Öncelikle PBS hazırlanmıştır. Toz halinde olan PBS 1000 ml distile suda çözündürülmüştür. Üzerine tween 20 solüsyonu eklenerek karıştırılmıştır.

Serum örnekleri vortekslenmiş ve mikrosantrifüj tüpleri içinde EUROSORB solüsyonu ile 1/10 oranında dilüe edilmiştir. Bu dilüsyon 22,2 µl serum / 200 µl Eurosorb solüsyonu şeklinde hazırlanıp, tekrar vortekslenmiştir.

15 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir.

2000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir.

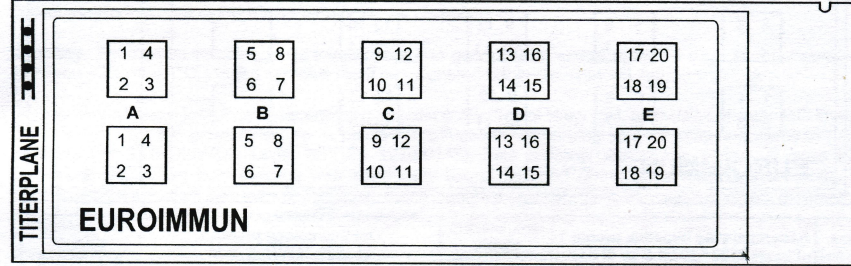
Elde edilen örneğin süpernatant kısmı kullanılmıştır.

İnkübasyon tepsisinde her örnek için 5 alan mevcuttur (Şekil 2.4.2). İlk 4 alan 1/10'lük dilüsyon için, 5. alan ise 1/100'lük dilüsyon için kullanılmıştır. Elimizdeki örnek 1/10 dilüsyon olduğu için ilk 4 alana örnek direkt eklenmiştir. 5. alan için ise

elimizdeki örnek tekrar 1/10 oranında EuroSorb ile dilüe edilerek 1/100 oranında örnek elde edilmiştir.

Şekil 2.2: IFAT'da İnkübasyon tepsi ve substrat pozisyon şeması (*)

Substrate position on the slides:



Name Ord.-no.	Respiration tract profile 1 FI 2821-1002-1 G or M	recommended dilution		Mycarditis profile 1 FI 2825-1002-1 G or M	recommended dilution	
		IgG	IgM		IgG	IgM
Field A	1 RSV	1:10	1:10	Mumps virus	1:10	1:10
2 Adenovirus type 3	Adenovirus type 3					
3 Influenza virus type A (H1N1) ³	Influenza virus type A (H1N1) ³					
4 Influenza virus type A (H3N2)	Influenza virus type A (H3N2)					
Field B	5 Influenza virus type B	1:10	1:10	Influenza virus type B	1:10	1:10
6 Parainfluenza virus type 1	Parainfluenza virus type 1					
7 Parainfluenza virus type 2	Parainfluenza virus type 2					
8 Parainfluenza virus type 3	Mycoplasma pneumoniae					
Field C	9 Parainfluenza virus type 4	1:10	1:10	CMV ¹	1:100	1:100
10 Bordetella pertussis	Coxsackie virus type B1					
11 Bordetella parapertussis	Coxsackie virus type A16					
12 Mycoplasma pneumoniae	Echo virus type 7					
Field D	13 Coxsackie virus type B1	1:100	1:10	Borrelia afzelii	1:100	1:100
14 Coxsackie virus type A7	Borrelia burgdorferi sensu stricto (swiss isolate)					
15 Echo virus type 7	Borrelia garinii					
16 Chlamydia pneumoniae	Chlamydia pneumoniae					
Field E	17 Haemophilus influenzae ^{2,3}	1:100	1:100			
18 Klebsiella pneumoniae ³						
19 Legionella pneumophila serotype 1						
20 Legionella pneumophila serotype 12						

Name Ord.-no.	Infectarthritis profile 1 FI 2826-1002-1 G or M	recommended dilution		Gastrointestinal tract profile 1 FI 2827-1002-1 G or M	recommended dilution	
		IgG	IgM		IgG	IgM
Field A	1 VZV	1:10	1:10	Adenovirus type 3	1:10	1:10
2 Influenza virus type A (H1N1) ³	Yersinia enterocolitica O:3 ³					
3 Influenza virus type A (H3N2)	Yersinia enterocolitica O:6 ³					
4 Influenza virus type B	Yersinia enterocolitica O:9 ³					
Field B	5 Yersinia enterocolitica O:3 ^{2,3}	1:10	1:10	Coxsackie virus type B3	1:100	1:100
6 Yersinia enterocolitica O:6 ^{2,3}	Coxsackie virus type A7					
7 Yersinia enterocolitica O:9 ^{2,3}	Echo virus type 7					
8 Toxoplasma gondii ⁵	Campylobacter jejuni ^{4,5}					
Field C	9 Borrelia afzelii	1:100	1:10	Campylobacter coli ^{2,3}	1:100	1:100
10 Borrelia burgdorferi sensu stricto (swiss isolate)	Helicobacter pylori ¹					
11 Borrelia garinii	Klebsiella pneumoniae ³					
12 Chlamydia trachomatis ⁵	Candida albicans ⁵					

(*) Euroimmun Respiratory Tract Profile Kit dokümanından uyarlanmıştır.

Örnekleri inkübasyon tepsinde aktarma işi bittikten sonra slaytlar çıkartılıp, numaralandırılarak yerleştirilmiştir.

Oda sıcaklığında 30 dk inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonrası slaytlar kaldırılmış ve PBS ile yıkanıp ve şaleler içerisinde PBS'de 5 dk bekletilmiştir.

PBS'den çıkarılan slaytlar hafifçe sıvısı akacak şekilde dik konumda birkaç sn bekletilmiştir.

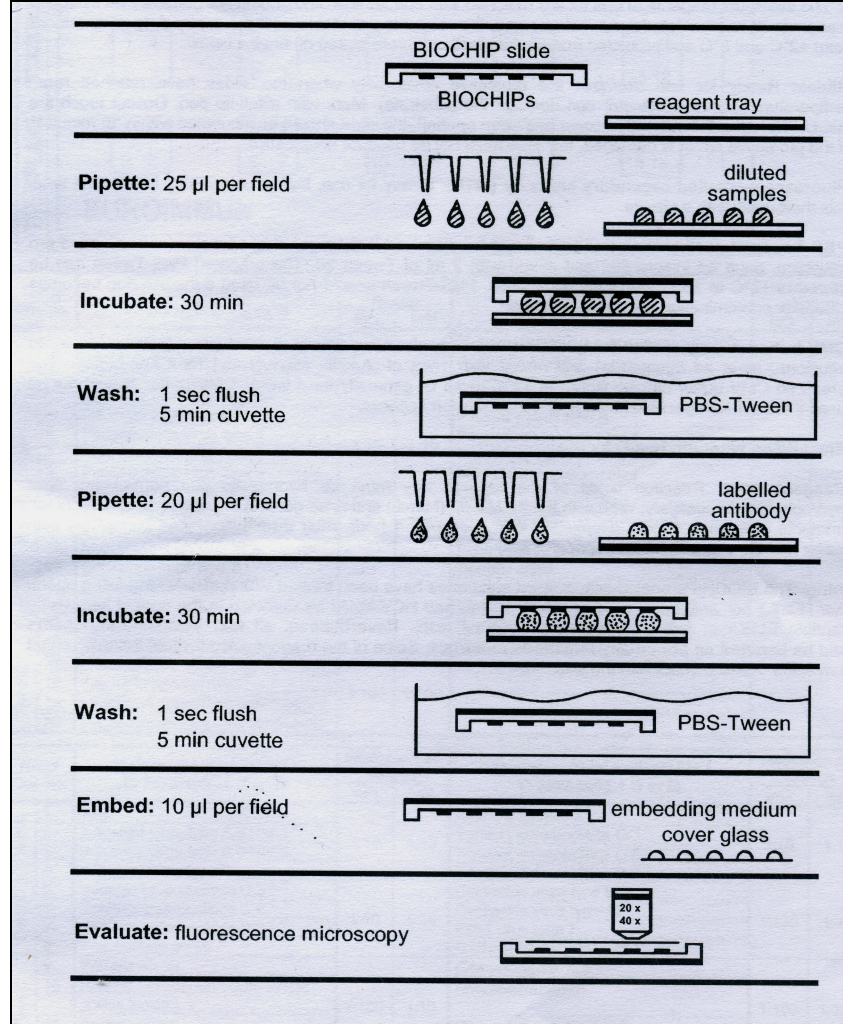
Daha sonra tepsiler içerisinde bulunan alanlara 20'şer µl konjugat eklenmiştir.

30 dk oda ısısında inkübe edilmiştir.

PBS ile yıkama işlemi yapılmıştır.

Mounting medium ile slaytlar üzerine lamel kapatılmıştır (Şekil 2.4.3).

Şekil 2.3: FAT yönteminin işleyiş şeması (*)



(*)Euroimmun Respiratory Tract Profile Kit dokümanından uyarlanmıştır.

Slaytlar Euroimmun'un Almanya'daki merkezine gönderilmiş, Kimyager araştırmacı **Edda Rohwedder** (Euroimmun AG, Lubeck, Almanya) tarafından da incelenmiş, sonuçlarımız doğrulanmıştır.

3. BULGULAR

AKÜ Tıp Fakültesi Uygulama Araştırma Hastanesi ve S.B. Afyonkarahisar Zübeyde Hanım Doğum ve Çocuk Hastanesi'ne bronşit-bronşiolit ön tanısı ile yatırılan 1 ay - 13 yaş arası (ortalama: 16.4 ay \pm 4.5 ay) 22(% 47.8) kız toplam 46 çocuk hastadan alınan kan ve nazofarengial örneklerde solunumsal viruslar ve antikorları alınmıştır. Hastaların yaş ve cinsiyet dağılımları tablo 3.1'de, hastaneye temel yatış semptomları ile FAT ve PCR sonuçları ise Tablo 3.2'de görülmektedir (AdV ve MPV her iki testle de çalışılmadığı için bu tabloya alınmamıştır).

Tablo 3.1 : Örnek alınan hastaların demografik dağılımı.

Yaş Aralığı (ay)	n	%	Cinsiyet			
			Kız		Erkek	
			N	%	n	%
0-6	24	52.2	11	23.9	13	28.3
7-12	8	17.4	5	10.8	3	6.5
13-24	8	17.4	4	8.7	4	8.6
25-36	1	2.2	-	-	1	2.2
37-48	1	2.2	-	-	1	2.2
49-60	2	4.4	1	2.2	1	2.2
61 ve üstü	2	4.4	1	2.2	1	2.2
Toplam	46	100.0	22	47.8	24	52.2

Alınan 46 nazofarengial sürüntü örneğinden 8 tanesi (% 17.4) multiplex PCR yöntemi ile solunumsal viruslar açısından pozitif sonuç vermiştir. Pozitif bulunan 8 hastanın tamamında FluA saptanmış yanı sıra toplam 8 pozitif hastanın 5 tanesinde aynı zamanda hMPV, 3 tanesinde PIV tip3, 1 tanesinde FluB ve 1 tanesinde de RSV pozitif bulunmuştur (Tablo 3. 3).

Tablo 3. 3 : Solunumsal örneklerden Multiplex PCR ile saptanan viruslar.

Solunumsal Viruslar	Pozitif Örnek Sayısı (Hasta Sayısı:46)	
	n	%
FluA	8	17.4
hMPV	5	10.9
PIV(3)	3	6.5
FluB	1	2.2
RSV	1	2.2

Kan örneklerinden 13 tanesi (% 28.3), MPV hariç yedi farklı solunumsal virusa karşı oluşan farklı IgM antikorlarının biri ya da birden fazlası yönünden FAT yöntemi ile pozitif bulunmuştur ($p<0.0001$). Örneklerden 9 tanesinde FluA (H1N1), 8 tanesinde FluA (H3N2), 8 tanesinde FluB, 3 tanesinde PIV ve 2 tanesinde de RSV pozitif bulunmuş, örneklerin hiç birinde Adenovirus pozitifliğine rastlanmamıştır (Tablo 3.4).

Tablo 3.4 : Kan örneklerinde solunumsal viruslara karşı oluşan IgM antikorların FAT ile pozitifliği.

Solunumsal Viruslar	FAT ile Pozitif Örnek Sayısı (n:46)	
	N	%
FluA(H1N1)	9	19.6
FluA(H3N2)	8	17.4
FluB	8	17.4
PIV	3	6.5
RSV	2	4.3
AdV	-	-

Test edilen örneklerin 8 tanesinde FAT ve Multiplex PCR ile pozitif sonuçlar elde edilmiştir. PCR yöntemiyle pozitif sonuç alınıp FAT yöntemi ile negatif sonuç alınan örneğe rastlanmamıştır. Örneklerden 5 tanesi sadece FAT yöntemi ile pozitif bulunmuş, multiplex PCR yöntemi ile negatif sonuç alınmıştır. Her iki yöntemle de negatif sonuç elde edilen örnek sayısına ise 33 olarak saptanmıştır (Tablo 3.5).

Tablo 3.5 : Çocuklardan alınan örneklerde yedi solunumsal virusun FAT ve Multiplex PCR ile saptanan pozitiflik sonuçları.

Multiplex PCR ile pozitif saptanan örnekler	FAT ile pozitif saptanan örnekler		Toplam
	Pozitif	Negatif	
Pozitif	8	-	8
Negatif	5	33	38
Toplam	13	33	46

Çalışmamızda RSV açısından; 1 örnekte her iki yönteminde pozitif sonuç verdiği, PCR ile pozitif sonuç elde edilip FAT ile negatif sonuç elde edilen örnek saptanmadığı, 44 örnekte her iki yönteminde negatif sonuç verdiği ve 1 örnekte ise PCR yöntemi ile negatif sonuç FAT yöntemi ile pozitif sonuç elde edildiği saptanmıştır.

FluA (H1N1) açısından değerlendirildiğinde; 8 örnekte her iki yöntemle de pozitif sonuç elde edildiği, PCR ile pozitif sonuç elde edilip FAT ile negatif sonuç elde edilen örnek saptanmadığı, 37 örnekte her iki yöntemle de negatif sonuç elde edildiği ve 1 örnekte PCR yöntemi ile negatif sonuç elde edilirken FAT yöntemi ile pozitif sonuç elde edildiği tespit edilmiştir.

FluB açısından değerlendirildiğinde; 1 örnekte PCR ve FAT yöntemleri ile pozitif sonuç elde edildiği, PCR yöntemi ile pozitif sonuç elde edilip FAT yöntemi ile negatif sonuç elde edilen örnek saptanmadığı, FAT yöntemi ile pozitif sonuç elde edilip PCR yöntemi ile negatif sonuç elde edilen 7 örnek tespit edildiği, 38 örnekte ise her iki yöntemle de negatif sonuç elde edildiği saptanmıştır.

PIV açısından değerlendirildiğinde; 3 örnekte PCR ve FAT yöntemleri ile pozitif sonuç elde edildiği, PCR yöntemi ile pozitif sonuç elde edilip FAT yöntemi ile negatif sonuç elde edilen ve FAT yöntemi ile pozitif sonuç elde edilip PCR yöntemi

ile negatif sonuç elde edilen örnek saptanmadığı, 43 örnekte ise her iki yöntemle de negatif sonuç elde edildiği saptanmıştır (Tablo 3.6).

Tablo 3.6 : Alınan örneklerde IFAT ve Multiplex PCR ile ortak çalışılan 4 solunumsal virusun sonuçları.

Multiplex PCR/FAT	Pozitif Sonuç Sayısı			
	RSV	FluA (H1N1)	FluB	PIV
+/+	1	8	1	3
+/-	0	0	0	0
-/-	44	37	38	43
-/+	1	1	7	0

Tablo 3.7'de en az bir virus veya 2 ya da daha fazla virus açısından yalnız PCR'da, yalnız FAT'da ve FAT-PCR'da birlikte pozitif elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır.

PCR ve/veya FAT'da pozitif bulunan sonuçların sadece PCR yönteminde pozitif bulunan sonuçlara oranı;

RSV için 1/2 (% 50), FluA için 8/9 (% 88.9), FluB için 1/8 (% 12.5) ve PIV3 için 3/3 (% 100) şeklinde tespit edilmiştir.

Tablo 3.7 : Çocuklardan toplanan 46 solunumsal örnek ve kan numunelerinde yedi solunumsal virus için FAT ve PCR sonuçları

Solunumsal viruslar	Pozitif Örnek sayısı				
	En az bir virus pozitif örnek sayısı			İki yada daha fazla virus pozitif	
	FAT ve PCR	Yalnız FAT	Yalnız PCR	FAT	PCR
RSV	2	2	1	-	-
FluA(H1N1)	9	9	8	7	5
FluA(H3N2)	8	8	-	6	-
FluB	8	8	1	5	-
PIV	3	3	3	-	1
AdV	-	-	PCR da yok	-	PCR da yok
MPV	FAT da yok	FAT da yok	5	FAT da yok	4

4. TARTIŞMA

Üst solunum yolu enfeksiyonlarının en sık (% 90) nedeni viruslardır. Yetişkin yaş grubunda rinovirus başta olmak üzere koronavirus, adenovirus, influenza A/B, parainfluenza virus, respiratuvar sinsityal virus (RSV) üst solunum yolu enfeksiyonları en sık saptanan etkenleridir (89). Hastalık tabloları ise genellikle birbirine benzer bulunur. Ancak konjunktiviti olan bir hastada adenovirus saptanması gibi farklı klinik bulgular belli bazı virusleri akla getirebilir (45).

Bu tablolar içinde influenza epidemilere ve pandemilere neden olması ve yüksek mortalite ile seyreden pulmoner komplikasyonları nedeniyle farklı bir öneme sahiptir. İnfluenza epidemileri özellikle Kuzey Yarımkürede Aralık-Nisan ayları arasında görülür (129). Türkiye’de influenza epidemileri sıklıkla bu aylarda gözlenmektedir. Yapılan; 2002-2003 kış mevsimi influenza virusünün süreyans araştırmasında en çok izolasyonun Ocak ayında alınan örneklerde saptanması, Türkiye’de influenza salgını yaşandığını göstermiştir (130) .

İnfluenza A (H3N2) 2004 yılında Kasım-Mayıs aylarında dünya çapında en sık rapor edilen virus tipi olmuştur. Ancak influenza A (H1N1) ve influenza B virusleri de halen görülmektedir. En sık görülen FluA/H3N2 antijenik yapı A/Fujian/411/02 (H3N2) ve A/Wyoming/03/2003 (H3N2)’dir. Çok az bir kısmında antijenik yapı influenza A; A/New Caledonia/20/99 (H1N1) olarak rapor edilmiştir. İnfluenza B ise iki ayrı antijenik tipte B/Yamagata/16/88 ve B/Victoria/2/87 olarak saptanmıştır(131, 132). Dünyada 2003-2004 influenza mevsimi antijenik tanımlamasında bu çalışmadaki hastalarda saptanan influenza A (H3N2) Panama %10.4 oranında bildirilmiştir (133, 134).

Respiratuvar viral enfeksiyonların tanınması, genellikle klinik ve epidemiyolojik veriler ile konulur. Kesin tanı için hücre kültürlerinde virus izolasyonu veya serolojik testlerle antikorların gösterilmesi gereklidir (135). Ancak bu yöntemlerle aynı örnekten birden fazla sayıda virusün saptanması mümkün olmadığından PCR ve FAT gibi hızlı tanı yöntemleri geliştirilmiştir. Aynı zamanda bu yöntemler daha duyarlı ve özgül sonuçlar vermektedir. Bu sebeplerden dolayı bu yöntemlerin viruslerin rutin tanısında kullanılmasının gerekliliği göz ardı edilmemelidir.

Özacar ve arkadaşları 2003 yılında yaptıkları bir çalışmada; klinik laboratuvarlarda viruslerin saptanmasında kullanılan yöntemlerden hücre kültürü,

antijen saptama yöntemleri ve nükleik asit testlerini araştırmışlardır. Yeni moleküler biyolojik yöntemler daha önce kültürü yapamayan birçok enfeksiyon etkeninin tanısına olanak sağlamıştır. Moleküler tekniklerin otomasyonu ile test süresinin kısalması, kantitasyon, kalite kontrolü ve maliyetin azalması sağlanabilir. Bu yöntemlerin hastalık tanısında etkin yaklaşımlar için uygun şekilde nasıl kullanılabileceği konusunda değerlendirilmesinin önemini vurgulamışlardır (136).

Çelikbaş ve ark.larının 2005 yılında 22 klinik örnekten alınan boğaz çalkantı suyu ile yaptıkları çalışmada; örneklerden 9'unda (% 40.9) virus izole etmişlerdir. Bu örneklerin 4 tanesinde RSV (% 18), 3 tanesinde AdV (% 13.6), 1 tanesinde FluA (% 4.5) ve 1 tanesinde Flu B (% 4.5) saptadıklarını bildirmişlerdir (137). Çalışmada FluA ve FluB açısından pozitiflik oranı bu çalışmaya göre daha düşük gözlenmiştir.

Çiçek ve ark.ların 2003 yılında 50 klinik örnekten alınan nazofarengial sürüntü örnekleri ile yaptıkları çalışmada indirek floresan antikor ve shell vial hücre kültürü yöntemlerini kullanmışlar, örneklerden 18 (% 36) solunum virusu izole etmişlerdir. En sık adenovirus (% 12) ve parainfluenza virus (% 12) izole edildiğini bildirmişlerdir (138). Çalışmanın sonuçları da bu çalışmadaki FAT sonuçları ile çok uyumlu bulunmamıştır. Bu çalışmada IFAT ile FluA ve FluB'de pozitiflik saptanmış olup AdV'de pozitiflik saptanmamıştır. PIV açısından da yapılan çalışmaya göre pozitiflik oranı yüksek bulunmuştur.

Kaygusuz ve ark.larının 2004 yılında sınırlı sayıda hasta ile yaptıkları bir çalışmada 3 hastada influenza virusü saptanmıştır. (139). Türkiye'de yapılan bir çalışmada yetişkin hastalardan üst solunum yolu enfeksiyonlarında en sık influenza A ve adenovirusün etken olarak görüldüğü bildirilmektedir Yapılan bu çalışmada yetişkin ve çocuk yaş grubunda, influenza A seropozitifliği % 82.6 ve % 65.9 olarak bulunmuştur (140).

Liolios ve ark.larının 126 klinik örnekten alınan 50 nazofarengial aspirat ve 93 bronkoalveolar lavaj (BAL) ile yaptıkları karşılaştırmalı çalışmada Multiplex Reverse Transcription-PCR Enzym Hibridization Assay (RT-PCR-EHA; Hexaplex; Prodesse Inc.) ile IFAT (VRK; Bartels, Issaguah, Wash.) ve viral kültür (VC) karşılaştırılmıştır. Çalışmada RT-PCR EHA ile 143 örnekten 17 pozitif (% 11.9), IFAT ve viral kültür ile 8 pozitif (% 5.6) sonuç bulunmuştur. Bu çalışmada ise PCR ile FAT'a nazaran daha az oranda pozitif sonuç bulunmuştur.

PCR/IFA-VC açısından karşılaştırmalı olarak hazırlanan tabloda: her iki yöntemde de pozitif olarak saptanan sonuçlar; 6 Flu A, 1 Flu B ve 1 RSV olarak, PCR pozitif IFA-VC negatif olarak saptanan sonuçlar; 1 H-PIV-3, 7 İnf A, 1 İnf B olarak, her iki yöntemde de negatif olarak saptanan sonuçlar; 143 HPIV-1 ve H-PIV-2, 142 H-PIV-3 ve RSV, 130 İnf A ve 141 İnf B olarak bildirilmiştir. PCR negatif, IFA-VC pozitif sonuca rastlanmamıştır. Bu çalışmada da her iki yöntemle de pozitif bulunan sonuçlar 8 FluA, 1 FluB, 1 RSV ve 3 PIV olarak tespit edilmiştir.

Çalışmanın sonucunda RT-PCR EHA'in IFAT ve VC'e göre daha özgül ve duyarlı olduğu belirtilmiştir. Ayrıca hızlı tanı açısından değerlendirildiğinde hem epidemiyolojik çalışmalarda hem de tedavi ve nozokomiyal yayılımı önlemek açısından RT-PCR EHA'in tercih edilebilir olduğu saptanmıştır (141).

Kuypers ve ark.lar> Ekim 2003 ve Eylül 2004 tarihleri arasında topladıkları 1138 örnekle RT-PCR (Qiagen Inc., Valencia, CA) ve FAT (Chemicon, Temecula, CA) ile çocuklardaki solunumsal virus enfeksiyonlarının tanısı hakkında bir çalışma yapmışlardır. Çalışmada 1074 burun yıkama sıvısı, 14 burun sürüntüsü, 44 trakeal aspirat ve 6 bronkoalveolar lavaj (BAL) örneği kullanmışlardır. Örnekler Washington Üniversitesi Viroloji Laboratuvarı'nda çalışılmıştır. FAT ve RT-PCR ile RSV, FluA, PIV tip 1, 2 ve 3, hMPV ve AdV araştırılmıştır. En az bir virus açısından FAT ile 436 (% 38.3), RT-PCR ile 608 (% 53.4) örnek taranmıştır. FAT için yetersiz görülen 52 (% 4.6) örnekten 13 tanesi PCR ile pozitif sonuç vermiştir. Sadece PCR ile pozitif saptanan örneklerin FAT ve/veya PCR ile pozitif saptananlara oranı RSV için 18/257 (% 7), FluA için 18/134 (% 13.4), PIV Tip 1 için 25/39 (% 64.1), PIV Tip 2 için 8/9 (% 88.8), PIV Tip 3 için 17/55 (% 30.9) ve AdV için 101/132 (% 76.5) olarak tespit edilmiştir. hMPV sadece PCR ile çalışılmış olup 75 (% 12.3) pozitif sonuç bulunmuştur. Çalışmanın sonucuna göre düşük sayıda viral nükleik asit kopyası bulunan örneklerde tanıda FAT'ın yetersiz olduğu saptanmıştır. FAT ile viral yükü 10^6 kopya/ml'nin altındaki örneklerde saptama oranının % 19 olduğu tespit edilmiştir. PCR'ın FAT'a nazaran daha özgül ve duyarlı (özellikle PIV ve AdV açısından) olduğu sonucuna ve solunumsal viruslerin tanısında PCR'ın önde gelen bir teknik olması gerektiği kanısına varılmıştır (142). Bu çalışmada da PCR ve/veya FAT'da pozitif bulunan sonuçların sadece PCR yönteminde pozitif bulunan sonuçlara oranı; RSV için 1/2 (% 50), FluA için 8/9 (% 88.9), FluB için 1/8 (% 12.5) ve PIV3 için 3/3 (% 100) şeklinde tespit edilmiştir.

Coyle ve ark.lar› 18 aylık dönemde topladıkları 222 örnekle yaptıkları çalışmada FAT ile Nested-PCR'› solunumsal viral hastalıkların tan›s› aç›s›ndan karşılaştırmışlardır. Örnekler arasında BAL, nazofarengial salgılar, nazal sürüntü örnekleri ve postmortem akciğer dokuları bulunmaktadır. Tarama sonucunda bulunan 99 virus 79 örnekten ve 4 kontrol örneğinden elde edilmiştir. Toplamda da PCR ile 99 (% 44.5) , FAT ile 31(%14) pozitif sonuç saptanmıştır.

PCR sonuçlarına göre 21 FluA, 2 FluB, 39 Rinovirus, 22 AdV, 1 PIV tip 2, 10 PIV tip 3 ve 4 RSV tespit edilmiştir. FAT sonuçlarına göre ise; 15 FluA, 1 FluB, 3 Rinovirus, 8 PIV tip 3 ve 4 RSV tespit edilmiştir. FAT ile 4-12 saatte, PCR ile 24 saatte sonuç alınabildiği saptanmıştır. PCR ile alınan sonuçlara bakıldığında çok sayıda virüsün rutin taraması için uygun bir yöntem olduğu kanısına varılmıştır (143). Yapılan çalışmada PCR ile bulunan pozitif sonuç oranı bu çalışmaya göre daha yüksek, FAT ile pozitif bulunan sonuç oran› ise daha düşüktür.

Erdman ve ark.lar› Nashville'deki 3 hastaneden, Rochester(New York)'taki 2 hastaneden ve Montevideo(Uruguay)'daki 1 hastaneden 5 yaşın altındaki 462 çocuk hastadan topladıkları 470 örnekle (405 nazal swab/boğaz sürüntüsü, 65 nazofarengial aspirat) yaptıkları çalışmada GeneScan RT-PCR (Promega Corp. Madison, Wis.) ile yaygın 6 solunumsal virüsün taramasını yapmışlardır. Çalışma akut solunum hastalığı semptomları olan çocuk hastalar üzerinde yapılmıştır. Çalışmada kültür ve FAT ile karşılaştırma da yapılmıştır. Sonuçlara göre 470 örnekten 93 (% 19.8) örnekte 6 solunumsal virüsten bir tanesi pozitif bulunmuştur. Kültür pozitif bulunan örnek sayısı 65 olarak belirlenmiş; bunlardan 44 tanesi RSV, 2 tanesi PIV tip 2, 8 tanesi PIV tip 3, 4 tanesi FluA ve 10 tanesi FluB olarak tespit edilmiştir. FAT ile taranan 65 örnekten 25'inde (% 38.5) RSV pozitif bulunmuştur. FAT ve kültür ile pozitif sonuç elde edilen 93 örnekten 86'sı (% 92) PCR ile pozitif olarak saptanmıştır. PCR negatif olan 3 RSV, 3 PIV tip 3 ve 1 FluA kültür pozitif sonuç vermiştir. Sonuç olarak GeneScan RT-PCR'ın çocuk hastalardaki yaygın solunumsal virüslerle oluşan enfeksiyonların tanısında yüksek duyarlılığı ve özgüllüğü nedeniyle kullanılabileceği kanısına varılmıştır (144). Bu çalışmada da FAT ile PCR'dan daha fazla oranda pozitif sonuç tespit edilmiştir. Bu açıdan bu çalışmayla uyum göstermektedir.

Kehl ve ark.lar› Wisconsin Çocuk Hastanesi'nden Aralık 1997- Mayıs 1998 tarihleri arasında topladıkları 363 solunumsal örnekten (324 nazofarengial sürüntü, 18 BAL, 12 boğaz sürüntüsü ve 9 endotrakeal aspirat) üzerinde Multiplex RT-PCR

(Hexaplex, Prodesse Inc., Milwaukee, Wis.) ile PIV tip 1, 2 ve 3, RSV A ve B, FluA ve FluB viruslerini taramışlardır. Bunun yanında RSV için (Directigen; Becton and Dickinson Inc., Cockeysville, Md.) ve FluA için (Abbott Test Pack; Abbott Laboratories, Abbott Park, Ill.) EIA ve viral kültür çalışmışlardır. Bu çalışmadaki karşılaştırmada birden fazla virusün etken olduğu enfeksiyonların tespitinde viral kültür ve PCR karşılaştırılmıştır. Karşılaştırmaya göre viral kültür ile tek virusün pozitif saptandığı veya negatif sonuçlar elde edilen 15 örnekte PCR ile en az iki virusün pozitif saptandığı görülmüştür.

İkinci karşılaştırma ise PCR, kültür ve Rapid EIA arasında pozitiflik negatiflik oranına göre yapılmıştır. Bu karşılaştırmada; PCR yöntemi ile özellikle PIV açısından diğer yöntemlere göre çok fazla oranda pozitiflik saptanmıştır ve bu sonuçların yalancı pozitiflik olduğu kanısına varılmıştır. Diğer virusler açısından da viral kültür ve Rapid EIA'sına göre PCR ile daha fazla pozitif sonuç elde edilmiştir.

Sonuç olarak Hexaplex'in viral kültür ve Rapid EIA'a nazaran daha özgül ve duyarlı olduğu tespit edilmiştir. PCR'ın hızlı sonuç vermesinden ve birden fazla virusü aynı numunedan saptayabilmesinden dolayı Hexaplex'in kullanımı respiratuvar viral patojenlerin tanısında gerekliliğini ortaya koymuştur (145).

Van de Pol ve ark.ları Aralık 2004-Mayıs 2005 tarihleri arasında Wilhelmina Çocuk Hastanesi'nde alt solunum yolu hastalığı olan 23 yoğun bakım hastasından aldıkları solunumsal örneklerle yaptıkları çalışmada RT-PCR (Applied Biosystems, Fostercity, CA., USA) ile FAT (DaKo, Glostrup, Denmark) ve viral kültür (LLC-MK2, RD, R-HeLa ve HEP-2C hücrelerinde) arasında karşılaştırma yapmışlardır. Çalışmada 23 örnekte PCR ile 22 örnekte FAT ile ve 21 örnekte kültür ile virus taraması yapılmıştır.

PCR ile 33, FAT ile 11, viral kültür ile 6 pozitif sonuç elde edilmiştir. Sadece PIV tip 1/3'te viral kültür ve FAT ile negatif sonuç alınan bir örnekte PCR ile pozitif sonuç elde edilmiştir. PCR ile AdV, Rinovirus, Flu A ve Flu B ve RSV A/B'de viral kültür ve FAT'a nazaran daha fazla sayıda pozitif sonuç tespit edilmiştir. hMPV ve Koronavirüs OC43, 229E, NL63 viral kültür ve FAT ile taranmamış, sadece PCR ile taranmıştır. PCR ile 1 hMPV ve 3 Koronavirüs pozitif saptanmıştır. Bulunan sonuçlar hMPV hariç diğer bütün virüslerde bu çalışmada bulunan pozitif sonuçlara göre daha yüksek olarak tespit edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada koronavirüs çalışılmamıştır.

Sonuç olarak RT-PCR'ın alt solunum yolu hastalığı olan yoğun bakım hastalarında respiratuvar viruslerin tanısında oldukça duyarlı olduğu belirtilmiştir. Ayrıca çalışmada viral kültür ve FAT ile multiple viral bir enfeksiyon tespit edilemezken, PCR ile tespit edilen pozitif sonuçların % 35'i mix viral enfeksiyonu işaret etmektedir. RT-PCR'ın respiratuvar viral patojenlerin hızlı tanıma vermesi sonucunda hastalığın tespitine ve tedavisine büyük oranda rehberlik edeceği kanısına varılmıştır (146).

Herrmann ve ark.ları, FluA ve FluB'nin Nested RT-PCR, viral kültür, FAT ve Optical İmmunoassay yöntemleri ile tanısını karşılaştıran bir çalışma yapmışlardır. Çalışmada numune olarak 268 nazofarengial aspirat ile 79 nazofarengial sürüntü örneği kullanılmıştır. Hastaların yaş aralığı 2 ay-83 yaş olarak bildirilmiştir. Çalışmada hazırlanan karşılaştırmalı tabloda, toplamda 37 örnekte FluA ve FluB tespit edilmiştir. Bunlardan 30 tanesi FluA ve 7 tanesi FluB'dir. FAT ve kültürün negatif PCR'ın pozitif tespit ettiği 13 tane FluA ve 3 tane FluB saptanmıştır. Bu çalışmaya nazaran pozitiflik oranı bu çalışmada daha düşüktür. Bunun sebebinin örnek alınan hastaların yaş aralığının oldukça geniş olması, yetişkin ve yaşlı hastalardan da örnek alınması olduğu düşünülmektedir.

Sonuç olarak FluA ve FluB'nin tanısında RT-PCR'ın duyarlı ve özgül bir yöntem olduğu kanısına varılmıştır (147).

Hollanda'da 2001 yılında yapılan bir çalışmada 321 alt solunum yolu enfeksiyonlu çocuktan alınan 248 nazofarengial aspiratlardan RT-PCR kullanılarak RSV, İnfluenzavirus A-B, Parainfluenza 1-4, Adenovirus, Rinovirus, Koronavirüs saptanamayan örneklerin 49'unda (% 20) metapnömovirüs tespit edilmiştir (Tablo 4.1) (106).

Tablo 4.1: hMPV'nin farklı çalışmalardaki pozitiflik oranları (106).

Tarih	Ülke	Çalışılan Örnek	Hastalık	Örnek Tipi	MPV	Kullanılan Yöntem
2000	Avustralya	200	//	NFA	3 (%1.5)	RT-PCR
2001	Hollanda	248	ASYE	NFA	49 (%20)	RT-PCR
1999/02	Danimarka	374	//	NFA	11 (%2.9)	RT-PCR
2002/03	Norveç	236	//	//	50 (%21)	İFAT
2003	Japonya	377	//	NFA	77 (%20)	RT-PCR
2004	İspanya	200	//	NFW	18 (%9)	RT-PCR
2004	Almanya	3.369	//	//	606(%18)	RT-PCR
2004	USA	668	//	//	54 (%8.1)	İFAT
2005	İtalya	1.505	//	NF swab	42 (%2.8)	RT-PCR

NFA: Nazofarengial aspirat

NFW: nazofarengial yıkama

Bonroy ve ark.ların Kasım 2003-Mayıs 2004 ve Kasım 2004-Mayıs 2005 tarihleri arasında Onze Lieve Vrouw Hastanesi'nden akut solunum yolu enfeksiyonu semptomları gösteren 5 yaşın altındaki çocuklardan topladıkları 778 nazofarengial aspirat örneği ile yaptıkları çalışmada RT-PCR ile hMPV ve hRSV taraması yapmışlardır. Çalışmada 778 örnekten 306'sı (% 39,2) hRSV pozitif ve 54'ü (% 6,9) hMPV pozitif bulunmuştur. Bizim çalışmamızda bu çalışmaya göre hRSV açısından daha düşük, hMPV açısından daha yüksek oranda pozitiflik bulunmuştur.

Çalışmanın sonucuna göre PCR'm hızlı ve özgül bir tanı testi olduğuna ve birden fazla virusün aynı örnekten saptanmasının birden fazla virusün sebep olduğu enfeksiyonların tanısında büyük kolaylık sağladığı bildirilmiştir (148).

Syrmis ve ark, Aralık 2000- Eylül 2001 tarihleri arasında, Royal Çocuk Hastanesi'nde akut solunumsal hastalık semptomları gösteren 10 ay- 15 yaş arası 598 çocuk hastadan topladıkları nazofarengial aspirat örneklerinde Multiplex Reverse-Transcriptase PCR Enzym Linked Amplicon Hybridization Assay (m-RT-PCR-ELAHA), direk floresan antikor (DFA) ve Culture Augmented- Direct Florescent Antibody (CA-DFA) yöntemleri ile AdV, FluA, FluB, PIV 1,2 ve 3 ve RSV viruslerini taramışlardır (149).

Çalışma sonunda sırası ile DFA, DFA/CA-DFA ve m-RT-PCR-ELAHA yöntemleri ile elde edilen pozitif sonuçlar; AdV aç>s›ndan 11-14-17, FluA aç>s›ndan 5-9-14, FluB aç>s›ndan 2-2-2, PIV1 aç>s›ndan 1-5-6, PIV2 aç>s›ndan 5-6-7, PIV3 aç>s›ndan 29-29-33, RSV aç>s›ndan 108-114-123 ve elde edilen toplam pozitif sonuçlar aç>s›ndan 161-179-202 olarak bildirilmiştir. Bu çalışmayla karşılaştırıldığında PCR ile pozitif bulunan sonuçların FAT ile pozitif bulunan sonuçlara oran› aç>s›ndan uyum göstermemektedir.

Sonuç olarak m-RT-PCR-ELAHA yönteminin DFA ve CA-DFA yöntemlerine göre daha özgül ve duyarlı olduğu, aynı zamanda daha ucuz maliyeti olan bir yöntem olduğu bildirilmiştir. m-RT-PCR-ELAHA yönteminin yayg›n yedi solunumsal virüsün tanısında etkin bir yöntem olduğu kanısına varılmıştır (149).

Yılmaz ve ark.lar› akut alt solunum yolu enfeksiyonu geçiren küçük çocuklarda viral etkenleri saptamak amacı ile bir çalışma yapmışlardır. Klinik olarak akut alt solunum yolu enfeksiyonu tanısı konulan iki yaşından ufak çocuklarda ilk çalışma döneminde (Nisan 1994-1995) Respiratory Syncytial Virus (RSV), influenza A ve B, adenovirus ve parainfluenza virus antijenleri İmmünofloresans (IF) yöntemi ile nazofaringiyal aspiratta araştırılmıştır. İkinci çalışma döneminde (Kasım 1995-Nisan 1996) tarihleri arasında sadece RSV antijeni araştırılmış ve IF ile RSV altgrup saptaması yapılmıştır. İlk dönemde incelenen 188 hastanın 69 (%36.7)'unda viral antijen saptanmıştır. Toplam 188 hastanın 166 (% 88.9)'sının 11. ay ile 4. ay arasındaki kış döneminde geldiği ve 166 örnekten 68 (%41)'inde viral antijen bulunduğu görülmüştür. Örneklerden 65 (%39.2)'inde RSV, altısında (%3.6) adenovirus, ikisinde (% 1.2) parainfluenza ve dördünde (%2.4) influenza virüsü saptanmıştır. Sekiz örnekte mikst enfeksiyon belirlenmiştir (%4.8). ikinci dönemde 113 hasta incelenmiş ve 39 (%35)'unda RSV saptanmıştır. Yirmisekiz hastada RSV altgrup saptaması yapılmış; 18'inde RSV altgrup A (% 64)'nın etken olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak, akut alt solunum yolu enfeksiyonlu iki yaşından küçük çocuklarda RSV'nin en sık karşılaşılan viral etken olduğu görülmüştür (150). Yapılan çalışmada IF ile pozitif bulunan sonuçlar bu çalışmanın sonuçları ile pozitif saptanan virüsler açısından uyum göstermemektedir. Çalışmada bütün deneklerin 2 yaşın altında olmasının ve ikinci çalışmada sadece RSV çalışılmasının bu virüsün yüksek oranda pozitif olarak saptanmasında etken olduğu düşünülmektedir.

Yarkın ve ark.ler› alt solunum yolu enfeksiyonları olan çocuklarda solunum yollarında enfeksiyon oluşturabilen virüslere karşı antikor cevab›nın prevalans› ile

seropozitivite ve risk faktörleri arasındaki ilişkiyi değerlendirmek amacıyla yaptıkları çalışmada 5 yaşın altında toplam 81 çocuktan örnek almışlardır. Çocukların % 30.8'inde bir akut viral enfeksiyona işaret sayılabilecek spesifik IgM cevapı tespit edilmiştir. Solunum sinsityal virus'a (RSV) karşı gelişen IgM antikorları alt solunum yolu enfeksiyonlarının (ASYE) kliniği ile birlikte en sık rastlanan (% 24.7) antikor cevapı olduğu tespit edilmiştir. Bunu sırasıyla İnfluenza B (% 9.9), Parainfluenza virus (PIV tip I-III) (% 8.6), İnfluenza A (% 2.4) ve Adenovirus (% 2.4) anti-IgM antikor beraberliğinin izlediği belirtilmiştir. Çalışma grubunda antiviral antikor taşıyıcılığının malnutrisyonlu çocukların % 50'sinde, anne sütüyle yetersiz beslenenlerin % 40'nda, kalabalık aileden gelen çocukların % 53.8'inde görülmesi bu faktörlerin ASYE'nda viral etyolojide ve morbiditede de önemli olduğunu kanısına varılmıştır (151). Çalışmada örnek alınan hastaların yaş grubu, bu çalışma ile benzerlik göstermekle beraber; pozitif saptanan virus oranları açısından uyum göstermemektedir.

Yamazhan ve arkadaşları solunum sistemi hastalarının önemli etkenlerinden olan solunum sinsityal virüsü, adenovirüs ve parainfluenza virüslerinin İzmir ilinde ve çevresinde dağılımı ve sıklığı araştırmışlardır. Bu amaçla 1995-96 kış mevsiminde influenza benzeri hastalık tablosu gösteren, 131'i çocuk ve 56'sı erişkin olmak üzere toplam 187 hastanın nazofaringeal sürüntü örnekleri alınmıştır. Alınan örnekler, solunum sinsityal virüsü (RSV) ve adenovirüs izolasyonu için Hep-2 hücrelerine, parainfluenza virüsü izolasyonu için ise Madine-Darby Bovine Kidney (MDBK) hücreleri üzerine inoküle edilmiştir. Tüpler 15 gün boyunca güneşli, sitopatik etki yönünden araştırılmış, ayrıca parainfluenza virüslerinin tanısı için yine güneşli olmak üzere hemagglütinasyon testi yapılmıştır. Sitopatik etki gözlenen ve/veya hemagglütinasyon olumlu olan örnekler, floresein ile işaretli monoklonal antikorlar kullanılarak boyanmış ve floresein mikroskopta incelenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda, 6 çocuk hastadan RSV, beşi erişkin olmak üzere 7 hastadan adenovirüs, 2 çocuk hastadan ise parainfluenza virüsü tip 1 ve tip 2 izole edilmiştir. Sonuç olarak toplam 187 örneğin 15'inde (%8) viral bir solunum yolu patojeni saptanmıştır (152). Çalışmada pozitif bulunan virüsler, bu çalışma ile uyum göstermemektedir. Bu çalışmada daha yüksek oranlarda pozitiflik elde edilmiştir. Bu çalışmada FluA, FluB, hMPV'un da araştırılmasının pozitiflik oranını etkilediği düşünülmüştür.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

5.1. Sonuç

1. Bu çalışmada solunumsal viral patojenlerin tanısında FAT ve Multiplex RT-PCR yöntemleri kullanılmış, FAT ile PCR yöntemine göre daha fazla oranda pozitif sonuç saptanmıştır.

2. Bu sonuçlar literatürde bildirilen sonuçlarla uyumsuz gibi durmakla beraber bu çalışmada FAT ile kandan IgM çalışılmıştır. Diğer araştırmalarda ise IFAT ile viral antijen incelenmesi yapılmıştır. Bu açıdan çalışma yaygın yapılan araştırmalardan farklı kurgulanmış ve sonuçları da orjinal bulunmuştur. Akut enfeksiyonun klinik tanısının desteklenmesinde laboratuvar tanısının iki farklı yöntemle çalışılmıştır.

3. Ayrıca FAT'da FluA-H1N1 ve FluA-H3N2'nin ayrı ayrı taranmasının, influenza tanısını desteklemede şansı artırmış olabileceği kanısına varılmıştır.

4. PCR ile bulunan pozitiflik oranının FAT ile bulunan pozitiflik oranına göre düşük olması, örneklerin viral etkenlerin kaybolmaya başladığı konvalesan dönemde alınmış olabileceğini akla getirmektedir. PCR pozitif sonuçlar örnekten direkt olarak tanının virüsü araştırdığı için hastalığın inkubasyon ve akut evresinde; FAT pozitif sonuçlar ise kandan IgM araştırdığı için hastalığın akut safha ve bu safhadan konvalesan döneme geçiş arasında örnek alındığını göstermektedir.

5.2. Öneriler

1. Multiplex PCR ve FAT yöntemlerinin her ikisinin de çocuklarda respiratuvar viral patojenlerden kaynaklanan solunum yolu enfeksiyonlarının tanısında oldukça hızlı ve güvenilir yöntemler olduğu anlaşılmaktadır. Multiplex PCR ve FAT gibi hızlı yöntemlerinin hücre kültürü gibi standart laboratuvar yöntemlerine göre daha kısa sürede ve daha spesifik sonuç vermesi, PCR ve FAT yöntemlerinin rutin uygulamada kullanılmasının gerekliliğini düşündürmektedir.

2. Antiviral tedavi, hasta gözlemi ve takibinde sağlayacağı kolaylıklar ve hastane masraflarının azaltılması açısından hızlı tanı yöntemlerinden yararlanılmış olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Gröndahl B., Puppe W., Hoppe A., Kühne I., Weigl J. A. I., Schmitt H. J., (1999) Rapid Identification of Nine Microorganisms Causing Acute Respiratory Tract Infections by Single-Tube Multiplex RT-PCR: Feasibility Study. *J of Cli. Microbiology*, **37** (1), 1-7.
2. Irmek K. E., Kelleher J.J., (2000) Use of Monoclonal Antibodies for Rapid Diagnosis of Respiratory Viruses in a Community Hospital. *Clinical and Diagnostic Lab. Immunology*, 396-403.
3. Özaçar T., (2003) Moleküler Biyolojik Yöntemlerin Virolojide Hızlı Tanı ve İdentifikasyon Amaçlı Kullanılması. *Klinik Laboratuvar Dergisi*, **2** (1), 18-21.
4. Shek L. P., Lee B. W., (2003) Epidemiology and seasonality of respiratory tract virus infections in the tropics. *Paediatr Respir Rev* **4**, 105–111.
5. <http://www.medscape.com/viewarticle/498439>
6. White O. D., Fener F.J., (2000) Doymaz M.Z., (Çeviri editörü) Solunum Kanalına Viral Hastalıklar. *Medikal Viroloji*, 564-568.
7. <http://www.tip.deu.edu.tr>
8. Monto, A., Ohmit S. E., Margulies J. R., and Talsma A., (1995) Medical practice-based influenza surveillance: viral prevalence and assessment of morbidity. *Am. J. Epidemiol.* **141**, 502–506.
9. Lamb, R. A., and Krug R. M.. In Knipe D. M. and Howley P. M. (ed.), (2001) Orthomyxoviridae. *Fields virology*, 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa. 1487-1531.
10. Glezen W. P., Cherry J., (2004) Fields B. N., Knipe D. M., Howley P. M. (ed). İnfluenza viruses. *Fields Virology*, 5. baskı Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1688-1704.
11. Coleman J. R., (2007) The PB1-F2 Protein of Influenza A virus: increasing pathogenicity by disrupting alveolar macrophages. *Virology Journal*, **15**, 4-9.
12. Thompson C. I., Barclay W. S., Zambon M. C., Pickles R. J., (2006) İnfection of Human Airway Epithelium by Human and Avian Strains of Influenza A Virus. *Journal of Virology*, **80**(16), 8060-8068.
13. Nayak D. P., Reichl U., (2004) Neuraminidase activity assays for monitoring MDCK cell culture derived influenza virus. *J Virol Methods.* **122**(1), 9-15.

14. Hughes M. T., Matrosovich M., Rodgers M. E., (2000) Influenza A Viruses Lacking Sialidase Activity Can Undergo Multiple Cycles of Replication in Cell Culture, Eggs, or Mice. *J of Virology*, **74(11)**, 5206-12.
15. Glezen W. P., Couch R. B., Ewans A. S., (ed) (1991) Influenza Viruses. *Viral Infections of Human: Epidemiology and Control*, **3**,419-49.
16. Wang S., Taaffe J., Parker C., et al. (2006) Hemagglutinin (HA) Proteins from H1 and H3 Serotypes of Influenza A Viruses Require Different Antigen Designs for the Induction of Optimal Protective Antibody Responses as Studied by Codon-Optimized HA DNA Vaccines. *J of Virology*, **80(23)**, 11628-37.
17. Shinya K., Fujii Y., Ito H., Ito T., Kawaoka Y., (2004) Characterization of a Neurominidase-Deficient Influenza A Virus as a Potential Gene Delivery Vector and a Live Vaccine. *J of Virology*, **78(6)**, 3083-88.
18. Webster R. G., Bean W. J., Gorman O. T., Chambers T. M., Kawaoka Y., (1992) Evolution and Ecology of Influenza A Viruses. *Microbiological Reviews*, **56(1)**, 152-79.
19. Heikkinen T., Marttilla J., Salmi A. A., Ruuskanen O., (2002) Nasal Swab versus Nasopharyngeal Aspirate for Isolation of Respiratory Viruses. *J Clin Microbiol*, **40(11)**, 4337-39.
20. Rowe T., Abernathy R. A., Hu-Primmer J., et al. (1999) Detection of Antibody to Avian Influenza A (H5N1) Virus in Human Serum by Using a Combination of Serologic Assays, *J Clin Microbiol*, **37(4)**, 937-43.
21. Takimoto S., Grandien M., Ishida M. A., et al.(1991) Comparison of Enzyme-Linked Immunabsorbent Assay, Indirect Immunofluorescence Assay, and Virus Isolation for Detection of Respiratory Viruses in Nasopharyngeal Secretions, *J Clin Microbiol*, **29(3)**, 470-74.
22. Alymova I. V., Kodihalli S., Govorkova E. A., Fanget B, Gerdil C., Webster R. C., (1998) Immunogenicity and Protective Efficacy in Mice of Influenza B Virus Vaccines Grown in Mammalian Cells or Embryonated Chicken Eggs, *J of Virol.*, **72(5)**, 4472-77.
23. Ruest A., Michaud S., Deslandes S., Frost E. H., (2003) Comparison of the

- Directigen Flu A+B test, the QuickVue Influenza Test, and Clinical Case Definition to Viral Culture and Reverse Transcription PCR for Rapid Diagnosis of Influenza Virus Infection. *J Clin Microbiol*, **41(8)**, 3487-93.
24. Li J., Chen S., Evans D. H., (2001) Typing and Subtyping Influenza Virus Using DNA Microarrays and Multiplex RT-PCR. *J Clin. Microbiol.* **39(2)**, 696-704.
25. Colizza V., Barrat A., Barthelemy M., Valleron A. J., Vespignani A., (2007) Modelling the Worldwide Spread of Pandemic Influenza: Baseline Case and Containment Interventions. *PLOS Med.*, **4(1)**, 95-110.
26. Shaw M. W., Arden N. H., Maassab H. F., (1992) New Aspects of Influenza Viruses. *Clin. Microbiol. Rev.*, **5(1)**, 74-92.
27. Kilbourne E. D., Johansson B. E., Grajower B., (1990) Independent and Dşparate Evolution in Nature of Influenza Virus Hemagglutinin and Neurominidase Glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87(2)**, 786-90.
28. Air G. M., Gibbs A. J., Laver W. G., Webster R. G., (1990) Evolutionary Changes in Influenza B are not Primarily Governed by Antibody Selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87(10)**, 3884-88.
29. Voeten J. T., Bestebroer T. M., (2000) Antigenic Drift in the Influenza A Virus (H3N2) Nucleoprotein and Escape from Recognition by Cytotoxic T Lymphocytes. *J. Virol.* **74(15)**, 6800-07.
30. Çavdar C., Sifil A., Çamsan A., (1999) İnfluenza İnfeksiyonu ve İnfluenzadan Korunma. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi*, **3**,100-107.
31. Khayyam O., (2004) H5N1 Avian Flu, Cybermed update August 2004. <http://www.wadscorner.com/internet64.html>.
32. http://www.DSÖ.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2007_06_06/en/index.html
33. Jones J. C., Turpin E. A., (2006) Inhibition of Influenza Virus Infection by a Novel Antiviral Peptide That Targets Viral Attachment to Cells. *J Virol.*, **80(24)**, 11960-67.
34. Lipsitch M., Cohen T., Murray M., Levin B. R., (2007) Antiviral resistance and the Control of Pandemic Influenza. *PLOS Med.*, **4 (1)**, 111-121.

35. Schrenzel M., Oaks J. L., Rotstein D., et al., (2005) Characterization of a New Species of Adenovirus in Falcons. *J. Clin. Microbiol.*, **43(7)**, 3402-13.
36. Krajden M., Brown M., Petrasek A., Middleton P. J., (1990) Clinical Features of Adenovirus Enteritis: A Review of 127 Cases. *Journal of Pediatric Infectious Diseases*; **9**, 636-641.
37. Schmitz H., Wigand R., Heinrich W., (1983) Worldwide Epidemiology of Human Adenoviruses. *American Journal of Epidemiology*, **117**, 455-466.
38. Van der Eb A. J., Zantema A., (1991) Adenovirus oncogenesis. *Advances in Cancer Research*, **57**, 47-85.
39. Pring-Akerblom P., Helm A., Trijssenaar F. E., (1998) Molecular Characterization of Hemagglutination Domains on the Fibers of Subgenus D Adenoviruses. *J. Virol.*, **72(3)**, 2297-2304.
40. Ebner K., Pinsker W., Lion T., (2005) Comparative Sequence Analysis of the Hexon Gene in the Entire Spectrum of Human Adenovirus Serotypes: Phylogenetic, Taxonomic and Clinical Implications. *J. Virol.*, **79(20)**, 12635-42.
41. Crossland L. D., Raskas H. J., (1983) Identification of Adenovirus Genes That Require Template Replication for Expression. *J. Virol.*, **46(3)**, 737-48.
42. Bridge E., Carmo-Fonseca M., Lamond A., (1993) Nuclear Organization of Splicing Small Nuclear Ribonucleoproteins in Adenovirus Infected Cells. *J. Virol.*, **67(10)**, 5792-5802.
43. Swenson P.D., Wadell G., Allard A., Hierholzer J. C., (2003) Adenoviruses. *Manual of Clinical Microbiology*, ASM Press, Washington, **8**,1404.
44. Singhera G. K., Chan T. S., (2006) Apoptosis of Viral Infected Airway Epithelial Cells Limit Viral Production and is Altered by Corticosteroid Exposure. *Respir. Res.*, **7(1)**, 1-13.
45. Gottsch J. D., (1996) Surveillance and Control of Epidemic Keratoconjunctivitis. *Trans Am. Ophthalmol. Soc.*, **94**, 539-587.
46. Krajden M., Brown M., Petrasek A., Middleton P. J., (1990) Clinical features of adenovirus enteritis: A review of 127 cases., *Journal of Pediatric Infectious Diseases*; **9**, 636-641.

47. Hierholzer J. C., (1992) Adenoviruses in the Immunocompromised Host. *Clin. Microbiol. Rev.*, **5(3)**, 262-74.
48. Ariga T., Shimada Y., Tagawa Y., (2004) New Genome Type of Adenovirus Serotype 4 Caused Nosocomial Infections Associated with Epidemic Conjunctivitis in Japan. *J. Clin. Microbiol.*, **42(8)**, 3644-48.
49. Ginsberg H.S., Horswold R.L., (1990) Role of Early Genes in Pathogenesis of Adenovirus Pneumonia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87(16)**, 6191-95.
50. Tsutsumi H., Ouchi K., Ohsaki M., (1999) Immunochromatography Test for Rapid Diagnosis of Adenovirus Respiratory Tract Infections: Comparison with Virus Isolation in Tissue Culture. *J. Clin. Microbiol.*, **37(6)**, 2007-2009.
51. Trabelsi A., Pozzetto B., Mbida A. D., Grattard F., Ros A., Gaudin O. G. (1992) Evaluation of four methods for rapid detection of adenovirus. *Eur J Microbiol Infect Dis.*, **11**, 535–539.
52. Pring-Åkerblom P., Adrian T., Köstler T. (1997) PCR-based detection and typing of human adenovirus in clinical samples. *Res Virol.*, **148**, 225–231.
53. Bozkaya E., (2006), Ustaçelebi Ş., Badur S., Abacıoğlu H. (ed.), *Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji*, 69-72.
54. Takeuchi S., Itoh N., Uchio E., Aoki K., Ohno S., (1999) Serotyping of adenoviruses on conjunctival scrapings by PCR and sequence analysis. *J Clin Microbiol.*, **37**, 1839–1845.
55. Ludwig S L, Brundage J F, Kelley P W, Nang R, Towle C, Schnurr D P, Crawford-Miksza L K, Gaydos J C. (1998) Prevalence of antibodies to adenovirus serotypes 4 and 7 among unimmunized US Army trainees: results of a retrospective nationwide seroprevalence survey. *J Infect Dis.*, **178**, 1776–1778.
56. Aoki, K., and Y. Tagawa., (2002) A twenty-one year surveillance of adenoviral conjunctivitis in Sapporo. *Japan. Int. Ophthalmol. Clin.*, **42**, 49-54.
57. Madisch I., Harste G., Pommer H., Heim A., (2005) Phylogenetic Analysis of the Main Neutralization and Hemagglutination Determinants of All Human Adenovirus Prototypes as a Basis for Molecular Classification and Taxonomy. *J. Virol.*, **79(24)**, 15265-76.

58. Lenaerts L., Verbeke E., De Clercq E., (2005) Mouse Adenovirus Type 1 Infection in SCID Mice: an Experimental Model for Antiviral Therapy of Systemic Adenovirus Infections. *Antimicrob Agents Chemother.*, **49(11)**, 4689-99.
59. Gavin, P. J., and B. Z. Katz., (2002) Intravenous ribavirin treatment for severe adenovirus disease in immunocompromised children. *Pediatrics* **110**, 9.
60. Ogra P. L., Faden H., Welliver R. C., (2001) Vaccination Strategies for Mucosal Immune Responses. *Clin. Microbiol. Rev.*, **14(2)**, 430-45.
61. Reed G, Jewett P H, Thompson J, Tollefson S, Wright P F. (1997) Epidemiology and clinical impact of parainfluenza virus infections in otherwise healthy infants and young children <5 years old. *J Infect Dis.*, **175**, 807–813.
62. Lamb, R. A., Kolakofsky D. (1996) Paramyxoviridae: the viruses and their replication. In: Fields B N, Knipe D M, Howley P M, Chanock R M, Melnick J L, Monath T P, Roizman B, Straus S E. , editors. *Fields Virology*. 3rd ed. Vol. 1. Philadelphia, Pa: Lippincott-Raven Publishers;. 1177–1204.
63. Collins, P L.;Chanock, R M.; McIntosh, K. (1996) Parainfluenza viruses. In: Fields B N, Knipe D M, Howley P M, Chanock R M, Melnick J L, Monath T P, Roizman B, Straus S E. , editors. *Fields Virology*, 3rd ed. Vol. 1. Philadelphia, Pa: Lippincott-Raven Publishers, 1205–1241.
64. Hendley, J O. (1990) Parainfluenza viruses. In: Mandell G L, Douglas R G, Bennett J E. , editors. *Principles and practice of infectious diseases*. 3rd ed. New York, N.Y: Churchill Livingstone; 1255–1260.
65. Spriggs M. K., Collins P. L., (1986) Human Parainfluenza Virus Type 3: Messenger RNAs, Polypeptide Coding Assignments, Intergenic sequences and Genetic Map. *J. Virol.*, **59(3)**, 646-54.
66. Henrickson, K. J., S. M. Kuhn, and L. L. Savatski. (1994) Epidemiology and cost of human parainfluenza virus type one and two infections in young children. *Clin. Infect. Dis.* **18**, 770-779.
67. Henrickson K. J., (2003) Parainfluenza Viruses. *Clin. Microbiol. Rev.*, **16(2)**, 242-264.

68. Hall, C. B., J. M. Geiman, B. B. Breese, and R. G. Douglas, Jr., (1977) Parainfluenza viral infections in children: correlation of shedding with clinical manifestations. *J. Pediatr.* **91**, 194-198.
69. Hu, X. L., R. Ray, and R. W. Compans. (1992) Functional interactions between the fusion protein and hemagglutinin-neuraminidase of human parainfluenza viruses. *J. Virol.*, **66**, 1528-1534.
70. Gardner, S. D. (1969) The isolation of parainfluenza 4 subtypes A and B in England and serological studies of their prevalence. *J. Hyg.*, **67**, 545-550.
71. Van Wyke Coelingh K. L., Winter E. L. Tierney S. L. et al. (1990) Antibody responses of humans and nonhuman primates to individual antigenic sites of the hemagglutinin-neuraminidase and fusion glycoproteins after primary infection or reinfection with parainfluenza type 3 virus. *J. Virol.* **64**, 3833-3843.
72. Wong D. T., Welliver R. C., Riddlesberger K. R., Sun M. S., and Ogra P. L., (1982) Rapid diagnosis of parainfluenza virus infection in children. *J. Clin. Microbiol.* **16**, 164-167.
73. Hierholzer J. C., Bingham P. G., Coombs R. A., Johansson K. H., Anderson L. J., and Haionen P. K., (1989) Comparison of monoclonal antibody time-resolved fluoroimmunoassay with monoclonal antibody capture-biotinylated detector enzyme immunoassay for respiratory syncytial virus and parainfluenza virus antigen detection. *J. Clin. Microbiol.* **27**, 1243-1249.
74. Frank, A. L., Couch R. B., Griffin C. A., and Baxter B. D., (1973) Comparison of different tissue cultures for isolation and quantitation of influenza and parainfluenza viruses. *J. Clin. Microbiol.* **10**, 2-6.
75. Fan, J., Henrickson K. J., and Savatski L. L., (1998) Rapid simultaneous diagnosis of infections with respiratory syncytial viruses A and B, influenza viruses A and B, and human parainfluenza virus types 1, 2, and 3 by multiplex quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction-enzyme hybridization assay (Hexaplex). *Clin. Infect. Dis.* **26**, 1397-1402.
76. Vuorinen T., and Meurman O., (1989) Enzyme immunoassays for detection of IgG and IgM antibodies to parainfluenza types 1, 2, and 3. *J. Virol. Methods*

23, 63-70.

77. Glezen, W. P., Frank A. L., Taber L. H., Kasel J. A.. (1984) Parainfluenza virus type 3: seasonality and risk of infection and reinfection in young children. *J. Infect. Dis.* **150**, 851-857.
78. Denny F. H., Murphy T. F., Clyde W. A., Collier A. M. Jr., Henderson F. W. (1983) Croup: an 11-year study in a pediatric practice. *Pediatrics* **71**, 871-876.
79. Ljungman, C. A., Gleaves C. A., Meyers J. D., (1989) Respiratory virus infection in immunocompromised patients. *Bone Marrow Transplant.* **4**, 35-40.
80. Savolainen C., Blomqvist S., Mulders M. N., Hovi T., (2002) Genetic clustering of all 102 human Rinovirus prototype strains: serotype 87 is close to human enterovirus 70. *J. Gen. Virol.* **83**, 333-340.
81. Smith, T. J., Kremer M. J., Luo M., et al. (1986) The site of attachment in human Rinovirus 14 for antiviral agents that inhibit uncoating. *Science* **233**, 1286-1293.
82. Uncapher C. R., Dewitt C. M., Colonno R. J. (1991) The major and minor group receptor families contain all but one human Rinovirus serotype. *Virology* **180**, 814-817.
83. Appleby T. C., Luecke H., Shim J. H., (2005) Crystal Structure of Complete Rinovirus RNA Polymerase Suggests Front Loading of Protein Primer. *J Virol.* **79(1)**, 277-288.
84. Boom, R., Sol C. J. A., Salimans M. M. M., Jansen C. L., Werthum-Van Dillen P. M. E., and Van der Noordaa J. (1990) Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 495-503.
85. Lennette E H. , editor. (1992) Laboratory diagnosis of viral infections. New York, N.Y: Marcel Dekker.
86. Nicholson K. G., Kent J., Hammersley V., Cancio E. (1996) Risk factors for lower respiratory complications of Rinovirus infections in elderly people living in the community: prospective cohort study. *BMJ.* **313**, 1119–1123.
87. Mäkelä M. J., Puhakka T., Ruuskanen O., (1998) Virus and Bacteria in the Etiology of the Common Cold. *J. Clin. Microbiol.*, **36(2)**, 539–542.

88. Collins, P. (1991) The molecular biology of human respiratory syncytial viruses (RSV) of the genus *Pneumovirus*. In: Kingsbury D W. , editor. The paramyxoviruses. New York, N.Y: *Plenum Publishing*; 103–162.
89. Grosfeld H., Hill M. G., Collins P. L. (1995) RNA replication by respiratory syncytial virus (RSV) is directed by the N, P, and L proteins; transcription also occurs under these conditions but requires RSV superinfection for efficient synthesis of full-length mRNA. *J Virol.* **69**, 5677–5686.
90. Cane P. A., Thomas H. M., Simpson A. F., Evans J. E., Hart C. A., Pringle C. R. (1996) Analysis of the human serological immune response to a variable region of the attachment (G) protein of respiratory syncytial virus during primary infection. *J Med Virol.* **48**, 253–267.
91. Collins, P. L., R. M. Chanock, and B. R. Murphy. (2001) Respiratory syncytial virus. In D. Knipe et al. (ed.), *Virology*, 4th ed. Raven Press, New York, N.Y. 1443-1485.
92. Falsey A. R., Treanor J. J., Betts R. F., (1992) Walsh E. E. Viral respiratory infections in the institutionalized elderly: clinical and epidemiologic findings. *J Am Geriatr Soc.* **40**, 115–119.
93. Avadhanula V., Rodriguez C. A., DeVincenzo J. P., (2006) Respiratory Viruses Augment the Adhesion of Bacterial Pathogens to Respiratory Epithelium in a Viral Species- and Cell Type-Dependent Manner. *J Virol* **80(4)**, 1629-1636.
94. Falsey A. R., Walsh E. E., (2000) Respiratory Syncytial Virus Infection in Adults. *Clin. Microbiol. Rev.* **13(3)**, 371-84.
95. Hall C. B., Walsh E. E., Long C. E., Schnabel K. C., (1991) Immunity to and frequency of reinfection with respiratory syncytial virus. *J Infect Dis.* **163**, 693–698.
96. Groothuis J. R., Levin M. J., Rodriguez W., (1991) Use of intravenous gamma globulin to passively immunize high-risk children against respiratory syncytial virus: safety and pharmacokinetics. The RSVIG Study Group. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **35 (7)**, 1469-73.
97. Englund J. A., Piedra P. A., Jewell A. (1996), Rapid Diagnosis of Respiratory

- Syncytial Virus Infections in Immunocompromised Adults. *J. Clin. Microbiol.*, **34** (7), 1649-53.
98. Borek A. P., Clemens S. H., Gaskins V. K., (2006) Respiratory Syncytial Virus Detection By Remel Xpect, Binax Now RSV, Direct Immunofluorescent Staining, and Tissue Culture. *J. Clin. Microbiol.*, **44** (3), 1105-1107.
 99. Falsey A. R., Formica M. A., Treanor J. J., (2003) Comparison of Quantitative Reverse Transcription-PCR to Viral Culture for Assessment of Respiratory Syncytial Virus Shedding. *J. Clin. Microbiol.*, **41** (9), 4160-65.
 100. Kotaniemi-Syrjanen A., Laatikainen A., Waris M., (2005) Respiratory Syncytial Virus Infection in Children Hospitalized for Wheezing: Virus Specific Studies from Infancy to Preschool Years. *Acta Paediatrica*, **94** (2), 159-65.
 101. Peret T. C. T., Hall C. B., Schnabel K. C., (1998) Circulation Patterns of Genetically Distinct Group A and B Strains of Human Respiratory Syncytial Virus in a Community. *J. General Virology*, **79**, 2221-29.
 102. McIntosh, K. (1997) Respiratory syncytial virus, p. 691-711. In A. S. Evans and R. A. Kaslow (ed.), *Viral infections of humans, epidemiology and control*, 4th ed. Plenum Publishing Corporation, New York, N.Y.
 103. Sato M., Saito R., Sakai T., (2005) Molecular epidemiology of Respiratory Syncytial virus Infections Among Children with Acute Respiratory Symptoms in a Community over Three Seasons. *J. Clin. Microbiol.*, **43** (1), 36-40.
 104. Oommen A., Luyt D. K., Nichani S., (1999) Intravenous Ribavirin for Infant Bronchiolitis., *J. R. Soc. Med.* **92**(2), 81-82.
 105. Davis I. C., Sullender W. M., Hickman-Davis J. M.; (2004) Nucleotide Mediated Inhibition of Alveolar Fluid Clearance in BALB/c Mice after Respiratory Syncytial Virus Infection. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* **286** (1), 112-20.
 106. van den Hoogen, B. G., de Jong J. C., Groen J., Kuiken T., de Groot R., Fouchier R. A., and Osterhaus A. D.. (2001) A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat. Med.* **7**, 719-724.

107. Crowe J. E., (2004) Human metapneumovirus as a major cause of human respiratory tract disease. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **23(11)**, 215-221.
108. Esper, F., Martinello A., Boucher D., Weibel C., Ferfuson D., Landry M. L., and Kahn J. S., (2004) A 1-year experience with human metapneumovirus in children aged <5 years. *J. Infect. Dis.* **189**, 1388-1396.
109. McAdam, A. J., Hasenbein M. E., Feldman H. A., Cole S. E., Offerman J. T., Riley A. M., and Lieu T. A.. (2004) Human metapneumovirus in children tested at a tertiary-care hospital. *J. Infect. Dis.* **190**, 20-26.
110. Peret, T. C., Boivin G., Li Y., Couillard M., Humphrey C., Osterhaus A. D., Erdman D. D., and Anderson L. J.. (2002) Characterization of human metapneumoviruses isolated from patients in North America. *J. Infect. Dis.* **185**, 1660-1663.
111. van den Hoogen, B. G., Osterhaus D. M., and Fouchier R. A.. (2004) Clinical impact and diagnosis of human metapneumovirus infection. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **23**, 25-32.
112. Harnden A., (2005) Human Metapneumovirus, *Br. J. Gen. Pract.* **55(511)**, 84-85.
113. Conzelmann K. K., (1998) Nonsegmented Negative-Strand RNA Viruses: Genetics and Manipulation of Viral Genomes. *Annual Review of Genetics*, **32**, 123-62.
114. Hamelin M., Abed Y., Bolvin G., (2004) Human Metapneumovirus: A New Player among Respiratory Viruses. *Clinical Infectious Diseases*, **38**, 983-90.
115. Wright AL, Taussig LM, Ray CG, Harrison HR, Holberg CJ. (1989) The Tucson Children's Respiratory Study II: lower respiratory tract illness in the first year of life. *Am J Epidemiol* **129**, 1232-46.
116. Davies HD, Matlow A, Petric M, Glazier R, Wang EE. (1996) Prospective comparative study of viral, bacterial and atypical organisms identified in pneumonia and bronchiolitis in hospitalized Canadian infants. *Pediatr Infect Dis J.* **15**, 371-75.
117. Falsey A. R., Erdman D., Anderson L. J., Walsh E. E. (2003) Human metapneumovirus infections in young and elderly adults. *J Infect Dis* **187**,

785–90.

118. Greensill J, McNamara PS, Dove W, Flanagan B, Smyth RL, Hart CA. (2003) Human metapneumovirus in severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Emerg Infect Dis.*, **9**, 372–75.
119. Boivin G., Côté S., De Serres G., Gilda R., Bergeron MG., Déry P., (2003) Role of human metapneumovirus and other common respiratory viruses in children's hospitalization for acute respiratory tract infection: a two-year study using multiplex PCR [abstract V-478]. In: Program and abstracts of the 43rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (Chicago). Washington, DC: *American Society for Microbiology*, 491.
120. Maggi F., Pifferi M., Vatteroni M., (2003) Human Mteapneumovirus Associated with Respiratory Tract Infections in a 3-year Study of Nasal Swabs from Infants in Italy. *J. Clin. Microbiol.* **41(7)**, 2987-91.
121. Boivin, G., Abed, Y., Pelletier, G., Ruel, L., Moisan, D., Cote, S., Peret, T.C., Erdman, D.D. and Anderson, L.J., (2002) Virological features and clinical manifestations associated with human metapneumovirus: a new paramyxovirus responsible for acute respiratory-tract infections in all age groups. *J. Infect. Dis.* **186 (9)**, 1330–1334.
122. Greensill J., McNamara, P.S., Dove, W., Flanagan, B., Smyth, R.L. and Hart, C.A., (2003) Human metapneumovirus in severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Emerg. Infect. Dis.* **9 (3)**, 372–375.
123. Falsey, A.R., Erdman, D., Anderson, L.J. and Walsh, E.E., (2003) Human metapneumovirus infections in young and elderly adults. *J. Infect. Dis.* **187(5)**, pp. 785–790.
124. Osterhaus, A. and Fouchier, R., (2003) Human metapneumovirus in the community. *Lancet*, **361(9361)**, 890–891.
125. Stockton, J., Stephenson, I., Fleming, D. and Zambon, M., (2002) Human metapneumovirus as a cause of community-acquired respiratory illness. *Emerg. Infect. Dis.* **8(9)**, pp. 897–901.
126. Wyde PR, Chetty SN, Jewell AM, Boivin G, Piedra PA. (2003) Comparison of the inhibition of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus

- by ribavirin and immune serum globulin in vitro. *Antiviral Res* **60**, 51–9.
127. Bozkaya E., (2006), Ustaçelebi Ş., Badur S., Abacıoğlu H. (ed.), *Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji*, 72-73.
128. Bakır M., (2002), Viral Pnömoniler - Hantavirus. Topçu A. W., Söyletir G., Doğanay M. (ed.), *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*, Nobel Tıp Kitabevleri, **1**, 521.
129. Treanor J. J., (2000) Influenza Virus. *Principles and practise of Infectious Disease*, 5. ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 1823-49.
130. Arslan S., Önal A., Türkiye’de 2002-2003 Kış Mevsiminde İnfluenza Virusu Sürveyans Araştırması. *Kürsü* 24-28.
131. CDC. (2004) Prevention and Control of Influenza: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), *MMWR*, 53 (No. RR-6)
132. CDC. (2004) Update: Influenza Activity- United States and Worldwide, May-Oct 2004. *MMWR*, 53:993-5.
133. CDC. 2003-2004 Influenza (Flu) Weekly Report. Influenza Season summary.
134. DSÖ Collaborating Centre For Reference and Research on Influenza. London: Aug 2003 to Jul 2004 Report.
135. Leblebicioğlu H., (2001) İnfluenza: Klinik, Tanı ve Tedavi, *İnfeksiyon Hastalıkları Serisi*, **4**, 174-6.
136. Özacar T., (2003) Moleküler Biyolojik Yöntemlerin Virolojide Hızlı Tanı ve İdentifikasyon Amaçlı Kullanılması, *Klinik Laboratuvar Dergisi*, **2(1)**, 18-21.
137. Celikbas A., Yilmaz N., Ulu A., (2005) Üst Solunum Yolu İnfeksiyonlarında Viral etkenlerin Araştırılması. *İnfeksiyon Dergisi*, **19(3)**, 377-80.
138. Cicek C., Bilgic A., Bacakoglu F., (2003) Alt solunum Yolu İnfeksiyonlu Yoğun Bakım Hastalarında Viral Etkenlerin Hızlı Tanısı. *Klinik Laboratuvar Dergisi*, **2(1)**, 1-5.
139. Kaygusuz S., Köksal I., (2004) Investigation of Atypical Bacteria and Virus Antigens in Respiratory Tract Infections by Use of Immunoflorescent Method. *Jpn. J. Infect. Dis.*, **57**, 33-6.

140. Yılmaz N., Yıldırım R., Artuk C., (1998) Investigation of Influenza A and B Virus Seroprevalences Among Children and Adults. *Mikrobiyoloji Bülteni*, **32**, 329-35.
141. Liolios L., Jenney A., Spelman D., (2001) Comparison of a Multiplex Reverse Transcription-PCR-Enzym Hybridization Assay with Conventional Viral Culture and Immunofluorescence Techniques for the Detection of Seven Viral Respiratory Pathogens, *J. Clin. Microbiol.*, **39** (8), 2779-83.
142. Kuypers J., Wright N., Ferrenberg J., (2001) Comparison of Real-Time PCR Assays with Florescent-Antibody assays for Diagnosis of Respiratory Virus Infection in Children, *J. Clin. Microbiol.*, **44**(8), 2382-88.
143. Coyle V. P., Ong G. M., O'Neill H.J., (2004) A Touchdown Nucleic Acid Amplification Protocol as an Alternative to Culture backup for Immunofluorescence in the Routine Diagnosis of Acute Viral Respiratory Tract Infections, *BMC Microbiology*, **4** (41), 1-9.
144. Erdman D. D., Weinberg G. A., Edwards K. M., (2003) GeneScan Reverse Transcription-PCR Assay for Detection of Six Common Respiratory Viruses in Young Children Hospitalized with Acute Respiratory Inness, *J. Clin. Microbiol.*, **41**(9), 4298-4303.
145. Kehl S. C., Henrickson K. J., Hua W. (2000) Evaluation of the Hexaplex Assay for Detection of Respiratory Viruses in Children, *J. Clin. Microbiol.*, **39**(5), 1696-1701.
146. van de Pol A. C., Wolfs T. F. W., Jansen N. J. G. (2006) Diagnostic Value of Real-Time Polymerase Chain Reaction to Detect Viruses in Young Children Admitted to Paediatric Intensive Care Unit with Lower Respiratory Tract Infection, *Critical Care*, **10**(2), 1-7.
147. Herrmann B., Larsson C., Zwegyerg B. W. (2000) Simultaneous Detection and Typing Influenza Viruses A and B by a Nested Reverse Transcription-PCR: Comparison to Virus Isolation and Antigen Detection by Immunofluorescence an Optical Immunoassay (FLU OIA), *J. Clin. Microbiol.*, **39**(1), 134-38.
148. Bonroy C., Vankeerberghen A., Boel A. (2007) Use of Multiplex Real-Time

PCR to Study the Incidence of Human Metapneumovirus and Human Respiratory Syncytial Virus Infections During Two Winter Seasons in a Belgian Paediatric Hospital, *Clin. Microbiol. and Infection*, 1-6.

149. Sirmis M. W., Whiley D. M., Thomas M. (2004), A Sensitive, Specific and Cost-Effective Multiplex Reverse Transcriptase-PCR Assay for the Detection of Seven Common Respiratory Viruses in Respiratory Samples, *Journal of Molecular Diagnostics*, **6(2)**, 125-31.
150. Yılmaz G., Uze N., Işık N., Uğur S., Aslan S., Badur S., (2000) Akut Alt Solunum Yolu İnfeksiyonu Olan Çocuklarda Viral Etkenler ve Respiratory Syncytial Virus Alt Grupları. *İnfeksiyon Dergisi*, **14(2)**, 157-164.
151. Yarkın F., Alhan E., Kibar F., Karabay A., Köksal F., (1995) Çocuklarda Alt Solunum Yolu Enfeksiyonlarında Viral Ajanların Seroepidemiyolojik Analizi. *Mikrobiyoloji Bülteni*, **29(2)**, 149-156.
152. Yamazhan T., Dereli D. G., Ertem E., Serter D., (1999) 1995-1996 Kış Mevsiminde, Hücre Kültürü Yöntemi ile Bölgemizde Saptanan Adenovirus, Solunum Sinsityal Virus ve Parainfluenza Virus İnfeksiyonları. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Dergisi*, **4(2)**, 135-138.

AKU TIP FAKÜLTESİ MİKROBİYOLOJİ AD
SOLUNUMSAL PATOJENLER ANKET FORMU (Ekim'2005-Mayıs'2006)

ADI SOYADI :

YAŞI :

DOSYA NO :

KLİNİK :

SEMPTOMLAR :

Krup Hırıltı ses Öksürük Çekilme, stridor, Larengial obstruksiyon

Trakeabronşit Öksürük Ronküs Wheezing ve larengial tıkanıklık yok

Bronşiolit Wheezing Subcostal çekilme

Pnomoni Pulmoner konsolidasyon bulguları klinik gözlem PA AKC

AYRICA:

* Common Cold * Farenjit * USYE

* Herpangina * Meningial irritasyon * Konjunktivit

* Ateş

Başvuru Tarihi :

Başvuru Sebebi :

Daha Önceden Geçirdiği Hastalıklar:

Yatış Tarihi :

Çıkış tarihi :

Şüphelenilen Mikroorganizma: Bakteri Virus.....

Uygulanan Tedavi:

Ön Tanı :

AŞI DURUMU :

Testler : CRP

: Lokosit

: AC filmi

Örnekler : () Nazofarengeal aspirat, Trakeal aspirat, BAL

: () Kan

Çalışma Sonuçları:

Viruslar :

IFAT :

Multiplex PCR : İnf Parainf RSV Adeno HMPV

Diğer :