

**T.C.  
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ  
MERAM TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ  
ANABİLİM DALI**

**Anabilim Dalı Başkanı  
Prof. Dr. Bülent BAYSAL**

**VİRAL PNÖMONİ TANISI ALAN HASTALARDA ETKENLERİN MULTİPLEKS PZR  
(POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU )YÖNTEMİYLE ARAŞTIRILMASI**

**Arş. Gör. Dr. Oya AKKAYA**

**UZMANLIK TEZİ**

**Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Bülent BAYSAL**

**KONYA  
2011**

## İÇİNDEKİLER

|  |            |
|--|------------|
| <b>TABLO DİZİNİ</b> .....                              | <b>iii</b> |
| <b>RESİM DİZİNİ</b> .....                              | <b>iv</b>  |
| <b>ŞEKİL DİZİNİ</b> .....                              | <b>v</b>   |
| <b>1. GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....                          | <b>1</b>   |
| <b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....                         | <b>4</b>   |
| <b>2.1. İnfluenza virusları</b> .....                  | <b>4</b>   |
| 2.1.1. Epidemiyoloji ve bulaş .....                    | 5          |
| 2.1.2. Klinik önemi .....                              | 7          |
| 2.1.3. Laboratuvar tanı.....                           | 7          |
| 2.1.4. Tedavi ve korunma .....                         | 9          |
| <b>2.2. Parainfluenza viruslar(HPIV)</b> .....         | <b>10</b>  |
| 2.2.1. Epidemiyoloji ve bulaş .....                    | 10         |
| 2.2.2. Klinik önemi .....                              | 11         |
| 2.2.3. Laboratuvar tanı.....                           | 11         |
| 2.2.4. Tedavi ve korunma .....                         | 12         |
| <b>2.3. Respiratuvar Sinsityal Viruslar(RSV)</b> ..... | <b>12</b>  |
| 2.3.1. Epidemiyoloji ve bulaş .....                    | 12         |
| 2.3.2. Klinik önemi .....                              | 13         |
| 2.3.3. Laboratuvar tanı.....                           | 13         |
| 2.3.4. Tedavi ve korunma .....                         | 13         |
| <b>2.4. Human Metapnömoviruslar (HMPV)</b> .....       | <b>14</b>  |
| 2.4.1. Epidemiyoloji ve bulaş .....                    | 14         |
| 2.4.2. Klinik önemi .....                              | 15         |
| 2.4.3. Laboratuvar tanı.....                           | 15         |
| 2.4.4. Tedavi ve korunma .....                         | 15         |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>2.5. Human Rinoviruslar (HRV)</b> ..... | <b>15</b> |
| 2.5.1. Epidemiyoloji ve bulaş .....        | 16        |
| 2.5.2. Klinik önemi .....                  | 16        |
| 2.5.3. Laboratuvar tanı.....               | 17        |
| 2.5.4. Tedavi ve korunma .....             | 17        |
| <b>2.6. Koronavirüsler</b> .....           | <b>17</b> |
| 2.6.1. Epidemiyoloji ve bulaş .....        | 18        |
| 2.6.2. Klinik önemi .....                  | 18        |
| 2.6.3. Laboratuvar tanı.....               | 18        |
| 2.6.4. Tedavi ve korunma .....             | 19        |
| <b>2.7. Adenovirüsler</b> .....            | <b>19</b> |
| 2.7.1. Epidemiyoloji ve bulaş .....        | 19        |
| 2.7.2. Klinik önemi .....                  | 20        |
| 2.7.3. Laboratuvar tanı.....               | 21        |
| 2.7.4. Tedavi ve korunma .....             | 21        |
| 2.8. Polymerase Chain Reaction (PCR) ..... | 22        |
| 2.8.1. Multipleks PCR .....                | 23        |
| <b>3. GEREÇ VE YÖNTEMLER</b> .....         | <b>24</b> |
| <b>4. BULGULAR</b> .....                   | <b>33</b> |
| <b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ</b> .....          | <b>37</b> |
| <b>6. ÖZET</b> .....                       | <b>50</b> |
| <b>7. ABSTRACT</b> .....                   | <b>51</b> |
| <b>8. TEŞEKKÜR</b> .....                   | <b>52</b> |
| <b>9. KAYNAKLAR</b> .....                  | <b>53</b> |

## TABLO DİZİNİ

|   |    |
|---|----|
| <b>Tablo-1.</b> Çalışmadaki virusların genel özellikleri.....   | 3  |
| <b>Tablo-2.</b> Viral pnömoni sayı ve oranlarının çocuk ve erişkine göre dağılımı.....                | 33 |
| <b>Tablo-3.</b> Hastaların yaş ve cinsiyet dağılımı.....  | 34 |
| <b>Tablo-4.</b> Hastaların yaş aralıklarına göre dağılımı.....  | 34 |
| <b>Tablo-5.</b> Hastalık bulgularının dağılımı .....  | 35 |
| <b>Tablo-6.</b> Virüs pozitif olan hastaların birlikte olduğu hastalıkların dağılımı.....             | 35 |
| <b>Tablo-7.</b> Bulunan virüslerin hastalara göre dağılımı.....                                       | 36 |
| <b>Tablo-8.</b> Türkiye’de ve çeşitli ülkelerde yapılan çalışmalarda bulunan virusların oranları..... | 48 |

## RESİM DİZİNİ

|   |    |
|---|----|
| <b>Resim I:</b> Çalışmamızdaki virus markerlarının ve pozitif örneklerin jel elektroforezindeki fotoğrafı:..... | 32 |
|---|----|

## ŞEKİL DİZİNİ

|   |    |
|---|----|
| Şekil 1. Agaroz jel elektroforezinde virus DNA'larının büyüklükleri ve hedef gen bölgeleri..... | 28 |
| Şekil 2. Sonuçların yorumlanması.....   | 29 |
| Şekil 3. Kit prospektüsünden alınmış agaroz jelde yürüyen virusların görüntüsü .....            | 30 |

## 1.GİRİŞ VE AMAÇ:

Akut solunum yolu infeksiyonları çok yaygın olup, en sık rastlanan etken viruslardır. Respiratuar virüsler olarak tanımlanan bir grup virüsün solunum yollarını infekte etme yeteneği yüksektir. Bu virüslerin çoğunluğunu RNA içeren virüsler oluşturmaktadır. Bu virüsler ; influenza virüsler (A, B, C), Respiratuar sinsiyal virüsler (RSV), Parainfluenza virüsler (1, 2, 3, 4), Adenovirüsler (serotip 1-7, 14, 21), Rinovirüsler, Herpes Simplex Virus, Epstein Barr Virus ve Kızamık virüsüdür.

Respiratuar virüslere bağlı olarak nezle, farenjit, larenjit, trakeobronşit ve pnömoni oluşabilir. Klinik tablo belirtisiz infeksiyondan ölümcül infeksiyona kadar değişebilir. Bütün yıl boyunca görülebilmelerine karşın özellikle kış aylarında daha siktir. Tüm yaş gruplarını etkileyebilir, ancak çocuklarda erişkinlerden daha sık görülür. Yaşamın ilk yılında alt solunum yolu infeksiyonu insidansı yılda 100 çocuğa 30-35 olgudur. Gelişmekte olan ülkelerde alt solunum yolu infeksiyonları çocuklarda en önemli ölüm sebebi olup yılda 4 milyondan fazla ölüme neden olmaktadır. Türkiye’de de Sağlık Bakanlığı 2008 verilerine göre süt çocuğu yaş grubunda ölümlerin % 2.2’sinden, 5 yaş altı çocuklarda ölümlerin %2.7’sinden pnömoniler sorumludur. Respiratuar virüsler özellikle çok genç ve yaşlı kişilerde, bağışıklığı baskılanmış hastalarda şiddetli hastalık ve ölüme neden olabilir, altta yatan kronik akciğer hastalığı bulunan kişilerde solunum yetmezliğine yol açabilir. Bu durum viral infeksiyonun solunum sisteminin savunma mekanizmalarını etkileyerek bakteriyel infeksiyon için uygun zemin yaratmasına bağlıdır.

Pnömoni, infeksiyöz veya infeksiyöz olmayan ajanlar tarafından oluşturulan akciğer dokusu inflamasyonudur. Küçük bebeklerde pnömoninin akut bronşiyolitten ayrımı güç olduğundan, bu iki hastalığı da kapsayan **akut alt solunum yolu infeksiyonu** terimi de kullanılır. Çocukluk çağı pnömonilerinin en sık görülen nedenleri bakteriyel ve viral ajanlardır.

Viral etkenlere bağlı pnömoniler yenidoğan ve çocuklarda, bağışıklığı baskılanmış hastalarda sık görülürken, erişkinlerde daha nadirdir. Altta yatan kronik kardiyak veya pulmoner hastalığı olanlarda, virüsler daha sık pnömoniden sorumlu etkenlerdir. Pnömoniler de diğer viral solunum yolu infeksiyonları gibi daha çok kış aylarında ortaya çıkar.

Çocuk hastalarda etken olarak sırasıyla Respiratuar Sinsiyal Virus (RSV), Rinovirus, Parainfluenza virus, İnfluenza virus A ve B ve Adenovirus sorumlu iken; erişkin hastalarda ise Adenovirus, Parainfluenza virus, İnfluenza virus, RSV ve herpes virüsler başlıca etkenlerdir. Bağışıklığı baskılanmış hastalarda ise RSV, Sitomegalovirus

(CMV), Varisella-zoster virus (VZV), Herpes simpleks virus (HSV), Kızamık virusu ve Adenovirus etkindir.

Yaşlı bireyler, küçük çocuklar, kalp ve akciğer yetmezliği benzeri kronik hastalığı olanlar ve immün sistemi baskılanmış kişiler, influenza virus infeksiyonlarından kaynaklanan komplikasyonlar açısından yüksek risk grubunu oluştururlar. Bu infeksiyonların erken tanısı, gereksiz antibiyotik kullanımının azaltılmasını ve uygun antiviral terapinin uygulanmasını sağlamaktadır. Günümüzde influenza viruslarına bağlı olarak meydana gelen epidemi ve pandemileri önlemek için en etkili yol, aşılama'dır. İnfluenza virusuna ait epidemiyolojik ve virolojik bilgilerini sağlayan sörveyans çalışmalarını kapsamında virusun identifikasyonu ve detaylı antijenik özelliklerinin belirlenmesi, doğru aşı kombinasyonlarına karar vermeyi ve olası epidemilere zamanında müdahale etmeyi mümkün kılar.

Klinik ön tanının kısa sürede doğrulanması ve sörveyans sisteminin kalitesinin artırılması amacıyla, hızlı ve güvenilir sonuç veren testler olarak çeşitli moleküler teknikler geliştirilmiştir. Daha çok Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) temelli olan bu yöntemlerin yüksek duyarlılığa sahip olması, hızlı sonuç vermesi ve canlı virusa gerek duymaması, kullanımlarının yaygınlaşmasına neden olmuştur.

Bizim bu çalışmadaki amacımız, hastanemizde pnömoni ön tanısı konup yatırılan veya ayaktan tedavi verilen ve bakteriyel pnömoninin dışlandığı hastalarda, olası viral pnömoni etkenlerini multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yöntemiyle göstermek ve viral pnömoni oranlarını ortaya koymaktır. Çalışmamızda multipleks PZR yöntemi ile araştırdığımız viruslar;

- *Respiratory Sinsityal Virus (RSV A-B)*,
- *İnfluenza A ve B virus (INF-A ve B)*
- *Parainfluenza virus (HPIV) 1-2-3*,
- *Human Rinovirus (HRV)*,
- *Adenovirus (AdV)*,
- *Koronavirus (HcoV)*,
- *Human metapneumovirus (HMPV)* tur.

Böyle bir çalışma Konya bölgesi ve hastanemiz oranlarını belirlemek için gereklidir.



**Tablo-1.** Solunum yolu viruslarının genel özellikleri

|   | <b>INF V</b>                          | <b>PIV</b>               | <b>RSV</b>               | <b>HRV</b>           | <b>HCoV</b>                                 | <b>HMPV</b>              | <b>AdV</b>            |
|---|---------------------------------------|--------------------------|--------------------------|----------------------|---|--------------------------|-----------------------|
| <b>Familiya</b>                         | Orthomyxo<br>viridae                  | Paramyxo<br>viridae      | Paramyxo<br>viridae      | Picorna<br>viridae   | Corona<br>viridae                           | Paramyxo<br>viridae      | Adeno<br>viridae      |
| <b>Şekli</b>                            | helikal                               | helikal                  | helikal                  | helikal              | helikal                                     | helikal                  | ikosahedral           |
| <b>DNA/RNA</b>                          | RNA                                   | RNA                      | RNA                      | RNA                  | RNA   | RNA                      | DNA                   |
| <b>DNA/RNA<br/>tipi</b>                 | Sarmallı<br>segmentli                 | Tek zincir<br>segmentsiz | Tek zincir<br>segmentsiz | Lineer<br>segmentsiz | Tek zincir<br>segmentsiz                    | Tek zincir<br>segmentsiz | Çift zincir<br>lineer |
| <b>Zarf</b>                             | zarflı                                | zarflı                   | zarflı                   | zarfsız              | zarflı                                      | zarflı                   | zarfsız               |
| <b>DNA<br/>replikas.</b>                | nükleus                               | stoplazma                | stoplazma                | stoplazma            | stoplazma                                   | stoplazma                | nükleus               |
| <b>İnfeksiyon<br/>yapan<br/>tipleri</b> | INF-A-B-C                             | PIV<br>1-2-3-4           | RSV<br>A ve B            | HRV<br>A-B-C         | OC-43<br>229-E<br>SARSCoV<br>NL-63<br>HKU-1 |                          | AdV<br>A-B-C-D-E      |
| <b>Tedavisi</b>                         | Amantadin<br>Oseltamivir<br>Zanamivir | Ribavirin                | Ribavirin<br>Palivizumab |                      |   |                          |                       |

**RSV:** Respiratory Sinsityal Virus

**HPIV:** Human Parainfluenza virus

**AdV:** Adenovirus

**HMPV:** Human metapneumovirus

**INF-V:** İnfluenza A ve B virus

**HRV:** Human Rinovirus

**HCoV:** Human Koronavirus

## 2. GENEL BİLGİLER:

### 2.1.İNFLUENZA VİRUSLARI:

Orthomyxoviridae ailesinin üyesidirler. Matriks proteini (M) ve nükleokapsid proteini (NP) gibi iki ayrı yapısal proteindeki antijenik farklılıklara göre *Influenza A*, *Influenza B* ve *Influenza C* diye üç farklı cinse ayrılır. *Influenza A* ve *B*, hemaglutinin (HA) ve nöraminidaz (NA) aktivitesine sahiptir. HA ve NA olarak bilinen iki major yüzey glikoproteinine dayanılarak *Influenza A* virüsleri daha ileri alt tiplere ayrılırlar. 16 HA ve 9 NA alt tip tanımlanmıştır. *Influenza C*'de ise NA bulunmamakla beraber hem HA, hem de esteraz aktivitesine sahip hemaglutinin–esteraz füzyon proteini (HEF) vardır (1). Orthomiksovirusler zarflı, negatif polariteli, parçalı genomlu, tek iplikli RNA virüsleridir. *Influenza A* ve *B* virüslerinin RNA'ları 8 parçalı, *Influenza C* virüsünün ise 7 parçalıdır. Virüsler yuvarlak ya da pleomorfik görünümlü olup, büyüklükleri kültürlerde seri pasajlar sonrası 80-120 nm çapındadır. Lipid zarf olgunlaşma esnasında tomurcuklanma ile konak hücre membranından alınır. Virüslerin yüzeyinde çubuk şeklinde HA ve topuz başlı NA çıkıntıları yer almaktadır. HA hem memeli hem de kanatlı türlerine ait eritrositlerin siyalik asit ürünlerine bağlanarak onları aglutine edebilir ve virüsün bu özelliği, tanımlanmasında kullanılır. Lipid zarf, birçok kopya polimeraz proteinini ve NP ile helikal simetrik genomik RNA parçalarını içeren nükleokapsidi sarar. Nükleokapsid ve zarf arasında matriks-1(M1) proteini vardır (1).

Yeni saptanan bir influenza virusunun adlandırılması virus tipi, konak orijini (insan hariç), coğrafik izolasyon bölgesi, suş numarası ve yılı belirtilerek yapılır. Örneğin Memphis, Tennessee'de bir yaban ördeğinden 1995 yılında izole edilen 123 nolu H3N8 tip A virusu; A/yabanördeği/Memphis/123/95 (H3N8) olarak adlandırılır (1).

İnfluenza virüsleri humoral bağışık yanıtından kaçabilmek için HA ve NA'nın antijenik yapısını sürekli değiştirir. Bu değişiklikler antijenik şift, drift ve reassortment olarak isimlendirilir.

**Antijenik drift:** HA'nın distal membran kısmında bulunan, A' dan E' ye kadar olan antijenik bölgelerindeki aminoasitlerde bir seri nokta mutasyonun birikmesiyle meydana gelir ve pandemi aralarında meydana gelen dönemsel epidemilerden sorumludur. Antijenik drift, İnfluenza virüslerinin NA'larında da meydana gelir ve aminoasit sekanslarında farklılığa yol açar. Bu şekilde iki-beş yıllık aralıklarla ortaya çıkan ve baskın

hale geçen *Influenza A* ve *B* virus antijenik varyantları, insanlarda grip salgınlarına neden olmaktadır. Üç boyutlu yapısı ortaya konan HA, karşılaştırmalı sekans analizi ile incelenmiş ve HA1'in beş antijenik (A-E) bölgesi tarif edilmiştir. Driftte meydana gelen değişiklikler, önceki infeksiyonlarla oluşturulan antikorların bağlanmasını engeller ve virus konağı infekte eder (2,3).

**Antijenik şift:** İkinci antijenik varyasyon tipi olan antijenik şift, sadece *Influenza A* viruslarında meydana gelir ve daha büyük antijenik değişikliklere neden olur. Antijenik şift, önceden dolaşımda bulunan izolatlardan immünolojik olarak farklı olan ve yeni bir HA'e ve/veya HA ile NA'a sahip yeni bir alttip influenza virusunun, insan popülasyonunda görülmesidir. Antijenik şift meydana geldiği zaman, yeni suşun HA'inin daha önce dolaşımda olan suşların ilgili proteinlerinden, aminoasit seviyesinde % 20-50 oranında değişiklik gösterdiği düşünülmektedir. Antijenik şiftler, düzensiz olarak ve önceden saptanamayan aralıklarla meydana gelen pandemilerden sorumludur. İnsanlarda yeni pandemik suşların, direkt transfer yoluyla geçtiği ya da dolaşımda olan insan influenza viruslarının kanatlıların influenza viruslarıyla gen alışverişi yapması sonucu ortaya çıktığı gösterilmiştir (3,4).

**Reassortment:** Segmentli genoma sahip viruslar arasında, segment değişiminden kaynaklanan değişik, istikrarlı ve reassortant adı verilen viruslar üretilmesidir (1). İki *Influenza A* virus arasındaki RNA segmenti alışverişi, ilk olarak 1949'da ortaya konmuştur. *Influenza A, B* ve *C* viruslarının yüksek sıklıkta reassortment özellik göstermelerine rağmen, bu tipler arasında gen alışverişi henüz gözlemlenmemiştir. *Influenza* virusları arasındaki genetik etkileşim kırılma, DNA değişimi ve ligasyon gibi yöntemlerden farklılık gösterir. Bunların yerine iki virus arasındaki RNA segmentlerinin değişimi, genetik reassortment yoluyla meydana gelir(1).

### 2.1.1. Epidemiyoloji ve bulaş:

*Influenza* virüsler ılıman bölgelerde yıllık epidemilere neden olur. Tropikal iklimlerde ise mevsimselliği daha az ortaya çıkar ve yıl boyunca izole edilebilir. Kuzey yarımkürenin ılıman bölgelerinde epidemiler genellikle Aralık – Mart ayları arasında ortaya çıkarken, Güney yarımkürede epidemik dönem Mayıs ile Ağustos arasındadır. Epidemiler, ateşli solunum yolu hastalıklarında ani artış, okul ve işten uzak kalma ile karakterizedir. Genellikle influenza virüslerinin tek bir subtipi hakimdir (A veya B), ama bazen hem A hem de B virüsleri veya iki influenza A virüs subtipi izole edilebilir.

Pandemiler yeni bir HA taşıyan ve kişiden kişiye bulaşabilen bir İnfluenza A virüsünün görülmesinin ardından ortaya çıkar (1).

Düzensiz aralıklarla meydana gelen ve özellikle duyarlı kişilerin ölümüne yol açan epidemiler, aniden başlayıp iki-üç hafta içinde pik yapmaları ve toplam beş-sekiz hafta sürmeleriyle karakterizedirler. Ateş ve öksürük gibi klasik belirtiler dışında miyalji ve gastrointestinal şikayetler influenza için ayırtecdidir. Pandemik grip birkaç kıtada görülür ve yaş gruplarının çoğunu etkiler. Uzmanlar geçen yüzyılda, en azından üç gerçek grip pandemisi olduğu konusunda hem fikirdirler; 1918 İspanya gribi (A/H1N1), 1957 Asya gribi (A/H2N2) ve 1968 Hong Kong gribi (A/H3N2) (5).

1977'den beri *İnfluenza B* virusu ile birlikte *İnfluenza A* virusunun iki alttipinin, eş zamanlı sirkülasyonu söz konusudur. *İnfluenza A* (H3N2) virusunun 1968'deki pandemik formu ortaya çıkışından beri varlığını sürdürmesinin yanı sıra, *İnfluenza B* virusu da ilk izole edildiği 1940'tan beri dolaşımda görülmektedir. *İnfluenza A* virusun H1N1 alttipi ise, 1977'den beri H3N2 alttipi ile birlikte dolaşımdadır. Grip mevsimi boyunca bu üç grup virusunun prevalansı, ülke içinde, ülkeler ve kıtalar arasında, coğrafik ve zamansal açıdan değişebilir (1).

2009 yılı Nisan ayında Meksika'da başlayan pandemik influenza salgınında saptanan H1N1 virusunun domuzda gerçekleşen insan, kanatlılar ve domuz influenza virusları arasındaki antijen değişimi sonucu oluşması nedeniyle bu virus "Pandemik influenza A H1N1 2009" virusu/ yeni varyant H1N1 olarak adlandırılmıştır. Salgın hızla tüm dünyaya yayılmış ve 11 Haziran 2009 tarihinde Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) bu salgının beklenen pandemi olduğunu ilan etmiştir. 23 Aralık 2009 itibarıyla tüm dünyada 11.500 civarında ölüm bildirilmektedir. Hastalığın mortalitesi şu an için 1/1000 olup bu mevsimsel influenza mortalitesinin 10 katıdır. Hançerli ve arkadaşlarının 2009'da yaptığı bir çalışmada, pandemik influenza'nın daha önceden sağlıklı olduğu bilinen çocuklarda da ciddi seyrettiği bildirilmiştir (6).

Ülkemizde ise 19 Ekim – 6 Aralık 2009 tarihleri arasında influenza A/H1N1/2009 virusuna bağlı olduğu doğrulanmış ölüm sayısı 320 olarak belirtilmektedir. Kasım-Aralık 2009 tarihleri arasında Karadeniz Teknik Üniversitesi Farabi Hastanesi'nde yapılan bir çalışmada 211 olgu değerlendirilmiş ve 41(%19.4)'inde pandemik influenza A/H1N1/2009 virus RNA'sı pozitif bulunmuştur (7). Nisbeten belli bir epidemik sırayı takip eden influenza viruslarının antijenik varyasyonlarının ve son epidemiyolojik özelliklerinin

ortaya konduğu bölgesel ve dünya çapındaki sürveyans bulguları, her başarılı antijenik varyantın, dolaşımında olan bir önceki virusun yerine geldiğini göstermektedir (3).

İnfluenza virüslerinin neden olduğu akut solunum yolu infeksiyonları, eski dönemlerden beri salgınlara, hatta dönem dönem pandemilere yol açma özelliği ile bulaşıcı hastalıklar arasında özel bir yere sahiptir. İleri yaş gruplarında mortalitenin ve çocukluk çağında morbiditenin yüksek oluşu; son yıllarda influenza sorununun özellikle gelişmiş ülke ekonomilerini etkileyecek biçimde iş gücü kaybına yol açtığının hesaplanması; bu önemli infeksiyon hastalığına karşı etkili bir aşının kullanımda olması ve son yıllarda bir dizi ilacın geliştirilmesi influenzanın tanısını diğerlerinden önemli kılar (8,9).

### **2.1.2. Klinik önemi:**

İnfluenza viruslarına bağlı olarak nezle, farenjit, larenjit, trakeobronşit ve pnömoni oluşabilir. Klinik tablo, belirtisiz infeksiyondan ölümcül infeksiyona kadar değişebilir. Bu infeksiyonlar, önemli işgücü ve zaman kaybına sebep olur ve riskli gruplarda mortalitesi yüksektir. Bütün yıl boyunca görülebilmelerine karşın özellikle kış aylarında daha sıktır. Asemptomatik infeksiyondan viral pnömoniye kadar değişebilen diğer klinik görünüşler olmasına rağmen, semptomların bu topluluğu influenza olarak adlandırılır (1,5). Hastalık 1-5 günlük inkübasyon döneminin ardından ani bir şekilde başlar. Ateş, kuru öksürük, halsizlik, boğazda yanma ve ağrı hissi, burun akıntısı, baş ağrısı, kas ağrısı, eklem ağrısı ses kısıklığı, gözlerde yanma vardır. Bazen mide ağrısı ve ishal gibi mide barsak şikayetleri görülebilir, bu tablo gastrik influenza olarak adlandırılır. İnfluenza A, B ve C tipi virüslerinin klinik belirtileri benzerse de İnfluenza A'nın etken olduğu infeksiyonlarda hastalık daha şiddetli seyrederek, süresi genellikle daha uzundur. İnfluenza B virüs infeksiyonları ise daha hafiftir. Hastanın yaşı da hastalığın seyrinde etkilidir. Bebeklerde ve kronik hastalığı olan yaşlılarda ağır seyrederek (10).

Çocuklarda krup, otitis media, sinüzit, viral pnömoni, sekonder bakteriyel pnömoni, kardiyak veya pulmoner hastalıklarda alevlenme, miyozit, nörolojik problemler, Reye sendromu, miyokardit ve ani ölüm gibi komplikasyonları vardır (1,10).

### **2.1.3.Laboratuvar tanı:**

Tüm virüslerin laboratuvar tanısında olduğu gibi en önemli işlem muayene maddesinin seçimi, alınması, uygun koşullarda laboratuvara ulaştırılmasıdır. İnsanlarda

virüs izolasyonu için nazofarengal yıkantı sıvısı veya aspirasyon sıvısı tercih edilir. Alt solunum yolu infeksiyonları için nazofarengal sürüntü veya yıkama sıvısı uygundur.

Hızlı tanı testleri, solunum sekresyonlarında virüs antijenlerinin gösterilmesi esasına dayanır. İnfluenza A ile B virusları için geliştirilen hızlı testlerde, virus ile infekte 20 hücre yada 2.000 virus partikülü varlığında pozitif sonuç elde edilebilir. Hızlı tanı testlerinin duyarlılığı % 40-100, özgüllüğü ise %52-100 arasında değişmektedir. Bu testlerin pozitif prediktif değerleri, influenza virusunun görece olarak daha nadir görüldüğü grip mevsiminin başlarında düşük olabilir. Hızlı testler klasik yöntemlerden daha düşük duyarlılığa ve spesifikliğe sahip olmalarıyla birlikte, hastaların tedavisinde hızlı sonuç sağladıkları için son zamanlarda kullanımları yaygınlaşmıştır (11).

Virüs izolasyonu embriyonlu yumurta ve hücre kültürleriyle yapılır. İnfluenza A ve B virüslerinin izolasyonu için örnekler, 10-11 günlük embriyonlu yumurtanın amniyotik sıvısına ekilir. Ekim yapılan yumurtalar üç gün süreyle 38°C'de inkübe edilip bu süre sonunda alınıp hemaglutinasyon yöntemiyle tanıya gidilir. Hücre kültürü yönteminde; Primer Rhesus Maymun Böbrek (PRMK) veya Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) hücre kültürleri kullanılır. İnfluenza virüsleri hücre kültürlerinde ürer ama belirgin sitopatik etki yapmazlar. Bu nedenle virusun üremesinin takibinde hemaglutinasyon, hemadsorbsiyon ve immünfloresans boyama yöntemleri gibi ek yöntemler kullanılır (11).

Serolojik tanı akut evrede ve 2-3 hafta sonra alınan iyileşme dönemi serumları arasında görülen dört kat veya daha fazla antikor artışının saptanması ile yapılır. Bunun için en çok Hemaglutinasyon İnhibisyon testi uygulanır. Ayrıca Kompleman Birleşmesi (KB), Double Immundiffusion (DID), Single Radial Diffusion (SRD) testleri de uygulanabilir. Son yıllarda influenza hemaglutinine karşı oluşan antikorları saptamada Enzyme Immunoassay (EIA) tekniği kullanılmaktadır. Bu tekniğin avantajı IgA, IgG ve IgM antikorlarını göstermesi olmuştur (12,13).

Moleküler Mikrobiyoloji yöntemleri de solunum sekresyonlarında virusun genetik maddesini göstermek için başka bir metottur. Nükleik Asit Hibridizasyon ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), influenza virüs RNA'sının saptanmasında kullanılan duyarlı ve özgül yöntemlerdir. Dünya Sağlık Örgütü tarafından İnfluenza A H1N1(swine origin) virusunun tanısına yönelik PZR protokollerinin güncellenmiş ve uygun primer prob ve pozitif kontrolleri içeren "Swine İnfluenza PCR Test Kiti" ulusal influenza merkezlerine

gönderilmiştir. 2009 H1N1 pandemik virusunun tanısı, ülkemizde referans laboratuvarlarında nazofarenksten alınan sürüntü örneklerinden PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yöntemi ile konulmaktadır (10,13).

#### 2.1.4. Tedavi ve korunma:

İnfluenza virüslerine karşı etkili antiviral maddelerden **amantadin** ve **rimantadin** İnfluenza A'nın profilaksisinde veya tedavisinde kullanılan iyon kanalı blokerleridir. Her iki madde de virüsün konak hücreye bağlanmasını, eğer bağlanmışsa girişini engellemektedir. Her iki antiviral de virüsün M<sub>2</sub> proteinine bağlanarak iyon kanalı oluşmasını inhibe etmektedir. 24-48 saat içinde kullanıldıklarında infeksiyon hafif seyretmektedir. **Zanamivir** ve **oseltamivir** ise nöraminidaz inhibitörleridir, hastalığın daha hafif geçirilmesini sağlarlar (1,3,14).

Mevsimsel influenza aşılı H1N1 ve H3N2 alt tiplerinden birer influenza A virüsü ile bir influenza B virüsü içermektedir. Bu aşılıların dolaşan influenza virüslerinin HA ve NA proteinlerindeki mutasyonları (antijenik drift) karşılayabilmesi için her 1-3 yılda bir yenilenmelerine gereksinim vardır (3).

İnaktive virüs aşılılarının influenzadan korunmada etkinlikleri kanıtlanmıştır. 60 yılı aşkın zamandır kullanılmaktadır. Tipik olarak dolaşımdaki virüsün HA ve NA segmentlerine sahip bir tohum virüs üretmek üzere reassortment yöntemi kullanılmakta ve virüsün geri kalan segmentlerini, embriyonlu tavuk yumurtalarında üremeyi sağlamak üzere H1N1 virüsünün segmentleri oluşturmaktadır. A.B.D'de 2-49 yaş arasındaki bireylerde kullanılmak üzere canlı atenüe bir influenza aşısı ruhsatlandırılmıştır. Canlı atenüe aşılılar hem humoral hem de hücresel bağışık yanıtı uyarırlar ve bu nedenle inaktif aşılılara üstün olarak kabul edilirler. Gerçekten de, bebekler ve küçük çocuklarda canlı atenüe influenza aşılıları inaktif aşılılardan daha iyi koruma sağlamaktadır, ama yan etkiler bazen bir sorun olarak ortaya çıkmaktadır (3).

Aşılının her yıl içeriği yeniden gözden geçirilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü tarafından 96 ülke ve 125 merkezden oluşan Küresel İnfluenza İzleme Ağı aracılığıyla, influenza aşı suşları seçimi amacına yönelik olarak influenza drift mutantların gelişimi ve göçleri izlenmektedir. Bu veriler Avrupa'daki 4 büyük laboratuvara gönderilir ve burada hemaglütinasyon inhibisyon testleri kullanılarak suşların antijenik özellikleri belirlenir. DSÖ yılda iki kez toplanarak Kuzey Yarımküre için Şubat ayında, Güney yarımküre için

Eylül ayında aşı içeriği önerilerini belirler. İnfluenza aşısı suş seçiminin ana bileşenleri halen dolaşımda olan suşlarla aşı suşları arasındaki örtüşmeyi değerlendirmek ve yeni ortaya çıkan varyantları tanımlamaktır. Her yıl saptanan influenza suşları esas alınarak ertesi yıl hazırlanacak aşının içeriği düzenlenmektedir. Son yıllarda uygulanan aşılarda içeriğinde iki kısım influenza A ile bir kısım influenza B suşu bulunmaktadır. Aşı bu tür hastalıkların ve influenza komplikasyonlarının sık görüldüğü risk gruplarına önerilmektedir (10).

## **2.2. PARAINFLUENZA VİRUSLAR:**

İnsan parainfluenza virüsleri (HPIV) ve kabakulak virüsü, Paramyxoviridae ailesinin üyesidirler. HPIV tipleri, Amerika'da çocuk ve erişkinlerde solunum yolu enfeksiyonlarına en sık neden olan patojenlerdendir. Pleomorfik, zarflı, orta büyüklükte helikal virüslerdir. Genellikle boyutları 150-250 nm arasında değişir. Tümü tek iplikli, negatif polariteli, segmentsiz RNA virüsleridir. 6 yapısal proteini vardır: Yüzey glikoproteinleri olan hemaglütinin nöraminidaz ve füzyon (F) proteini, fosfoprotein (P), nükleokapsid proteini (N), L proteini, membran proteini (M). Viral replikasyonda N proteini Viral RNA'ya bağlanır, L ve P proteinleri transkripsiyon ve replikasyonda yer alır. HN ve F yüzey glikoproteinleri M proteini ile karşılıklı etkileşime girer ve tamamlanmış nükleokapsidleri kendine doğru çekerek virüs proteinlerinin bulunduğu infekte membran alanında yeni virionların tomurcuklanma ile zarflanmasını sağlar. HN yüzey glikoproteinlerinin aynı zamanda konak hücrede siyalik asit reseptörüne tutunma fonksiyonu vardır ve F glikoproteini viral nükleokapsidin konak hücre membranına füzyonunu ve nükleokapsidin hücreye girmesini sağlar ve konak hücre enfekte olur (1,10).

HPIV'in dört serotipi vardır: HPIV 1-2-3 ve 4. 50°C' nin üzerindeki sıcaklıklarda, organik solventlerde, UV ışını, formolin, düşük pH'da ve kuru nemsiz ortamda inaktive olur. Bu virusları -70°C ve üzerinde dondurarak saklamak gerekir.

### **2.2.1. Epidemiyoloji ve bulaş:**

PIV büyük damlacıkların aerolizasyonu ve kontamine yüzeylere dokunma ile bulaştığı düşünülmektedir. Virüslerin, gözenekli yüzeylerde 10 saatin üzerinde canlılıklarını sürdürebildikleri gösterilmesine karşın deneysel olarak parmaklara yerleştirilen PIV-3'ün ilk 10 dakikada infektivitesinin %90'dan fazlasını kaybettiği bildirilmiştir. PIV-1 enfeksiyonları sıklıkla sonbaharda ve iki yılda bir epizodlarla



seyreder. PIV-2'nin insidansı genellikle PIV-1 ve PIV-3'den azdır. PIV-2, iki yılda bir veya her yıl, PIV-3 ise ilkbahar ve yaz aylarında her yıl görülür (1,10).

### **2.2.2. Klinik önemi:**

Parainfluenza virüsler (HPIV-1-2-3); bebek, çocuk ve erişkinlerde üst solunum yolu infeksiyonlarına neden olur. Oldukça ılımlı ve kendi kendini sınırlayan tipik bir klinik tablo oluşturur ve reinfeksiyonu sıktır. HPIV 6 ay ile 6 yaş arasındaki çocuklarda üst solunum yolu obstrüksiyonuna neden olan viral krup hastalığının en sık rastlanan etkenidir. Krup, inspiratuvar stridor, havlama tarzında öksürük ve ses kısıklığı ile karakterizedir. HPIV 1-2-3 Amerika'da 5 yaş altındaki çocukların alt solunum yolu infeksiyonlarının üçte birinden sorumludur ve viral alt solunum yolu infeksiyonları nedeniyle hastaneye yatırılan çocuklarda RSV'den sonra ikinci sıklıkta görülen virüslerdir (10). Toplumdan kazanılmış pnömoni nedeniyle hastaneye yatması gereken erişkinlerde en sık saptanan dört patojen arasında HPIV-1 ve HPIV-3 de bulunur. HPIV tipleri nazokomiyal solunum yolu infeksiyonlarının önemli bir nedenidir. HPIV-1 Amerika'da 7 ile 36 aylık çocukların oluşturduğu popülasyonda krup olgularının %50'si ile ilişkili bulunmuştur. HPIV-2; 5 yaşından küçük, bağışık durumu normal olan çocuklarda ortaya çıkan infeksiyonların yaklaşık %60'ında tipik alt solunum yolu infeksiyonuna neden olur ve özellikle 1-2 yaş arasında pik yapar. HPIV-2 bağışık yetmezlikli ve kronik hastalığı olan çocuklarda krup infeksiyonunun nedenidir. HPIV-3, 6 aydan küçük çocuklarda daha sık görülür ve genellikle yaşamın ilk yılında geçirilir. HPIV-2 ve 3 çocuklarda akut parotitise neden olur (15-17).

### **2.2.3.Laboratuvar tanı:**

IFA, virüs kültürü, seroloji ve moleküler yöntemler kullanılır. Nazofarengal aspiratta, immunfloresan antikor (IFA) yöntemiyle direkt virüs araştırılabilir. Birkaç saatte sonuç veren hızlı bir tekniktir. Virus kültürü yönteminde ise, ağız çalkantı suyu, boğaz veya burun sürüntüsü Afrika Yeşil Maymun Böbrek (PMKC) hücre kültürlerine ekilerek etken virüs üretilir. Virüsün üremesi, sitopatik etkinin varlığı gözlemlenerek ve immunfluoresan antikor yöntemi uygulanarak belirlenir. Serolojik tanı, akut ve konvelesan kan serumları kullanılarak yapılır. Dört kat antikor artışının gösterilmesi anlamlıdır. Antikor yanıtı nötralizasyon, hemaglutinasyon-inhibisyon ve ELISA yöntemleriyle saptanır (1).

#### **2.2.4. Tedavi ve korunma:**

Semptomatik tedavi uygulanmaktadır. Ribavirin hem in vivo hem de in vitro etkilidir. Aşı çalışmalarında, formalinle inaktive parainfluenza aşısı ile serum antikor seviyelerinde yükselme saptanmış, ancak aşının koruyuculuğu yeterli bulunmamıştır. Virulansı azaltılmış suşlarla yapılan aşı çalışmaları devam etmektedir.

**2.3. RESPIRATUVAR SİNSİTYAL VİRUSLAR (RSV) :** Paramyxoviridea ailesinden Pneumovirüs cinsine aittir. Hemaglütinin ve nöraminidaz aktivitesi yoktur. Bu virüsün adı, hücre kültürlerinde karakteristik çok çekirdekli dev hücreleri (syncytia) oluşturmasından kaynaklanır.

Tek zincirli, negatif polarite özelliği olan zarflı bir virüstür. Nükleokapsid ile bağlantılı üç protein vardır. P (phosphoprotein) ve L (polymerase veya large) proteini, transkripsiyon ve replikasyonda yer alırken N (nucleoprotein), nükleokapsid için ana yapısal protein olarak görev alır. Virüs zarfında ise beş viral protein bulunur. M (matrix), M2, F( fusion), G (glycosile) ve SH.

RSV, çevresel değişikliklerden en çok etkilenen patojenlerden biridir. Beş dakika süreyle 55°C'ye maruziyet sonrası RSV'nin sadece %10'u canlı olarak kalır. Her dondurma-çözdürme sonrası RSV enfektivite titresi yaklaşık %90 etkilenirken, RSV zayıf asit ortam ve optimal 7.5 pH'da dayanıklıdır. Eter, kloroform ve % 0.1 sodyumdeoksilat, sodyumdodedyl sulfat ve Tritron-X 100 gibi çeşitli deterjanlar ile virüs çabucak inaktive olur. RSV'nin depolanma süresi bir alkol ve kuru buz banyosu içinde ani dondurma ve gliserin veya sukroz gibi stabilize edici ajanların ilavesiyle arttırılabilir. Hasta sekresyonlarındaki RSV oda ısısında ve neme bağlı olarak geçirgen olmayan yüzeyde 3-30 saat gibi bir süre canlılığını devam ettirebilir (1).

#### **2.3.1. Epidemiyoloji ve bulaş:**

RSV, infant ve küçük çocuklarda, bronşiolit ve pnömoninin en yaygın sebebidir. Hemen hemen tüm çocuklar üç yaşına gelinceye kadar infekte olurlar. RSV ile tekrarlayan infeksiyon yaygındır ve yaş grubuna göre korunma görülmez. Büyük çocuklarda ve immünkompetan erişkinlerde RSV infeksiyonu nadiren ağırdır ve genellikle üst solunum yolu infeksiyonu veya trakeobronşit gibi manifestasyonlara neden olur (18). Prematüre infantlar, pulmoner hipertansiyon ile komplike kalp hastalığı veya kronik akciğer hastalığı olan bebekler, immünkompromize kişiler ve yaşlılar ciddi RSV infeksiyonu için yüksek

risk grubunu oluştururlar. Kentsel merkezlerde yıl içinde yağmurlu dönemde, kışın ve erken ilkbahar döneminde salgınlar görülür. Tropikal ve subtropikal bölgelerde yağmur sezonu boyunca epidemiler yapmaktadır (18-20).

### **2.3.2. Klinik nemi:**

RSV ile en sık oluşan sendromlar bronşiolit ve pnömonidir. Bronşiolitte 3-5 günlük bir üst solunum yolu infeksiyonunu "wheezing" in eşlik ettiği tablo takip eder. Sağlıklı hastalarda RSV ile infeksiyon ağır seyirli olabilir ancak bu hastalar tamamen iyileşirler. Respiratuvar, kardiyak hastalıkları olan ve bağışıklık yetersizliği olan hastalarda mortalitenin %37'ye kadar yükseldiği bildirilmiştir. Yaşlıların RSV infeksiyonunda da mortalite ve morbidite yüksektir (1,21).

### **2.3.3. Laboratuvar tanı:**

Kullanılan 4 farklı yöntem vardır: 1. Hücre kültüründe virüs izolasyonu 2. Srntlerden elde edilen hücrelerde İmmunfloresans testi 3. Nasofarengeal mukus içindeki antijenin enzim immunoassay ile aranması 4. Moleküler yöntemler.

Hücre kültüründe virüs üretilip izole edilebilir. He La, Hep-2 ve Vero hücreleri bu amaçla kullanılabilir. RSV Hep-2 hücre kültüründe çok nükleuslu dev hücreler oluşturur ve bu sitopatik etki RSV için karakteristiktir. Deneyimli bir göz erken evre sitopatolojik etkiyi 3 ile 5. günler tespit etmesine rağmen, karakteristik sinsiyanın görülmesi 10. güne kadar uzayabilir. Erken sitopatolojik etkinin ortaya çıkışından sonra gerçekleştirilen immunofloresan boyama kesin teşhiste yararlıdır. Parainfluenza ve kızamık virüsleri de sinsiyum oluştururlar ama RSV için kullanılan Hep-2 ve Vero hücrelerinde sinsiyum oluşurmaları nadirdir (13).

RSV suşları A ve B gruplarına ayrılmaktadır. Daha sonra G proteinlerine özgül monoklonal antikorlar kullanılarak EIA yardımıyla farklı altgruplara ayrılır.

PZR gibi in vitro nükleik asit amplifikasyon (NAA) testleri RSV tanısı için klinik laboratuvarlarda kullanılır. NAA testlerinin, genel olarak yüksek duyarlılık ve özgüllükleri sayesinde rutin tanı metotlarına üstünlüğü gösterilmiştir. Geliştirilmiş NAA bazlı testler için hedefte ana olarak RSV N geni kullanılmaktadır.

### **2.3.4. Tedavi ve korunma:**

Tedavide destekleyici tedavi kullanılır. Aerosol şeklinde uygulanan **ribavirin** yararlı bulunmuştur. Hem tedavi hem de profilaksi için immunglobulin kullanılmaktadır. Canlı attenüe virüs aşısı denenmiş ama başarılı olmamıştır.

**2.4. HUMAN METAPNEUMOVİRUS (HMPV):** İnsan metapnömovirüsü (HMPV), Paramiksoviridae ailesinden bir RNA virüsüdür ve RSV ile ilişkili Pneumoviridae ailesinin alt grubunun bir parçasıdır ve 2001 yılında tanımlanmıştır. Daha sonraki araştırmalar virüsün dünyada çocuklar arasında özellikle 2-9 yaş grubunda yaygın olarak bulunduğunu, toplumdan kazanılan akut solunum yolu infeksiyonlarına neden olduğunu, yenidoğanda RSV ile ko-infeksiyon oluşturup bronşiolitin ağırlaşmasında rol oynadığını göstermektedir. Paramiksoviridae 2 alt gruba bölünür; Pneumovirinae ve Metapneumovirüs. Kuşlara ait pnömovirüsler yüksek derecede HMPV ile ilişkilidir. Filogenetik olarak RSV, HMPV'ye en yakın insan virüsüdür. Hindi veya tavukları enfekte etmez; tek bilinen konak insandır (1,10, 22).

Zarflı, respiratuvar virüs olup tek zincirlidir ve segmentli değildir, negatif RNA genomuna sahiptir. İnsan ve hayvan RSV virüsleriyle ilişkili olmasına rağmen nonsegmente gen diziliminde farklılık gösterirler ve RSV genomunun 3' ucunda lokalize olan yapısal olmayan protein NS1 ve NS2'den yoksundurlar.

#### **2.4.1. Epidemiyoloji ve bulaş :**

HMPV salgınları, kışın geç dönemi ve ilkbaharın erken dönemi boyunca yıllık epidemilerde ortaya çıkar ve genellikle yıllık RSV epidemilerinin bir kısmı ve tamamıyla çakışır. Uzun dönem çalışmalar tüm yıl boyunca sporadik infeksiyonların ortaya çıktığını göstermektedir. İnkübasyon periyodunun 3-5 gün olduğu düşünülmektedir. İnfeksiyonun tek kaynağı insandır. Geçiş şekli, geniş partiküllü aerosollerini içeren kontamine sekresyonlar veya kontamine yüzeylerle direk veya yakın temas ile olur. Nazokomiyal infeksiyonlar bildirilmiştir. Kemik iliği transplantasyonu yapılan hastalarda, pnömoni ve solunum yetmezliğine bağlı ölüm görülmüştür (10,23).

Yaşlılarda, kistik fibrozis ve altta yatan immünyetmezliği olan yetişkinlerde ciddi solunum yolu infeksiyonlarına neden olur. Yapılan çalışmalarda HMPV pozitif hastaların %25 ve %50'sinde altta yatan hastalığın olduğu gösterilmiştir. Özellikle çocuklarda belli gruplarda (prematürite hikayesi olanlar, konjenital kalp hastalığı olanlar ve immün yetmezliği olanlar) infeksiyon daha ağır seyrederek (24).

#### **2.4.2. Klinik önemi:**

HMPV klinik belirtileri RSV ile benzerdir. Hastalık, hafif solunum yolu yakınmalarından, ağır öksürük, bronşiyolit ve pnömoniye kadar değişen klinik tablolar yapabilmektedir. Dolayısı ile bazı hastalarda hastaneye yatış ve mekanik ventilasyon gerekmektedir. Özellikle immunkompromize hastalarda ciddi pnömonilere sebep olur. Hematolojik malignensisi olup kemik iliği transplantasyonu yapılan çocuk hastalarda veya organ transplantasyonu yapılan hastalarda ölüme yol açan pnömonilere sebep olduğu gösterilmiş ve bu hastalarda RSV ile koinfeksiyonların da sık olduğu bildirilmiştir (25-27).

#### **2.4.3. Laboratuvar tanı:**

HMPV hücre kültürlerinde güç üremektedir. Hızlı antijen tespitini sağlayan kit geliştirme çalışmaları devam etmektedir. Seroloji retrospektif tanıyı sağlamaktadır, bu nedenle erken tanısı PZR ile yapılmaktadır.

Klinik örneklerde HMPV belirlenmesinde en sensitif test RT-PZR'dir. Bu test PZR polimerlerini polimeraz L geni ile hibritleştirir ve L geninin PZR ürününün nükleotid zinciri virüsü belirlemek için kullanılır. Sonuç olarak RT-PZR testleri özellikle duyarlılık ve özgüllüğü sağlayan N genini hedef alır (28,29).

HMPV, RSV tanısında kullanılan Hep-2, Madin-Darby köpek böbrek hücreleri gibi geleneksel hücre kültürlerinde zayıf ürerler. LLC-MK2 ve Vero tek tabaka hücre kültürlerinde daha iyi izole edilebilir. Oluşan sitopatojenik etki, RSV'nin sitopatolojik etkisine benzer ama daha geç ortaya çıkar.

#### **2.4.4. Tedavi ve korunma:**

Henüz spesifik tedavisi yoktur. Semptomatik tedavi veya solunum desteği uygulanabilir. İn vitro çalışmalar poliklonal immunglobulin ve ribavirin ile kombine tedavinin uygulanabileceğini göstermektedir. Aşısı yoktur (30).

#### **2.5. HUMAN RİNOVİRUSLAR:**

İnsan rinovirüsleri (HRV) Picornaviridae ailesinde yer alan bir cinstir. Aynı ailede insanlar için patojenik olan üç cins daha mevcuttur: *Enterovirüs*, *Parechovirüs* ve *Hepatovirüs*. Rinovirüs ismi replikasyon ve oluşturduğu hastalıkların semptomlarının sıklıkla burunda görülmesinden kaynaklanmaktadır. Günümüzde nötralizasyon testlerine

dayalı olarak 100'den fazla serotip tanımlanmıştır. Bağlandıkları reseptöre bağlı olarak rinovirüsler iki gruba ayrılmaktadır. Hücrelerarası adezyon molekülü 1 (ICAM-1), bilinen HRV serotiplerinin yaklaşık %90'ının bağlandığı hücre reseptörleridir. ICAM-1 çok farklı hücrelerin yüzeyinde bulunmaktadır. ICAM-1 için doğal ligant lenfosit fonksiyonu ile ilişkili antijen (LFA-1)dir. Rinovirüs enfeksiyonu sırasında salgılanan sitokinlerin ICAM-1 ekspresyonunu artırarak virüsün yayılımını kolaylaştırdığı, hücrel immunitenin enfeksiyonun kontrolünde rolünün olmadığı bildirilmiştir (1,16).

Virüs diğer RNA virüslerinde olduğu gibi konak hücrenin stoplazmasında çoğalır. Rinovirüs tek zincirli, zarfsız ve ikozahedral yapıda bir nükleokapside sahiptir. Kapsid protein genleri VP-1 ve VP-4 olmak üzere dört protein alt ünitesi olan 60 protomerik ünitelerden oluşmaktadır. Virüsün dış yüzeyinde bulunan VP-1, VP-2 ve VP-3 virüsün protein kılıfını oluşturur. Lipid yapıda bir zarfları olmadığından eter, kloroform, etanol ve %5 fenol gibi organik çözücülerde inaktivasyona oldukça dirençlidir. Rinovirüsler göreceli olarak termostabil olmakla birlikte 50-56°C de enfektivitesi giderek düşer. Rinovirüsler pH 3'te oda ısısında 3 saat kaldıklarında enfektivite kaybına uğrarlar. Bu özellikleri klasik olarak Enterovirüslerden ayırımında kullanılır. Ancak bu özellik tüm serotiplerde ve suşlarda geçerli olmayabilir (10,31).

### **2.5.1. Epidemiyoloji ve bulaş:**

Rinovirüs enfeksiyonları ılıman bölgelerde yıl boyunca görülür. Eylül ayında pik yapar, ikinci pik baharın sonlarında görülür. Mevsimsel değişiklikler yaşam bölgelerinde artan nemlilik ve sonbaharda okulların açılmasıyla birlikte çocukların bir araya toplanması gibi rinovirüslerin yaşamasını ve yayılmasını kolaylaştırıcı ortamların oluşmasına bağlı olabilir. Serotiplerin prevalansı yıldan yıla değişebilir. Virüsün burun ve konjunktivaya inokülasyonu enfeksiyonun başlamasında en etkili yoldur.

**2.5.2. Klinik önemi:** Rinovirüs semptomları bol sulu akıntı, nasal konjesyon, hapşırık, baş ağrısı, hafif boğaz ağrısı, öksürük, hafif ateş ile karakteristik olan semptomlar yaklaşık 7 gün devam eder. Bebek ve küçük çocuklarda solunum sıkıntısı yaşanabilir. Soğuk algınlığı olgularının yaklaşık üçte ikisinin nedeni rinovirüslerdir. Son yıllarda HRV'nin astım alevlenmelerinin ana viral nedeni olduğu anlaşılmıştır. Ciddi astım alevlenmelerinin uzamış HRV enfeksiyonuyla ilgili olduğu hakkında çalışmalar vardır (32). Moleküler tanı yöntemlerinin kullanılmaya başlanmasıyla birlikte özellikle çocuklarda, okul çağındakilerde, yaşlılarda ve bu yaş grubundaki kronik hastalıklarda, kanser,

immunsupresif hastalıklar veya organ naklinde veya pulmoner hastalık zemininde görülen alt solunum yolu infeksiyonlarının etyolojisinde önemli olduğu anlaşılmıştır (33).

### **2.5.3. Laboratuvar tanı:**

Serum veya nasal yıkama sıvısındaki antikorları ölçmek için standart serolojik yöntem olarak nötralizasyon testi kullanılır. Serolojik testlerin ticari kitleri yoktur.

Virüs kültürü yapılabilir. Sadece insan ve maymun kökenli hücrelerde ürerler. Duyarlı insan embriyonu akciğer fibroblast (HELFL) serisi kullanıldığında suşların elde edilmesinde çok iyi sonuçlar elde edilmiştir. Klinik laboratuvarlarda en sık kullanılan hücreler HELFL serileri WI 38 ve MRC 5'tir. İnsan embriyonu böbrek (HEK) hücrelerinde de rinovirüsler replike olabilirler. Sitopatolojik etkiler 24-48 saat sonra ortaya çıkmaya başlar ve 4. gün tamamlanır. Mikroskopide hücrelerde irili ufaklı yuvarlaklaşma, merkezinde piknotik çekirdekleri olan refraktil hücreler ve hücresel artıklar görülür (10,13).

PZR, hücre kültür yöntemlerinden daha duyarlı ve daha hızlıdır. Virüsün 52-NCR değişken bölgesine ait PCR işlemi yapılır. Multipleks PZR yöntemiyle de diğer solunum yolu örnekleri saptandığı gibi rinovirüsler de saptanabilir(1).

### **2.5.4. Tedavi ve korunma:**

Spesifik bir tedavisi yoktur. Hastalık tablosu ağır olmadığı için aşı çalışması için zorunluluk yoktur. En iyi korunma yöntemi, salgınlarda dikkatli olma, el yıkama ve kontamine objelerin dezenfeksiyonudur.

## **2.6. KORONAVİRUSLAR:**

Coronaviridae familyasına dahildirler. Pozitif zincir RNA genomuna sahip zarflı virüslerdir. Tüm RNA virüsleri içinde genom yapısı en iyi bilinen virüslerdir. Koronavirüs partikülleri yaklaşık 60-220 nm büyüklükte ve düzensiz görünümündedir. Koronavirüs ismi virüsün görüntüsünün taca benzetilmesi nedeniyle verilmiştir. Tek zincirli, segmentsiz RNA virüsleridir (1,10).

Zarfta üç glikoprotein yer alır. S protein; majör antijendir, reseptör bağlama ve hücre füzyonundan sorumludur. E protein; virüs zarfı ile ilişkili küçük proteindir. M protein;

virüsün tomurcuklanarak zarfını almasında rol oynayan membran proteindir. HE protein ise hemaglütinin esterazdır.

Çoğu insan koronavirüsleri hücre kültüründe üremez, ancak 229E ve OC43 suşları bazı hücrelerde üretilebilir. Replikasyon influenza virüsünde olduğu gibi yavaştır. İnsanlarda infeksiyon oluşturan beş koronavirüs türü vardır. Bunlar: OC43, 229E, SARS-Koronavirüs (SARS-CoV), NL63 ve HKU1 suşlarıdır (1,10).

Koronavirüsler hayvanlarda yüksek mutasyon oranına sahiptir. Bu mutasyonlarla konak yelpazesi ve hastalık tabloları değişebilir. Solunum ve gastrointestinal sistem hastalıklarına neden olurlar. Tüm koronavirüsler stoplazmada replike olurlar ve stoplazmik membrandan tomurcuklanırlar. Virion salınımı hücre ölümü sonrasında membran füzyonu ve ekzositoz ile olur.

### **2.6.1. Epidemiyoloji ve bulaş:**

Koronavirüslerin çoğu hayvanlarda tanımlanmıştır ve çoğunda bu virüsler başka türlere geçmezler. Akut solunum yetmezliği sendromu (severe acute respiratory syndrome-SARS) 2002 sonbaharında Çin'de ortaya çıktı ve SARS-Koronavirüs etken olarak tanımlandı. SARS-koronavirüsün genomik analizi yapılmış, daha önce insanlarda bulunmayan yeni bir koronavirüs olduğu görüldü. 2002 yılında Çin'de pnömoninin potansiyel ölümcül sebebi olarak ortaya çıktı. 6 ay içinde SARS 29 ülkeye yayılarak 8000 kişiyi enfekte etti ve 775 kişinin ölümüne sebep oldu. Bulaşma şekilleri damlacık infeksiyonu, aerosolizasyon ve infeksiyon nakletme özelliği olan cisimlerdir (34-36).

### **2.6.2. Klinik önemi:**

Koronavirüsler, erişkinlerde çoğunlukla soğuk algınlığı benzeri semptomlar ile hafif, kendini sınırlayan üst solunum yolu infeksiyonuna neden olurlar. Diğer solunum yolu ile bulaşan virüsler gibi koronavirüsler de öksürük ile beraber soğuk algınlığı, burun akıntısı ve ateşten, bronşiyolit ya da pnömoni ile birlikte alt solunum yolu infeksiyonuna kadar değişen geniş bir yelpazede semptom ve bulgulara neden olabilirler (37).

### **2.6.3. Laboratuvar tanısı:**

SARS-CoV (Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus) antikorunun saptanması için altın standart test, nötralizasyon testidir. ELISA, koronavirüslerin N ve S proteinlerine karşı oluşmuş antikorlarını tespit eder ve nazofaringeal aspirat veya nazal



eküvyonlarla alınan materyaller kullanılır. Western Blot yönteminde de N ve S bantları gösterilebilir.

Koronavirüslerin hücre kültürlerinde üretilmesi zordur. OC-43 suşları orijinal olarak insan embriyonik trakea veya nazal epitel organ kültürlerinden izole edilmiştir. Sitopatolojik etki olarak granüler hücre odakları ve hücre parçalanmadan vakuolleşme tespit edilebilir. Bazı hücrelerde sinsitya oluşumu görülebilir.

Moleküler yöntemler yüksek duyarlılıkları ve hızlı olmaları nedeniyle tercih edilen yöntemlerdir.

#### **2.6.4. Tedavi ve korunma:**

Koronavirus enfeksiyonlarının spesifik bir tedavisi yoktur.

### **2.7. ADENOVİRUSLAR:**

Adenoviridae ailesinin üyesidirler. Zarfsız, ikosahedral, DNA virüsleridir. Protein kapsid 252 kapsomerden oluşur. Kapsid yapısal olarak hekzon, penton ve fiberlerden oluşur. Kapsomerlerin 240 tanesi hekzonlardan oluşmuştur. On iki köşe ise pentonlarla kaplanmıştır. Penton bazlı kapsomerlerden, uçlarında topuz şeklinde oluşumlar bulunan fiber adı verilen iplikçi yapılar çıkar. Fiberler, virüsün konak hücreye tutunmasından ve hemagglütinasyondan sorumludur. Hekzon, penton ve fiberler virüsün sınıflandırılmasında ve hastalığın tanısında önemli olan majör adenovirüs antijenlerini oluştururlar.

Günümüzde adenovirüslerin en az 47 farklı serotipi bilinmektedir. Adenovirüsler genom homolojisi temel alınarak altı gruba (A-B-C-D-E-F) ayrılmıştır. Belirli serotipler özel doku tropizmi gösterir ve spesifik hastalık tabloları oluşturur. Grup A en yüksek onkojenite gösteren adenovirustur (1,10,38).

#### **2.7.1. Epidemiyoloji ve bulaş:**

Adenovirüsler, genellikle yaşamın ilk yılında enfeksiyon oluştururlar. 10 yaşına kadar kişilerin çoğu, bir veya daha fazla serotiple infekte olmuştur. Tüm enfeksiyonların yaklaşık yarısı asemptomatiktir. Hastalık paternleri, serotipe ve konağın tipine göre değişir. Solunum yolu enfeksiyonlarına, genellikle B, C ve E türleri neden olurken, 1,2,5 ve 6 serotipleri endemik enfeksiyonlara, 4,7,14 ve 21 serotipleri çoğunlukla kıştan erken yaza

kadar küçük epidemilere neden olur. Serotip 3,4 ve 7'nin küçük salgınları, kontamine yüzme havuzu suyuyla ilişkili olarak yaz döneminde oluşur.

Bulaşma başlıca solunum veya fekal-oral yollarıdır. Adenovirüsler üst solunum yolu infeksiyonu olan yetişkinlerin boğaz ve respiratuvar sekresyonlarından bir hafta süreyle ve gözden ise iyileşmeden sonra birkaç hafta süreyle izole edilebilir. Çocuklar, nonenterik adenovirüsleri, özellikle düşük numaralı serotipleri, solunum yolu hastalığı veya jeneralize hastalığın ardından, 3 ile 6 hafta süreyle, boğazda veya dışkıda yayarlar. Bir adenovirüs infeksiyonunun ardından, 18 ay veya daha uzun bir süre boyunca, çocukların dışkılarından, aralıklı olarak virüs izole edilebilir (39).

### **2.7.2. Klinik önemi:**

Adenovirüslerle ilişkili hastalıkların spektrumu, birçok serotiplere ve bunların ayrı doku tropizmlere bağlı olarak çok geniştir. Çoğu infeksiyon, solunum yollarını, gözleri ve gastrointestinal yolu etkilerken, idrar yolları, kalp, merkezi sinir sistemi, karaciğer, pankreas ve genital yol tutulumuyla daha az ilişkilidir. Solunum yolu infeksiyonlarının çoğu, yaşamın ilk yıllarında görülür, kendi kendini sınırlar ve hafiftir. Ateş, burun tıkanıklığı, nezle, farenjit, boyunda adenopati ve öksürük olur. Klinik olarak A grubu streptokok infeksiyonundan ayırt edilemeyen bir eksudatif tonsillit tanımlanmıştır. Bu tablodan genellikle adenovirüs 1-7 sorumludur. Akut Respiratuvar Distres Sendromu (ARDS) ateş, farenjit, servikal adenit, öksürük ve baş ağrısı ile karakterize bir hastalığın adıdır. Toplu asker alımı kamplarında epidemi şeklinde görülebilir. Tip 4 ve 7 en sık sorumlu tutulmaktadır (13).

Pnömoni genellikle şiddetli ve sıklıkla fataldir ve yaygın serotiplerin herhangi biriyle infekte genç çocuklarda gelişir. Özellikle tip 3 ve 7 sorumlu tutulmaktadır. Vaka ölüm oranları oldukça yüksek olabilir ve ciddi bronşiyolit ve bronşektazi gelişebilir (13).

Bazı infeksiyonlar hafif klinik tabloya neden olurken, bazıları hastaneye yatırılmayı gerektirir ve bronşiyolitis obliterans (BO) gibi uzun dönem sekelleri ortaya çıkar. BO, çocukluk çağında geçirilen viral ASYE'nin en önemli geç komplikasyonudur. Özellikle adenovirüslerin etken olduğu bazı hastalarda, süregen inflamasyon nedeniyle bronş duvarında geri dönüşümsüz anjiyofibröz değişiklikler meydana gelmektedir. Tüm bu değişiklikler bronşiyoler lümene yayılarak, hava yolu hiperreaktivitesi, obliterasyon, arteriyel obliterasyon ve parankimal atrofi ile karakterize hava yolu duvarı yapısının

bozulmasına yol açabilir. Yüksel ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ASYE etkeni olarak en sık RSV ve adenovirüs saptanmış ve hastaların %7.3'ünde infeksiyon sonrası bronşiyolitisi obliterans geliştiği gösterilmiştir. Dolayısıyla ASYE'nin viral etyolojisinin belirlenmesi, prognoz tahmin edilmesi ve izlemin planlanmasına yardımcı olabilir (24).

Faringokonjunktival ateş salgınları halinde ortaya çıkma eğilimindedir. Örneğin, çocukların yaz kamplarında yüzme havuzu konjunktiviti adı verilen infeksiyon, farenjit, ateş ve baş ağrısı ile beraber görülebilir. Adenovirüs tip 3,4 ve 7 en yaygın etyolojik etkenlerdir. Epidemik keratokonjunktivit daha şiddetli bir göz infeksiyonudur. Foliküler konjunktivit olarak başlar ve keratite doğru ilerler. Yüksek oranda bulaşıcıdır. Adenovirüs tip 8 ve 37 sorumludur.

Adenovirüsler genitoüriner infeksiyonlardan da sorumlu olabilir. Servisit ve üretrit, tip 37 ile gerçekleşen venereal infeksiyonların yaygın belirtileridir. Genç erkek çocuklarında görülen sistit tip 11 ve 21 tarafından oluşturulur. Akut hemorajik formunda sistit, hematüri ve dizüri sıktır.

Adenovirüs serotip 40 ve 41'in gastroenterit tablosundan sorumlu olduğu ve kreşlerde meydana gelen gastroenterit salgılarından izole edildiği bildirilmiştir (16).

### **2.7.3. Laboratuvar tanısı:**

Enzim immunoassay (EIA) dışkıdaki veya nazofarengeal salgıdaki çözünür antijenlerin tesbitinde tek teşhis metodu olarak ortaya çıkmaktadır. Bütün adenovirüs serotiplerinde ortak olan bir hekszon epitopuna özgü bir monoklonal antikor ailenin identifikasyonunda yeterli olmaktadır. Ticari olarak kitleri de mevcuttur.

Hücre kültürlerinde üretilmesi zaman alıcı bir metottur. HeLa, Hep-2, KB veya A-549 gibi insan malignan hücreleri bu amaçla kullanılan hücrelerdir. 1-2 hafta içinde sitopatolojik etki görünmeye başlar. Hücreler şişer, yuvarlaklaşır ve ışığı yansıtır hale gelir. Ayrıca üzüm salkımı gibi bir araya gelir ve boyamada karakteristik bazofilik intranükleer inklüzyonlar görülür. Bir izolatin adenovirüs olarak doğrulanması fikse edilmiş hücre tabakası üzerinde gerçekleştirilen immünfloresan boyama ile yapılabilir.

### **2.7.4. Tedavi ve korunma:**

Kontrol ve korunma amacıyla uygulanan çeşitli yöntemlerin arasında konakçının immunizasyonu en etkin yoldur. Antiviral ilaçların bir önemini olmadığı görülmüştür.

Adenoviral aşı çalışmaları, ekonomik zararları ve iş gücü kaybı nedeniyle en çok askeri topluluklarda yapılmıştır. İnsan fibroblastlarında üretilen iki önemli serotip 4 ve 7 kombine edilerek canlı aşı hazırlanmıştır. Bu virüsler intestinal kanalda çok az veya hiçbir müdahale olmadan ürer.

## **2.8. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR):**

İn vitro kimyasal bir reaksiyondur ve hedef nükleik asit ve dizinin sınırsız sentezine olanak sağlamaktadır. Bu işlem uygun koşullarda DNA zincirini kopyalayabilen DNA polimeraz aktivasyonuna bağlıdır. Bir PZR reaksiyonu hedef DNA, iki oligonükleotid primer, ısıya dayanıklı DNA polimeraz, eşit olarak karıştırılmış deoksiribonükleotid trifosfatlar (dNTP, dATP, dCTP, dGTP ve dTTP), MgCl<sub>2</sub>, KCl ve bir Tris-HCl tampon içermektedir. Kullanılacak iki primer dizisinin amplifiye olacak çift zincirli DNA dizisine uygun ve tipik olarak yüzden birkaç yüz baz çifte kadar değişebilen büyüklükteki hedef zinciri çevreleyen özellikte olması gerekir.

PZR işleminin başında karışım hedef DNA'nın iki zincirinin birbirinden ayrılması için ısıtılır ve sonrasında diziyeye spesifik primerlerin hedef DNA'ya yapışması için ısı düşürülür. DNA polimeraz enzimi daha sonra bağlanmış olan primeri 3' ucundan başlayarak uzatır. Uzunmuş primer uzantıları ısıtılma ile hedef DNA'dan ayrılır. İşlem tekrar başa döner ve orijinal hedefler gibi her bir ürün bir sonraki aşamalarda oluşacak bağlanma ve uzamalarda kalıp olarak kullanılmaktadır.

Her bir siklusun sonunda PZR ürünleri teorik olan çift zincir şeklinde olacaktır. Böylece hedef dizi reaksiyonu sonunda 2<sup>n</sup> kat amplifiye edilmiş olacaktır. Tüm işlemler siklus sayıları, reaksiyon karışım tutulacağı zaman ve ısı ayarlarını kontrol eden thermal cycler denilen cihazda gerçekleşmektedir. İdeali 20 siklus sonundaki 10<sup>6</sup> katlık amplifikasyona ulaşma ve 30 siklus sonunda 10<sup>9</sup> katlık amplifikasyon oluşmasıdır.

Moleküler hibridizasyon yöntemlerinin yüksek duyarlılıkları nedeniyle virolojide kullanımları artmaktadır. Bu yöntem kullanılarak, viruslar klinik örneklerden direkt olarak saptanabilmektedir. İnfluenza A virus RNA'sı hibridizasyon yöntemi kullanılarak, nazofarinks sürüntü örneklerinden %72 duyarlılıkla saptanabilmektedir. Bununla birlikte moleküler hibridizasyon yönteminin rutinde kullanımı çok yaygın değildir (40).

Yapılan moleküler yöntem çalışmalarında, revers transkriptaz PZR (RT-PCR)'nin hasta tanısında doğru ve hızlı sonuç verdiği ve influenza vakalarının tespitinde kullanılan

seroloji ve hücre kültür yöntemlerinden daha duyarlı olduğu tespit edilmiştir. RT-PZR yöntemi ile dolaşımda olan virusların identifikasyonu ve karakterizasyonu yapılabilmektedir. RT-PCR yönteminde, bir reverse transkriptaz enzimi ve DNA primeri kullanılır. mRNA ve viral RNA gibi RNA hedef dizilerinin amplifikasyonu amacıyla kullanılır. İnfluenza sürveyans çalışması boyunca toplanan örneklerde RT-PZR izolasyon, EIA ve IFA gibi yöntemler karşılaştırılmıştır. Bu çalışmalardaki RT-PZR metodlarının sonuçları, RT-PZR'ın influenza virus tespiti için kullanılan klasik yöntemlerden daha duyarlı olduğunu ortaya koymaktadır. Solunum yollarında infeksiyon yapan patojenlerin kültürde üretilmesinde zorluklar vardır, bu nedenle solunum yolu örneklerinde tanı için moleküler tekniklerin kullanımı, salgınlarının izlenmesinde özellikle değerlidir (11).

Mikrobiyolojide PZR, insan hastalıklarının incelemesinde en büyük etkiyi viroloji alanındaki uygulamalar ile göstermiştir. Multipleks PZR, tek bir reaksiyon tüpünde çoklu viral genotiplerinin ayrılmasını sağlamaktadır. Direk virüs çalışmalarında virüsü tanımlar. Kronik hastalıklar (sarkom, karsinom, servikal intra epitelyal neoplasm gibi) ile virüsler arasındaki direkt veya indirekt ilişkiyi saptamada yardımcı olur.

Viral yükü belirlemek, bazı viral infeksiyonlarda önemlidir. Aktif infeksiyonun büyüklüğü ve antiviral tedavilerin etkisi viral yükteki değişimle takip edilir. Hastalığın ciddiyeti ile viral yük bağlantılıdır. PZR kantitasyonunun kullanımının, hastalığın ilerlemesinde, viral reaktivasyonun veya sürekliliğin belirlenmesinde bir çok yararı olmuştur.

Moleküler yöntemlerin tanısal mikrobiyolojide kullanımının 3 amacı vardır: Sonucun hızlı alınması, konvansiyonel yöntemlerle saptanamayan mikroorganizmaların saptanması ve test duyarlılığının yüksek olması.

**2.8.1. Multipleks PZR:** İki veya daha fazla primer çiftleri farklı hedefleri amplifiye etmek için aynı reaksiyon karışımında bulunmaktadır. Bu yöntemde birden fazla hedef dizisi tek bir tüpte çoğaltılabilmektedir. Bu reaksiyonda seçilen primerlerin aynı yapışma ısısına sahip olması ve dikkatli bir biçimde seçilmesi gerekmektedir. Multipleks PZR yöntemi tek primer setli PZR yöntemine göre daha karmaşıktır ve santral sinir sistemi ve solunum sistemi patojenlerini tespit etmek için kullanılır. Multipleks PZR yöntemi aynı klinik örnek içindeki farklı mikroorganizmaların tanısı için kullanılabilceği gibi, aynı mikroorganizmanın farklı hedef bölgelerini saptayabilmek için de kullanılabilir (1).

### **3.GEREÇ VE YÖNTEMLER:**

Viral solunum yolu etkenlerini belirlemeyi amaçlayan bu çalışmaya, Ekim 2010 ile Nisan 2011 ayları arasında Meram Tıp Fakültesi Hastanesi Çocuk Hastalıkları ve Göğüs Hastalıkları Kliniklerine, viral pnömoni ön tanısıyla yatırılan veya poliklinikte görülüp tedavi verilen, yaşları 0-70 arasında ( yaş ortalaması 20.3) 300 hasta alındı. Aşağıdaki kriterlerden birini veya birkaçını taşıyan hastalar çalışmaya dahil edildi:

- 1) Devam eden öksürük, ateş, burun akıntısı, burun tıkanıklığı, nefes darlığı, boğazağrısı, kas ağrısı gibi semptomların olması
- 2) Klinik tablonun kullanılan antibiyotikle düzelmemesi
- 3) Lökosit sayısı, sedimentasyon hızı, CRP ve prokalsitonin düzeyinin düşük olması ve böylece viral pnömoni ön tanısının konması
- 4) Bakteriyel bir etkenin saptanmamış olması
- 5) Radyolojik olarak viral pnömoni lehine bulgular olması

Toplam 300 hastadan nazofarengeal sürüntü örneği alındı. Çalışma grubundaki hastaların yaş, cinsiyet, şikayetleri, şikayetlerin başlangıç süresi, başka bir hastalığının olup olmadığı hasta bilgi formuna kaydedildi. Alınan örnekler çalışılincaya kadar -20°C'de saklandı. Multipleks PZR yöntemiyle (Seeplex® RV12 Multipleks PZR Kiti) virüs arandı.

Çalışmamız 10102008 nolu projeye Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiş ve fakültemiz Etik kurulunun 28.04.2010 tarih ve 2010/022 sayılı kararı ile onay almıştır.

#### **3.1. Örneklerin alınması:**

Nazofarengeal sürüntü alınacak bebek, sırtüstü pozisyonda yatırılarak elleri ve başı bir yardımcı tarafından sabitleştirildikten sonra, eküvyonla burundan girilerek nazofarenksin her iki tonsil mediali ve uvula arkası bölgelerinde iki-üç tur yaptırmak suretiyle, sürüntü örneği alındı. Yetişkin hastalardan ise oturma pozisyonunda ve kafa arkaya itirilerek yine nazofarengeal bölgeden eküvyonla sürüntü örneği alındı. Bu şekilde alınan örnekler, eSwab Liquid Amies (Copan, İtalya) transport besiyeriyle laboratuvarımıza ulaştırıldı. Transport besiyerlerinin üzerinde hastanın adı, yaşı ve şikayetlerinin olduğu bir bölüm de vardı ve bu bölüm ilgili kliniklerce dolduruldu. Hemen

ulaştırılmayacak olan örnekler ise -20°C’de dondurulduktan sonra laboratuvarımıza gönderildi.

### **3.2. PZR yöntemleri:**

Bu çalışmada multipleks PZR yöntemi kullanıldı. PZR uygulaması için önce ekstraksiyon yapıldı, daha sonra multiplex PZR basamaklarına geçildi. Tüm işlemler güvenlik kabini bulunan ortamda steril şartlara uyularak yapıldı. Ticari Seeplex® RV12 ACE Detection Multiplex PZR Kiti (Seegene, Güney Kore) kullanıldı. Çalışma 4 tane aşamada yapıldı:

- Viral DNA/RNA izolasyonu (Ekstraksiyon işlemi)
- cDNA sentezi
- Multiplex PZR
- Agaroz jel elektroforezi

**3.2.1. DNA/RNA izolasyonu:** Viral Gene Spin™ Viral DNA/RNA Extraksiyon kiti kullanıldı.

#### **Kit içeriği ;**

|                     |         |
|---------------------|---------|
| 1. Lysis Buffer     | 30 ml   |
| 2. Binding Buffer   | 40 ml   |
| 3. Washing Buffer A | 30 ml   |
| 4. Washing Buffer B | 10 ml   |
| 5. Elution Buffer   |         |
| 6. Spin Columns     | 50 adet |

#### **Protokol:**

1. Vorteksenerek karıştırılmış nazofarengal swap materyalinden 150 µl alınarak 1.5 ml’lik tüp içine aktarıldı. Örnek hacmi 150 µl’den az ise steril distile su ile hacim 150 µl’ye tamamlandı.

2. 1.5 luk tp içine 250 µl Lysis Buffer eklendi. Lysis Buffer partiklleŒmiŒ ise 80°C’de 10 dakika inkübe edildi.
3. KarıŒım 15 saniye vortekslendi.
4. Oda sıcaklığında (15-25° C) 10 dakika inkübe edildi.
5. KarıŒım zerine 350 µl Binding Buffer eklendi.
6. KarıŒım 5-10 saniye vortekslendikten sonra tüm içerik spin filtreye aktarıldı ve 13 000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi. (Spin filtre kapasitesi 800 µl olduğu için, hacmi 800 µl’i aŒan karıŒımlar 2-3 defada kolondan geçirildi ve santrifüjlendi)
7. Santrifüj sonrası alt tp dökülerek filtre aynı tp içine yerleŒtirildi.
8. Kolona 500 µl Washing Buffer A pipetlendi ve 13 000 rpm de 1 dakika santrifüjlendi.
9. Santrifüj sonrası alt tp dökülerek filtre aynı tp içine yerleŒtirildi. Kolona 500 µl Washing Buffer B pipetlendi ve 13 000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi.
10. Santrifüj sonrası alt tp dökülerek filtre aynı tp içine yerleŒtirildi ve kolon boŒ olarak 13 000 rpm de 2 dakika santrifüj edildi.
11. Santrifüj sonrası kolon yeni 1.5 ml’lik tüpe yerleŒtirildi ve kolonun merkezine gelecek Œekilde 50 µl Elution Buffer pipetlendi.
12. Tp oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi ve sonrasında 13 000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi
13. Elat ( DNA/RNA ) -20°C’de saklandı.

### **3.2.2. cDNA sentezi:**

1 rnek için; 8 µl Total RNA

1 µl Random Hexamer

2 µl 10mM dNTP

2 µL DEPC-treated water



13 µl miksi hazırlandı ve; 65°C'de 5 dakika, 4°C'de 2 dakika Thermal cycler cihazında inkübe edildi. İnkübasyon sırasında aşağıdaki miks hazırlanarak;

4 µl 5XRT Buffer

1 µl 0.1 M DDT

1 µl Rnase İnhibitör (40 u/ µl)

1 µl Reverse Transcriptase (200 u/ µl)

7 µl tüp içine pipetlendi(toplam hacim 20 µl). PZR cihazında aşağıdaki protokol ile cDNA sentez reaksiyonu gerçekleştirildi: 42°C'de 10 dakika, 50°C'de 40 dakika, 70°C'de 10 dakika tutuldu. 4°C'ye gelince işlem tamamlandı ve ürünler -20°C'de muhafaza edildi.

### **3.2.3. Multipleks PZR (Amplifikasyon):**

#### **Seeplex RV12 ACE Detection Kit Çalışma Protokolü:**

Kit içeriği:

1. 5X RV12 ACE A PM: Primer Miksi
2. 5X RV12 ACE B PM: Primer Miksi
3. 2X Multiplex Master Mix: PCR Miksi
4. 8-MOP Soution: Kontaminasyonu önleyici ajan
5. RV12 ACE A Marker: PCR A set DNA ladder
6. RV12 ACE B Marker: PCR B set DNA ladder
7. RV12 ACE PC: Pozitif kontrol
8. RV12 ACE NC: Negatif kontrol

Bir örnek için;

A ve B multipleks PCR miksleri için 2 adet 0.2 ml lik PCR tüpü işaretlendi ve aşağıdaki protokole göre PCR miksleri hazırlandı;

4 µl 5x RV12 ACE PM (A veya B)

3 µl 8-Mop Solusyonu

10 µl 2x Multipleks Master Miks

17 µl hazırlanan PZR mikslarına 3 µl cDNA ürününden eklendi ve aşağıdaki protokole göre PZR işlemi gerçekleştirildi: 94°C’de 15 dakika 1 döngü, 94°C’de 30 saniye 40 döngü, 60°C’de 90 saniye, 72°C’de 90 saniye, 72°C’de 10 dakika 1 döngü. Son basamak olarak, ürünler 4°C’de saklandı.

### 3.2.4. Agaroz jel elektroforez:

2 gram agaroz 100 ml 1xTBE tamponu içine eklenerek tamamen çözülünceye kadar kaynatıldı. 5 µl Multipleks PZR ürünü 1 µl jel yükleme boyası ile karıştırılarak jele yüklendi. Herbir multipleks PZR, DNA Ladder’ından da jele 10 µl yüklendi. 180 voltta 50 mA’de 30 dakika elektroforez yapılarak sonuçlar DNA Ladder (kılavuz) ile karşılaştırılarak yorumlandı. DNA kılavuzları aşağıdaki tabloda gösterilmiştir:

| A setindeki viruslar | Hedef gen bölgesi | Agaroz jeldeki ölçüsü (bp) |
|----------------------|-------------------|----------------------------|
| İnternal kontrol     | rbcL              | 1000                       |
| HMPV                 | F gene            | 749                        |
| HAdV                 | Pol gene          | 534                        |
| HCoV 229E/NL63       | S gene            | 375                        |
| HPIV 2               | HN gene           | 264                        |
| HPIV 3               | HN gene           | 188                        |
| HPIV 1               | HN gene           | 139                        |

**Şekil 1.** Agaroz jel elektroforezinde virus DNA’larının büyüklükleri ve hedef gen bölgeleri (A marker)

| B setindeki viruslar | Hedef gen bölgesi | Agaroz jeldeki ölçüsü (bp) |
|----------------------|-------------------|----------------------------|
| İnternal kontrol     | rbcL              | 1000                       |
| INF-B                | Segment 1         | 754                        |
| HCoV OC43/HKU1       | M gene            | 578                        |
| HRV A-B-C            | 5'NTR             | 394                        |
| RSV-A                | F gene            | 273                        |
| INF - A              | Segment 7         | 206                        |
| RSV- B               | F gene            | 143                        |

**Şekil 1.** Agaroz jel elektroforezinde virus DNA'larının büyüklükleri ve hedef gen bölgeleri (B marker)

|                | İnternal kontrol | Hedef DNA | Yorum   |
|----------------|------------------|-----------|---|
| <b>Örnek 1</b> | +                | +         | Örnek pozitif   |
| <b>Örnek 2</b> | +                | -         | Örnek negatif   |
| <b>Örnek 3</b> | -                | +         | Tekrar çalışılmalı. Başka testlerle karşılaştırılmalı |
| <b>Örnek 4</b> | -                | -         | Kabul edilemez sonuç.<br>Aynı örnekle tekrarlanmalı.  |

**Şekil 2.** Sonuçların yorumlanması

**Örnek 1:** Pozitif sonuç. Hedef patojen tespit edilmiştir.

**Örnek 2:** Negatif sonuç. Yeterli örnek toplanmıştır ve testi inhibe eden herhangi bir faktör yoktur. Örnek 12 viral patojenden hiçbirini içermemektedir.

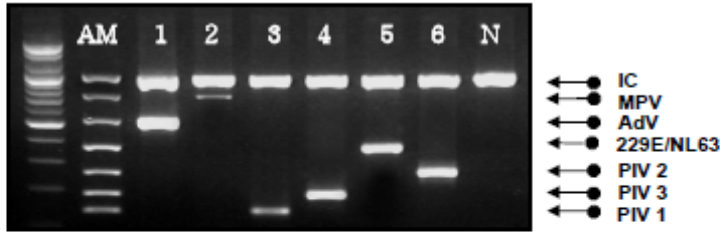
**Örnek 3:** Hedef patojen tespit edilmiştir. Ama internal kontrol negatif olduğundan test tekrarlanmalı ve başka testlerle karşılaştırma yapılmalıdır.

**Örnek 4:** Hedef patojen tespit edilememiştir. Hedef patojen olabilir. Çünkü test inhibitörleri labildir ve test aynı örnekle tekrar edildiğinde doğru sonuç alınabilir.

**3.2.5. Hasta sonuçlarının yorumlanması:** Aşağıdaki örnekte 6 hastadan da 6 değişik virüs izole edilmiştir: (Kit prospektüsünden alınmıştır.)

- 1 numaralı hastadan Adenovirüs,
- 2 numaralı hastadan Human Metapnömovirüs,
- 3 numaralı hastadan Parainfluenza -1,
- 4 numaralı hastadan Parainfluenza -3,
- 5 numaralı hastadan Korona virüs 229E/NL63,
- 6 numaralı hastadan Parainfluenza-2 izole edilmiştir.

Fig 1B. Example ( Agarose Gel )



| Samples No. | Result    |
|-------------|-----------|
| 1           | AdV       |
| 2           | MPV       |
| 3           | PIV 1     |
| 4           | PIV 3     |
| 5           | 229E/NL63 |
| 6           | PIV 2     |

AM : RV12 ACE A Marker

1~6 : clinical samples

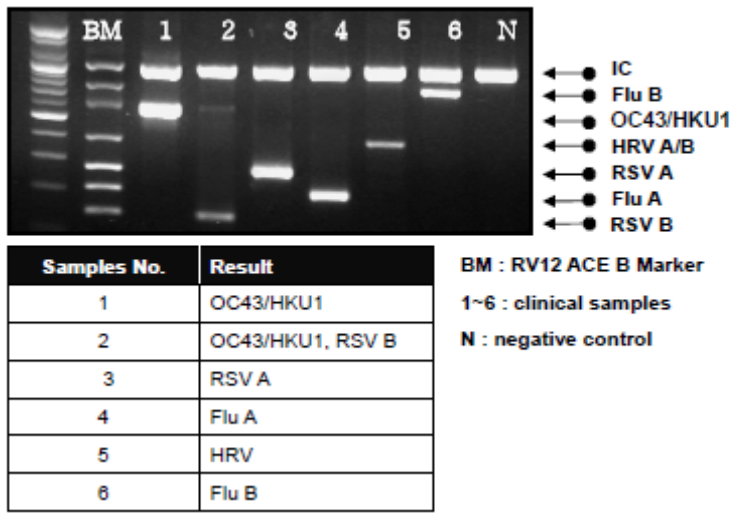
N : negative control

**Şekil 3.** Kit prospektüsünden alınmış agaroz jelde yürüyen virusların görüntüsü (A marker)

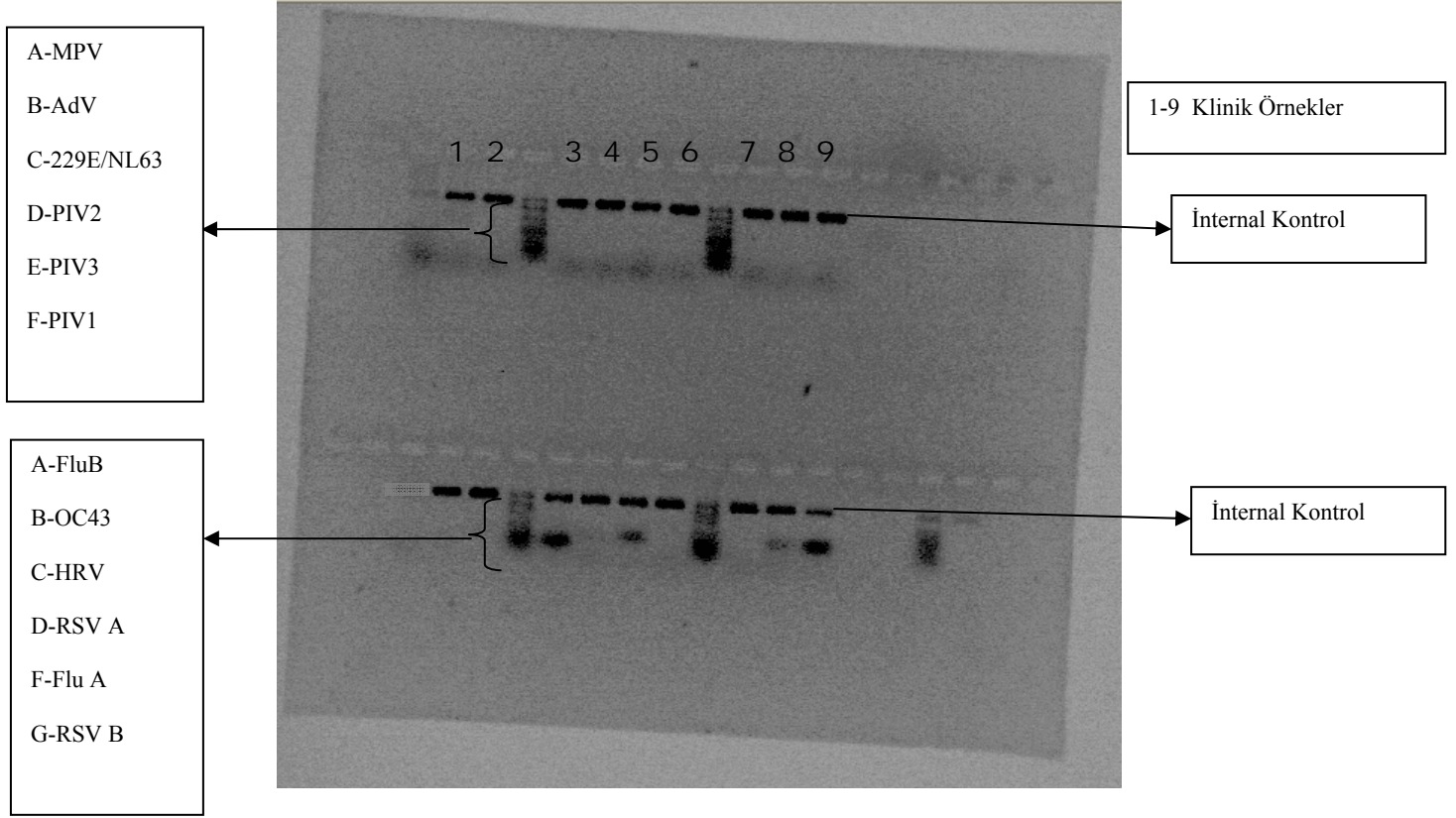
Aşağıdaki örnekte ise yine 6 hastadan, B markerındaki virüslerden 6'sı tespit edilmiştir (Kit prospektüsünden alınmıştır) :

- 1 numaralı hastadan Corona virüs OC43/HKU1,  
 2 numaralı hastadan RSV-B,  
 3 numaralı hastadan RSV-A  
 4 numaralı hastadan İnfluenza A,  
 5 numaralı hastadan Human Rinovirüs  
 6 numaralı hastadan İnfluenza B izole edilmiştir.

Fig 2B. Example ( Agarose Gel )



Şekil 3. Kit prospektüsünden alınmış agaroz jelde yürüyen virusların görüntüsü (B Marker)



**Resim I:** Çalışmamızdaki virus markerlarının ve pozitif örneklerin jel elektroforezindeki fotoğrafı. 3 numaralı hastada İnfluenza A, 5 ve 9 numaralı hastada RSV-A tespit edildi

#### 4. BULGULAR:

Bölgemizde viral pnömoni oranlarını belirlemek amacıyla, Ekim 2010 ile Mart 2011 ayları arasında Göğüs Hastalıkları ve Çocuk Hastalıkları Kliniklerine ateş, öksürük, burun akıntısı, burun tıkanıklığı, nefes darlığı ve kas ağrısı gibi pnömoni semptomlarıyla başvuran 300 hastadan nazofarengeal sürüntü alındı ve bu örnekler multipleks PZR yöntemiyle çalışılıp değerlendirildi.

Toplam 300 hastanın 139'unda (%46.3) virüs tespit edildi, 161'inde (%53.6) ise hiçbir virus tespit edilmedi. Virüs tespit edilen hastaların 107'si (%35.6) çocuk ve 32'si (%10.6) erişkindi (Tablo-2).

**Tablo-2.** Viral pnömoni sayı ve oranlarının çocuk ve erişkine göre dağılımı

| Cinsiyet       | Virüs DNA (pozitif) |      | Virüs DNA (negatif) |      | Toplam |     |
|----------------|---------------------|------|---------------------|------|--------|-----|
|                | Sayı                | %    | Sayı                | %    | Sayı   | %   |
| <b>Çocuk</b>   | 107                 | 35.6 | 43                  | 14.3 | 150    | 50  |
| <b>Erişkin</b> | 32                  | 10.6 | 118                 | 39   | 150    | 50  |
| <b>Toplam</b>  | 139                 | 46.2 | 161                 | 53.3 | 300    | 100 |

$$P=0.463 \quad Q=0.537 \quad SD \text{ (Serbestlik Derecesi) } = 0.0576 \quad d=0.25$$

Çocuklardaki pnömonilerde viral etken bulunma sıklığının, yetişkinlerdeki pnömonilerde viral etken bulunma sıklığından daha fazla olduğu bulundu. Yapılan t testine göre bu farklılığın anlamlı olduğu gösterildi ( $p > 0.463$ ).

Hastaların 150'si çocuk ve 150'si erişkindi. 300 hastanın 140'ı kadın ve 160'ı erkekti. Çocuk hastaların 60'ı kız ve 80'i erkek, erişkin hastaların ise 80'i kadın ve 70'i erkekti (Tablo-3).

**Tablo-3.** Hastaların yaş ve cinsiyet dağılımı

|               | <b>Çocuk hasta</b> | <b>Erişkin hasta</b> | <b>Toplam</b> |
|---------------|--------------------|----------------------|---------------|
| <b>Kadın</b>  | 60                 | 80                   | 140           |
| <b>Erkek</b>  | 90                 | 70                   | 160           |
| <b>Toplam</b> | 150                | 150                  | 300           |

Çocuk hastaların 130'u 0-5 yaş aralığında idi ve bunların 92 (%70.7)'sinde virüs bulundu ; 20'si 5-9 yaş aralığındaydı, bunların ise 15 (%75)'inde virüs bulundu. Erişkin hastaların ise 10'u 18-19 yaş aralığında idi, bunların 7 (%70)'sinde virüs tespit edildi; 35'i 20-29 yaş aralığında idi ve bunların 16 (%45.7)'sında virüs vardı; 25'i 30-39 yaş aralığında idi ve bunların 6 (%24)'sında virüs bulundu; 35'i 40-49 yaş aralığında idi ve bunların 2 (%5.7)'sinde virüs bulundu; 40'ı 50-59 yaş aralığında idi ve bunların 1 (%2.5)'inde virüs bulundu; ve 5'i 60-69 yaş aralığındaydı ve hiçbirinde virüs yoktu (%0) (Tablo-4).

**Tablo-4.** Hastaların yaş aralıklarına göre dağılımı

| <b>Yaş grubu</b> | <b>Virüs pozitif</b> |               | <b>Virüs negatif</b> |               | <b>Toplam</b> |
|------------------|----------------------|---------------|----------------------|---------------|---------------|
|                  | <b>Sayı</b>          | <b>Oran %</b> | <b>Sayı</b>          | <b>Oran %</b> |               |
| 0-4              | 92                   | 70.7          | 38                   | 29.2          | 130           |
| 5-9              | 15                   | 75            | 5                    | 25            | 20            |
| 10-19            | 7                    | 70            | 3                    | 30            | 10            |
| 20-29            | 16                   | 45.7          | 19                   | 44.3          | 35            |
| 30-39            | 6                    | 24            | 19                   | 76            | 25            |
| 40-49            | 2                    | 5.7           | 33                   | 94.3          | 35            |
| 50-59            | 1                    | 2.5           | 39                   | 97.5          | 40            |
| 60-69            | 0                    | 0             | 5                    | 100           | 5             |

Yapılan kıkare analizine göre, yaş grupları arasında viral pnömoni görülme oranlarının istatistiksel olarak farklı olduğu belirlendi. Beklenen pozitiflik oranları



irdelendiğinde viral pnömonilerin en sık 0-4 yaş grubunda görüldüğü ve ilerleyen yaşla birlikte azaldığı tespit edildi ( $X_{0,01}^2=18.47$   $X^2_t=113.541$  ve  $SD=7$ ).

Viral infeksiyonun pozitif olduğu 139 hastanın 124 (%89)'ünde ateş, 139 (%100)'unda öksürük, 110 (%79)'unda burun akıntısı, 115 (%82)'inde burun tıkanıklığı, 30 (%22)'unda kas ağrısı, 115 (%83)'inde nefes darlığı vardı(Tablo-5).

**Tablo-5.** Hastalık bulgularının dağılımı ( Oran= Hasta sayısı/ Virüs DNA pozitif)

| <b>Bulgular</b>   | <b>Hasta sayısı</b> | <b>Oranı (%)</b> |
|-------------------|---------------------|------------------|
| Öksürük           | 139                 | 100              |
| Ateş              | 124                 | 89               |
| Nefes darlığı     | 115                 | 83               |
| Burun tıkanıklığı | 115                 | 82               |
| Burun akıntısı    | 110                 | 79               |
| Kas ağrısı        | 30                  | 22               |

Çalışmaya alınıp virüs DNA'sı pozitif bulunan 107 çocuğun 6'sında Ventriküler Septal Defekt (VSD), beta-galaktozidoz, astım bronşiale, hidrosefali (2 hastada) ve konjenital immun yetmezlik vardı. Virüs DNA'sının pozitif olduğu 32 erişkinin ise 2'sinde zeminde KOAH vardı(Tablo-6).

**Tablo-6.** Virüs DNA pozitif olan hastaların birlikte olduğu hastalıkların dağılımı

| <b>Virüs DNA pozitif ve birlikte olduğu hastalıklar</b> | <b>Çocuk</b> | <b>Erişkin</b> |
|---|--------------|----------------|
| <b>Astım bronşiale</b>                                  | 1            | -              |
| <b>VSD</b>  | 1            | -              |
| <b>Hidrosefali</b>                                      | 2            | -              |
| <b>İmmun yetmezlik</b>                                  | 1            | -              |
| <b>Beta galaktozidaz</b>                                | 1            | -              |
| <b>KOAH</b>   | 0            | 2              |

Toplam 300 örneğin 139'unda virüs tespit edildi. 139 pozitif örneğin 107'si çocuk ve 32'si yetişkindi. Çocuklarda 50 (%36)'si RSV, 10 (%7.1)'u İnfluenza A, 23 (16.5)'ü Rinovirüs, 8 (%5.7)'i Parainfluenza virüs, 3 (%2.1)'ü Adenovirüs, 2 (%1.4)'si İnfluenza B, 4 (%2.9)'ü Koronavirüs, 2 (%1.4)'si Metapnömovirüs bulundu. 5 hastada iki virüs birlikte tespit edildi. 1 hastada İnfluenza A ve RSV, 1 hastada Adenovirüs ve RSV, 3 hastada ise Rinovirüs ve RSV birlikte bulundu. Yetişkin hastada tespit edilen virusların 12 (%8.6)'si RSV, 9 (%6.4)'u İnfluenza A, 4 (%2.9)'ü Rinovirüs, 1(%0.7)'i Parainfluenza virüs, 2 (%1.4)'si Adenovirüs, 4 (%2.9)'ü İnfluenza B olarak bulundu.

Toplamda ise RSV %44.6 , İnfluenza A %13.6, Rinovirüs %19.4, Parainfluenza % 6.5, Adenovirüs %3.6, İnfluenza B %4.3, Koronavirüs %2.9, Metapnömovirüs %1.4 bulundu(Tablo-7).

**Tablo-7.** Bulunan virüslerin hastalara göre dağılımı

| Virüsler                         | Çocuk |      | Erişkin |      | Toplam |      |
|----------------------------------|-------|------|---------|------|--------|------|
|                                  | Sayı  | Oran | Sayı    | Oran | Sayı   | Oran |
| <b>İnfluenza A</b>               | 10    | 7.1  | 9       | 6.4  | 19     | 13.6 |
| <b>İnfluenza B</b>               | 2     | 1.4  | 4       | 2.9  | 6      | 4.3  |
| <b>RSV</b>                       | 50    | 35.9 | 12      | 8.6  | 62     | 44.6 |
| <b>Rinovirüs</b>                 | 23    | 16.5 | 4       | 2.9  | 27     | 19.4 |
| <b>Adenovirüs</b>                | 3     | 2.1  | 2       | 1.4  | 5      | 3.6  |
| <b>Parainfluenza virüs</b>       | 8     | 5.7  | 1       | 0.7  | 9      | 6.5  |
| <b>Koronavirüs<br/>229E/NL63</b> | 4     | 2.9  | -       | -    | 4      | 2.9  |
| <b>Metapnömovirüs</b>            | 2     | 1.4  | -       | -    | 2      | 1.4  |
| <b>RSV + İnfluenza A</b>         | 1     | 0.7  | -       | -    | 1      | 0.7  |
| <b>RSV + Rinovirüs</b>           | 3     | 2.1  | -       | -    | 3      | 2.1  |
| <b>RSV + Adenovirüs</b>          | 1     | 0.7  | -       | -    | 1      | 0.7  |
| <b>Toplam</b>                    | 107   | 77   | 32      | 23   | 139    | 100  |

$$X_{0.01}^2 = 18.47 \quad X_t^2 = 42, 8586 \quad \text{ve} \quad SD = 7$$

Tüm yaş grupları arasında RSV pnömonisinin görülme sıklığı diğer viruslara göre daha yüksek bulundu. RSV'nin bu farklılığı, yapılan kıkare analizine göre anlamlıydı.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ:

Viral alt solunum yolu infeksiyonları (ASYE) ve komplikasyonları, çocukluk çağının en önemli morbidite ve mortalite nedenidir. ASYE'nin en sık rastlanılan viral nedenleri arasında; Respiratuvar Sinsityal Virus (RSV), influenza ve parainfluenza virüsleri, adenovirüsler ve son yıllarda tanımlanan metapnömovirus sayılabilir. Bölgelere, yaş gruplarına ve konağın immün durumuna göre değişkenlik göstermekle birlikte, genellikle erken çocukluk döneminde en sık saptanan etkenler RSV ve parainfluenza ve rinovirüs, büyük çocuklar ve erişkinlerde ise RSV ve influenza virüsleridir (14, 41, 42).

Pnömoniler özellikle çocuklarda ve yaşlı kişilerde, bağışıklığı baskılanmış hastalarda şiddetli hastalık ve ölüme neden olabilir, altta yatan kronik akciğer hastalığı bulunan kişilerde solunum yetmezliğine yol açabilir. Bu durum viral infeksiyonun solunum sisteminin savunma mekanizmalarını etkileyerek bakteriyel infeksiyon için uygun zemin yaratmasına bağlıdır. Bu nedenle viral - bakteriyel etkenlerin birlikte olduğu infeksiyonlar sıklıktır (42).

Respiratuvar virüsler olarak tanımlanan bir grup virüsün solunum yollarını infekte etme yeteneği yüksektir. Bu virüsler influenza virüsleri, RSV, parainfluenza virüsleri, adenovirüs, rinovirüs, koronavirüsler, kızamık, enterovirüslerdir. Solunum yolu infeksiyonları nezleden farenjit, larenjit, trakeobronşit ve pnömoniye uzanan hastalıklara neden olur. Klinik tablo belirtisiz infeksiyondan ölümcül infeksiyona kadar değişebilir. Bu infeksiyonlar önemli işgücü ve zaman kaybına, hastaneye yatışa ve morbiditeye yol açar. Bütün yıl boyunca görülebilmelerine karşın özellikle kış aylarında daha sıklıktır (43).

Türkiye'de de Sağlık Bakanlığı 2008 verilerine göre süt çocuğu yaş grubunda ölümlerin % 2.2'sinden, 5 yaş altı çocuklarda ölümlerin %2.7'sinden pnömoniler sorumludur. Yaşamın ilk yılında oluşan pnömonilerin %90'ı viral iken, okul çağında bu oran %50'ye düşer. Bu veriler ülkemizde özellikle 5 yaş altı çocuklarda pnömonilerin yüksek mortalite ve morbiditeye yol açan önemli bir sağlık sorunu olduğunu göstermektedir (14,44).

WHO'nün 2009 yılı verilerine göre; dünyada her yıl 5 yaş altı 2 milyon çocuk pnömoni nedeniyle ölmektedir. Yaşamın ilk yılında alt solunum yolu infeksiyonu insidansı %30-35 'tir ve bunun yaklaşık %10'unu pnömoniler oluştururken, ikinci ve üçüncü yıllarda % 4-5, 10 yaş üzerinde ise insidans %1 'e düşmektedir (45).

Viral solunum yolu infeksiyonlarının tanısı için hızla real-time PZR teknikleri geliştirilmektedir. PZR yönteminin yüksek duyarlılığa sahip olması, kısa zamanda sonuç vermesi ve tek örnekte birkaç patojeni tespit edebilme olanağı sağlaması en önemli

avantajlarındandır. Konvansiyonel yöntemlerle varlığı gösterilemeyen rinovirus, koronavirüs, metapnömovirus gibi solunum sistemi virusları PZR ile gösterilebilir (11,46).

Brittain ve arkadaşları, Batı İsveç'te 2006 – 2008 yıllarında Ekim-Nisan ayları arasında respiratuvar patojenlerini multipleks PZR yöntemiyle tespit etmek ve hastalığın semptomlarının süresinin tespit oranına etkisini gözlemlemek için bir çalışma yapmışlar ve bu çalışmaya 18 yaş üzeri ve semptomları 2 haftadan daha az zamandır devam eden 220 hasta almışlardır. Sonuçta 94 (%43)'ünde virus bulunmuş ve çoğunluğunun İnfluenza A olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca semptomların süresiyle virüsün tespit edilme oranı (yani viral yükü) arasında bir ilişki olduğu sonucuna varmışlardır (47). Kullanılan ticari multipleks PZR kitinde, bizim aradığımız viruslara ek olarak *M. pneumoniae* ve *C. pneumoniae* de vardı.

Yüksel ve arkadaşları, 2002-2004 yılları arasında küçük çocuklarda ASYE etkeni olan virusların belirlenmesi ve uzun dönem komplikasyonları ile ilişkilerini araştırmak için ASYE'li 150 çocukta bir çalışma yapmışlar ve bu çalışmada direkt immunfloresan antikor yöntemiyle RSV, İnfluenza A ve B, Parainfluenza 1-2-3 ve Adenovirus aramışlardır. 150 çocuğun 38 (%25.2)'inde viral bir etken bulunmuş ve ASYE'de viral pozitifliğin yıllara göre dağılımı; 2002 yılında %46.8, 2003 yılında %13.3 ve 2004 yılında %18.2 olarak belirlenmiştir. ASYE etkeni olarak en sık RSV ve adenovirüs saptanmış ve hastaların %7.3'ünde infeksiyon sonrası bronşiyolitits obliterans geliştiği gösterilmiştir. Alt solunum yolu etkeni olarak en sık saptanan virüsler 12 (%32) hastada RSV ve 12 (%32) hastada adenovirüs olmuştur. Yapılan çalışmalarda RSV, viruslar arasında en sık rastlanan çocukluk çağı ASYE etkeni olarak, Avustralya'da %15, İsrail'de %20, Almanya'da %27-38, Suudi Arabistan'da %45, Bangladeş'te %81 ve Meksika'da %85 gibi yüksek oranlarda bildirilmektedir (41). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde, %44.6 oranıyla en sık virus olarak RSV tespit edilmiştir.

Viral infeksiyonların profilaksisi ve tedavisinde kullanımı yaygınlaşan nöraminidaz inhibitörlerinin, infeksiyonun erken döneminde uygulanmasının gerekliliği yüzünden, hızlı ve güvenilir sonuç veren testler gittikçe önem kazanmıştır (2,3).

Lee ve arkadaşlarının 2009'da Seul'de yaptığı bir çalışmada viral pnömoni ön tanısıyla pediatri servisine yatırılan 220 hastadan nazofarengeal sürüntü örneği alınmış ve shell vial, PZR ve virus kültürü yöntemleriyle virus tespiti karşılaştırılmıştır. 220 hastadan 110'unda PZR ile virus bulunmuş, bunların da 95'inde shell vial kültür yöntemiyle virus ürediği gösterilmiştir ve RSV %53, İnfluenza A ve B %13, Adenovirus %10 ve Parainfluenza 1-2-3 %5 oranında bulunmuştur. Bu çalışmada multipleks PZR ile viral

kültür arasındaki uyum oranı % 90 bulunmuştur. Bu nedenle klinik laboratuvarlarda solunum yolu infeksiyonlarında ilk seçeneğin PZR olması gerektiği vurgulanmıştır (48).

Bizim çalışmamızda 150 çocuk hastanın 107 (%71)'sinde virus bulundu. Bu çocukların 130'u 0-5 yaş arası idi ve bunların 92 (%70.7)'sinde virus bulunurken, 20'si 5-10 yaş arasındaydı ve bunların da 15 (%75)'inde virus bulundu. 150 yetişkin hastanın ise sadece 32 (%21)'sinde virus tespit edildi.

Yine bu çalışmada viral DNA'nın pozitif olduğu 139 hastanın 124 (%89)'ünde ateş, 139 (%100)'unda öksürük, 110 (%79)'unda burun akıntısı, 115 (%82)'inde burun tıkanıklığı, 30 (%22)'unda kas ağrısı, 115 (%83)'inde nefes darlığı vardı. Topçuoğlu ve arkadaşlarının 2009' da yaptığı bir çalışmada ise hışıltısı olan 56 tane 0-5 yaş arası çocuk hastada, multipleks PZR ile viral etken aranmış ve 31 (%55)'inde ateş, 56 (%100)'sında öksürük, 30 (%53)'unda burun akıntısı ve 32 (%57)'sinde nefes darlığı olduğu görülmüştür. Bizim çalışmamızda pnömonili hastalarda en sık semptom öksürük olmuş ve onu ateş ve nefes darlığı izlemiştir. Topçuoğlu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise öksürük yine ilk sıradaki semptom olmuş ve onu daha düşük bir oranla ateş ve nefes darlığı izlemiştir (49). Hemen hemen bizim çalışmamızdakine benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Yüksel ve arkadaşlarının 150 çocuk hastada yaptığı ve 2002, 2003 ve 2004'ü kapsayan bir çalışmada virus bulunma oranları sırasıyla %50, %14 ve %19 bulunmuştur (41). Çocuklarda oranın bu kadar yüksek olmasının nedeni; pnömoni kliniği ağır seyrettiğinden çocukların hastalığın ilk günlerinde hastaneye getirilmesi ve bu yüzden de virusun pozitif çıkma ihtimalinin yüksek oluşu ile açıklanabilir. Yetişkinlerde daha az tespit edilmesinin nedeni, bu yaş grubunun hastalığı çocuklara göre daha hafif geçirmesi nedeniyle hastalığın daha ileri dönemlerinde başvurmaları ve bu dönemde de virusun nazofarengeal sürüntüde tespit edilememesi olabilir. Ayrıca çocuklarda immun sistem yetişkinden daha immatür olduğundan virusun vücutta kalış süresi daha uzundur (47).

Son yıllarda moleküler tanı tekniklerinde çok büyük gelişmeler kaydedilmiştir. Moleküler yöntemlerin gelecekteki uygulama alanı epidemiyolojik ve klinik olarak benzer çok sayıda patojenin tek bir test ile saptanabildiği ve karakterize edilebildiği multipleks tespit sistemlerin yaygınlaşması olacaktır. Kim ve arkadaşlarının 2009'da Kore'de yaptığı çalışmaya 100 hasta alınmış ve bunların sadece 6'sının yetişkin, 94'ünün ise çocuk hasta olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada multipleks PZR, virus hücre kültürü ve immunfloresan yöntem karşılaştırılmıştır. Çalışma sonucunda çocuk hastaların 57 (%57)'sinde hem moleküler yöntemle hem de hücre kültürüyle virus pozitif bulunmuştur. 75 hastada ise sadece PZR ile virus pozitif bulunmuştur, hücre kültüründe üreme olmamıştır. Multipleks

PZR yönteminin viral respiratuvar hastalıkların tesbitini yapmada etkili olduğu, 24 saat içinde etkeni tespit edebildiği ve konvansiyonel metotların yerine kullanılabileceği vurgulanmıştır (50,51).

Başka bir çalışmada Zhang ve arkadaşları tarafından 2009'da Çin'de alt solunum yolu infeksiyonu nedeniyle yatan 0-16 yaş arası 400 hastada immunfloresan yöntemle viral etken araştırılmış ve sonuçta 260 (%63) hastada virus pozitif bulunmuştur. Bu 260 hastanın 103 (%40)'ü RSV, 60 (%23)'ü İnfluenza A, 45 (%17)'i Parainfluenza 3, 20 (%5)'si İnfluenza B ve 17 (%7)'si Adenovirus bulunmuştur. Yine bu çalışmada en yüksek infeksiyon hızının 6 ay altında, daha sonraki infeksiyon pikinin ise 2-4 yaş arasında olduğu gösterilmiştir. 0-6 ay arasında en sık infeksiyon yapan virusun RSV olduğu, 2-4 yaş arasında ise İnfluenza A ve B ile Parainfluenza 1-3 olduğu ve 11-16 yaş arası etkenin de Adenovirus olduğu vurgulanmıştır (52). Bizim çalışmamızda da en sık viral pnömoni etkeni olarak RSV bulundu ve infeksiyon hızının en yüksek olduğu yaş grubunun ise 0-5 yaş grubu olduğu istatistiksel olarak gösterildi.

Eidelman ve arkadaşlarının 2009'da İsrail'de yaptığı bir çalışmada 5 yıl boyunca hastaneye yatan bronşiolit ve pnömonili bebekler kaydedilip immunfloresan yöntemle RSV aranmış ve %40 oranında pozitif bulunmuştur. RSV'nin kış aylarında 2 yaş altı bebekler için epidemik olduğu ve tedavi planlamasının buna göre yapılması gerektiği gösterilmiştir (53).

Bizim çalışmamızda 300 hastanın 139'unda virus tespit edildi. Bunların 62 (%45)'si RSV, 27 (%19.4)'si rinovirus, 19 (%13.6)'u influenza A, 9 (%6.5)'u parainfluenza, 6 (%4.3)'sü influenza B, 5 (%3.6)'i adenovirus, 4 (%2.9)'ü koronavirus ve 2 (%1.4)'si metapnömovirus bulundu. Hem çocukta hem de yetişkinde en yüksek oranda çıkan virus RSV idi. Dereli ve arkadaşlarının İzmir'de 2 ay-2 yaş arasındaki akut bronşiyolitli 65 çocukta yaptığı çalışmada; 19 (%30) hastada hücre kültürü ve direkt immunfloresan antikor yöntemiyle RSV infeksiyonu varlığı gösterilmiştir (54). Bizim elde ettiğimiz RSV oranı geçmişte yapılan çalışmalarla ve literatür bilgileriyle örtüşmektedir.

Gökalp ve arkadaşlarının 2009'da alt solunum yolu infeksiyonu olan 0-2 yaş arası 80 çocuk ile yaptığı çalışmada, nazotrakeal aspirat örneği alınmış ve bu örneklerde RSV varlığı direkt immunfloresan antikor, hücre kültürü ve PCR yöntemi ile gösterilmiştir. Örneklerin 20 (%25)'sinde PCR ile RSV-RNA pozitif bulunmuş, 17 (%21)'sinde hücre kültürü yöntemiyle RSV pozitifliği saptanmıştır. Oranın düşük olması da, örneklerin çalışma gününe kadar derin dondurucuda beklemesiyle açıklanmıştır (54).

Kanada'da Liao ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 2006-2007-2008 yılları kış aylarında 360 hastaya ait nünunelerde ve multipleks PZR, ELISA ve virüs kültürü karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada RSV en sık tespit edilen virus olmuştur. PZR yöntemiyle 119 (%33) örnekte RSV pozitifliği ve 60 (%17) örnekte influenza pozitifliği bulunmuştur. 119 RSV pozitifliği, virus kültürüyle karşılaştırıldığında %94 uyumlu olduğu görülmüştür. Yine bu çalışmada RSV enfeksiyon oranının en hızlı olduğu dönemin 1 ay- 2 yaş arası çocuklar olduğu görülmüştür. Rutin laboratuvarlarda virus kültürü yapmanın zor olduğu bu nedenle hızlı antijen testlerinin PZR ile doğrulanarak sonuç verilmesinin daha uygun olacağı vurgulanmıştır. Çünkü PZR yöntemi, hızlı antijen testlerine göre duyarlılık ve özgüllüğü daha yüksektir (55-57).

Tsolia ve arkadaşlarının 2003'te yaptığı bir çalışma 3 yıl kış mevsimi boyunca devam etmiş ve 473 hasta çalışmaya alınmıştır. Çalışmaya sadece ateşi olan ve kan kültüründe üreme olmamış bronşiyolit ve pnömoni ön tanısıyla yatırılan çocuklar alınmıştır. Bu hastaların 291 (%62)'inde immunfloresan yöntemle RSV pozitif bulunmuştur. En sık vakalar Ocak ve Mart ayları arasındadır, Şubat ayında RSV enfeksiyonlarının pik yaptığı vurgulanmıştır (19).

Falsey ve arkadaşlarının 2005'te yaptığı bir çalışmaya 608 sağlıklı erişkin, 540 yüksek riskli yetişkin ve 1388 kardiyopulmoner hastalığı olan hospitalize yetişkin dahil edilmiştir. Nazofarengeal örnekler ELISA, PZR ve hücre kültürü yöntemiyle çalışılmıştır. Sonuçta hospitalize hastalarda 142 (%10) RSV pozitif ve ayaktan hastalarda 102 (%9) RSV pozitif bulunmuştur. Yatan hastaların %11'inde pnömoni tanısı konmuştur. Bu çalışmada RSV enfeksiyonuna bağlı ölüm hızı hospitalize hastalarda %8 bulunmuştur. Böylece RSV enfeksiyonunun çocuklar kadar yetişkinlerde de önemli bir pnömoni sebebi ve aynı zamanda ölüm sebebi olduğu gösterilmiştir. İnfluenzaya karşı aşı geliştirildiği için RSV erişkinler için daha büyük bir problemdir. Yaşlı erişkinler ve yüksek risk grubu erişkinler için, etkili bir RSV aşısının hızla geliştirilmesi gerektiği vurgulanmıştır (58).

Boivin ve arkadaşlarının 2001-2002 yılları arasındaki kış sezonunda 0-3 yaş arasında 208 çocuğa ait solunum yolu örneklerinde yaptığı çalışmada, multipleks PZR yöntemiyle sadece influenza ve RSV aranmıştır. 208 hastanın 45 (%22)'inde İnfluenza A, 106 (%51)'sında RSV ve 12 (%6)'sinde ko-enfeksiyon olmak üzere toplam 139 (%67)'unda virus saptanmıştır. Bu çalışmada PZR testi, hızlı antijen testi ile karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak çocuklardaki viral solunum yolu enfeksiyonlarında etkeni bulmak için en hızlı ve sensitivitesi en yüksek testin, multipleks PZR testi olduğu üzerinde

durulmuştur. Özellikle klinik olarak şüpheli ama hızlı antijen test sonucu negatif bir hasta örneği varsa mutlaka PZR yöntemi ile doğrulanması gerektiği vurgulanmıştır (56,59).

İnfluenza A bizim çalışmamızda çocuklarda %7 ve yetişkinlerde %6.4 olmak üzere toplamda %13.4 oranında bulundu. İnfluenza B ise çocuklarda %1.4 ve yetişkinlerde %2.9 olmak üzere toplamda %4.3 oranında bulundu. Yaş arttıkça solunum yolu infeksiyonları oranı düşmesine rağmen hastaneye yatış ve ölüm oranı gittikçe artar. Erişkinlerde viral pnömoni gelişme oranı %10-23 arasındadır. Birçok çalışmada en yaygın pnömoni yapan virus influenzadır. İnfluenza A H3N2 ve RSV erişkinlerdeki pnömonilerden en sık identifiye edilen virüslerdir (5).

Ülkemizde 2003 yılından itibaren İstanbul Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji A.D Laboratuvarlarında bir pilot çalışmayla grip aktivitesi izlenmeye başlamış ve grip salgınlarının zamanı ve etkilerini belirlemek için istatistikî verilerin toplanması öngörülmüştür. Yapılan sörveyans çalışmasında 2003-2004 sezonunda ülkemizde dolaşımda olan influenza viruslarının dünyadaki viruslara benzerlik gösterdiği; İnfluenza B suşuna hiç rastlanmazken gönderilen 204 örneğin 91 (%44.6)'sında İnfluenza A tespit edildiği ve bu suşların çoğunun H1N1 alttipinde olduğu gösterilmiştir. 2004-2005 sezonunda ise toplam 458 örnek incelenmiş ve 86 (%18.8)'sı İnfluenza A olarak tespit edilmiş ve bu suşların çoğunun batı ülkelerinden farklı olarak H1N1 alttipinde olduğu gösterilmiştir. 2005-2006 sezonunda gönderilen 1317 örneğin 168 (%12.2)'i İnfluenza A olarak izole edilmiş, bunların da tamamı H3N2 olarak tanımlanmıştır. 2006-2007 sezonunda ise 1120 örnek değerlendirilmiş ve 71(%6.4)'i influenza olarak izole edilmiş, bunların da çoğunluğu yine İnfluenza A olarak tespit edilmiş, İnfluenza A'ların tamamı H3N2 olarak tanımlanmıştır (8).

En son 2007-2008 kış sezonunda Ulusal İnfluenza Sörveyans Sistemi, ülkemizde iki merkezde takip edilmiştir: İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Viroloji Laboratuvarı ve Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi. Örneklerde virüs tanımlanması hem real-time PZR ile hem de hücre kültürü yöntemleriyle yapılmıştır. Pozitif örneklerde en yüksek oranda İnfluenza A tespit edilmiş (%56), influenza B (%26) ise ikinci sırayı almıştır. İnfluenza aktivitesinin Kasım ayında başladığı ve Mayıs ayında sonlandığı gösterilmiştir. Sonuç olarak 2007-2008 influenza sezonunda orta düzeyde bir klinik aktivite ve İnfluenza A H3N2 baskınlığı gözlenmiştir (60).Bizim çalışmamızda İnfluenza A 19(%13.6) hastada ve İnfluenza B 6(%4.3) hastada tespit edilmiştir. Bizim oranlarımızın bu kadar düşük olmasının sebebi çalışmaya sadece pnömonili hastaları dahil etmemiz olabilir, bu sörveyans çalışmasına ise tüm grip semptomları olan hastalar alınmıştır.



Bizim çalışmamızdaki oranların aksine Watanabe ve arkadaşları tarafından 2002-2003 kış sezonunda yaşları 60-85 arasında olan 384 kişilik seçilmiş bir yaşlı hasta grubunda yapılan çalışmada grip bulguları olan 47 kişide RT-PZR ile sadece influenza virusu aranmış ve hiçbir hastada influenza bulunamamıştır (61). Bu durum 2002-2003 kış sezonunun yaşlı popülasyon için düşük aktiviteli bir influenza sezonu olmasıyla ve influenza aşısının %60-70 gibi yüksek oranlarda uygulanmasıyla açıklanmıştır. Bizim ülkemizde ise influenza aşılama oranları daha düşüktür.

Amerika'da 2002'de Ocak ve Mart ayları arasında, akut solunum yolu hastalıkları olan 266 erişkine ait örneklerin dahil edildiği çalışmada multipleks PZR ve hücre kültürü yöntemiyle etken virusu aranmıştır. Çalışmaya alınan hastalarda akut bronşit, farenjit ve pnömoni klinik tablosu mevcut olup 103 (%39) hastada virus tespit edilmiştir. 103 pozitif hastanın %50'sinde influenza, %28'inde rinovirus, %10'unda RSV, %4'ünde HMPV, %2'sinde koronavirus ve %2'sinde adenovirus bulunmuştur. Grip mevsiminde çalışma yapıldığı için influenza oranının yüksek çıktığı vurgulanmıştır. Ayrıca bu çalışmada etkene göre semptomların değiştiği vurgulanmış ve bu yüzden bazen hiçbir test yapılmadan etken virusun semptoma göre tahmin edilip tedavi başlanabileceği ya da başlanmayacağı üzerinde durulmuştur (62).

Rinovirus bizim çalışmamızda çocuklarda 23 (%16.5) ve yetişkinlerde 4 (%3) olmak üzere toplamda 27 (%19.4) pnömonili hastada etken olarak bulunmuştur. RSV'nin ardından ikinci en sık etken olarak bulunmuştur. Bunun sebebi gelişen moleküler yöntemlerden biri olan multipleks PZR yönteminin kullanılması olabilir. Çocukluk çağı alt solunum yolu infeksiyonlarında en sık etkenler influenza, parainfluenza, adenovirus ve RSV olarak bilinirken son yıllarda tanısal yöntemlerdeki gelişmelerle birlikte metapnömovirüs, İnfluenza A H1N1, SARS koronavirus, bokaviruslar, polyomavirusler ve rinovirusler gibi yeni etkenler saptanmıştır (35).

Başka bir çalışmada, Muralı ve arkadaşları hematolojik maligniteli 82 hastada multipleks PZR ve virus kültürü kullanılarak etken aramış ve 32'sinde multipleks PZR ile ve 10'unda kültür ile etken virus bulmuşlardır. Bu çalışmaya göre hematolojik maligniteli hastalarda en sık metapnömovirüs, koronavirus ve rinovirus saptanmıştır. 2009'da yapılan bu çalışmada 82 hastanın 15'inde HMPV, rinovirus ve koronavirus sadece PZR yöntemiyle tespit edilebilmiştir. Konvansiyonel metotlarla virus tespit edilememiştir (63,64). Bizim çalışmamızda malign hasta grubu olmamasına rağmen rinovirus ikinci sıklıkta bulunan virus olmuştur. Oranın yüksek olma sebebi, yeni gelişmekte olan multipleks PZR

yönteminin rinovirusu tespit edebilmesi yani rinovirusun tespit edilebilme oranının artışıdır.

Brezilya'da 2011'de erişkin popülasyonda PZR ile yapılan bir çalışmada 47 tane solunum yolu enfeksiyonunun %29'u rinovirüs bulunmuş ve erişkinlerin solunum yolu hastalıklarında en büyük rol oynayan etkenlerden birinin rinovirus olduğu vurgulanmıştır. Bu durum influenza aşısının oranlarının yüksek oluşuyla açıklanmıştır (61).

Moleküler yöntemlerin gelişmesiyle birlikte rinovirusların tespit edilme şansları artmıştır. Böylece görülmüştür ki; çocuklardaki astım ataklarının %80'inden ve erişkinlerdeki astım ataklarının ise %30'undan rinoviruslar sorumludur (32). 2005'te Kling ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, akut astım atağı olan 50 çocuk yatırılıp nazal aspirattan RT-PZR ile virus aranmış sonuçta 50 çocuğun 41(%82)'inde rinovirus tespit edilmiştir. 6 hafta sonra bu 41 çocukta tekrar PZR ile virus aranmış ve 18 (%44)'inde rino virus bulunmuş, en son 6 ay sonra tekrar virus aranmış ve bu 18 çocuğun 4'ünde yine rinovirus tespit edilmiştir. Sonuç olarak akut astım atağından 6 hafta sonra hastalarda hala rinovirusun tespit edildiği ve uzamış ve şiddetli astım ataklarının rinoviruslara bağlı olduğu vurgulanmıştır (32).

Wheezing (hışıltı) küçük çocukların alt solunum yolu enfeksiyonlarında sık rastlanan bir bulgudur. RSV, influenza, parainfluenza, koronavirüs ve metapnömovirüs bu tabloyu yapan virüslerdir. Smuts ve arkadaşlarının 2011'de yaptığı bir çalışmayla Güney Afrika'da bu tabloyu en sık yapan virusun rinovirus olduğunu gösterilmiştir. Bu çalışmada Güney Afrika'daki wheezing (hışıltı)li çocuklarda RT-PZR ile rinovirus aranmış ve hastanede yatan 220 wheezingli çocuğun 128(%58)'inde rinovirus tespit edilmiştir. En yaygın tipi Human Rinovirus-C bulunmuş ve Güney Afrika'da en sık akut wheezing yapan virusun rinovirus olduğu vurgulanmıştır.(65).

Adenoviruslar bizim çalışmamızda çocuklarda 3 (%2.1)ve yetişkinde ise 2 (%1.4) hastada olmak üzere toplamda %3.6 oranında pozitif bulundu. Adenovirus enfeksiyonları daha çok üst solunum yolu enfeksiyonları şeklindedir. Ama 5 yaş altındaki çocuklarda akut alt solunum yolu enfeksiyon etkeni viruslar içinde %13 ile RSV ve parainfluenza virustan sonra gelen üçüncü viral ajandır. Bodur ve arkadaşlarının 2009'da yaptığı bir çalışmada multipleks PZR yöntemiyle 500 hastada 11 tane adenovirus pozitifliği bulunmuş ve bu adenovirus suşlarının E alt grubunda olduğu tespit edilmiştir (66). Başka bir çalışmada alt solunum yolu enfeksiyonu olan 50 çocukta adenovirus sıklığı %10 oranında bulunmuştur (67).

Başka bir çalışmada Zhang ve arkadaşları tarafından, 15 yaşın altında 412 hastada IFA ile etken aranmış ve hastaların %63'ünde viral bir etken bulunmuştur. Bu çalışmaya göre alt solunum yolu infeksiyonu olan 412 kişinin %25'inde RSV, %19'unda İnfluenza A/B, %15'inde Parainfluenza 1-3 ve %4'ünde Adenovirus tespit edilmiştir (52). Sonuçlar bizim çalışmamızla uyumludur. Adenovirus oranının bu kadar düşük olmasının sebebi çalışmanın kış mevsiminde yapılmasıyla açıklanmıştır çünkü adenovirüs infeksiyonları daha çok yaz aylarında görülür ve bu aylarda şiddetli pnömoni yapar (66,67).

Şener ve arkadaşlarının 2009'da yaptığı bir çalışmada, askerler arasında solunum yolu hastalığı olanlar arasında real-time PZR ile adenovirus aranmış ve sonuç olarak 180 hastanın 9 (%5)'unda hem PZR ile hem de virus kültürü ile adenovirus bulunmuştur (68).

Yüksel ve arkadaşları, 2002-2004 yılları arasında küçük çocuklarda alt solunum yolu infeksiyon etkeni olan virusların belirlenmesi ve uzun dönem komplikasyon ile ilişkilerini araştırmak için direkt immunfloresan yöntemiyle bir çalışma yapmış ve 150 çocuğun 38 (%25.2)'inde inde viral bir etken bulmuşlardır. Etken olarak en sık RSV ve adenovirus saptanmış ve hastaların %7.3'ünde yani 11 çocukta infeksiyon sonrası bronşiyolitis obliterans geliştiği gösterilmiştir. Bronşiyolitis obliterans gelişen 11 çocuğun 8'inde viral infeksiyon vardır ve 3'ünde viral infeksiyon yoktur. Bu 8 çocuğun da 5'inde adenovirusun etken olduğu gösterilmiştir (41).

Parainfluenza virus, human metapnömovirus ve koronavirüs daha az sıklıkta pnömoni yapan viruslardır. 2010'da Kenya'da alt solunum yolu infeksiyonu bulguları olan 750 hastadan oluşan bir çalışmada multipleks PCR ile etken virus aranmış ve sonuçta RSV %34, Koronavirüs %7, İnfluenza A %6, PIV 3 %4, Adenovirus %4 ve Human Metapnömovirus %3 oranında olmak üzere toplam %56 hastada virus bulunmuştur (69).

PIV-3, RSV'den sonra en sık bronşiyolit ve pnömoni etkenidir ve yine RSV'den sonra en sık hastaneye yatış nedenidir. PIV erişkinlerde de solunum yolu infeksiyonları nedeniyle hastaneye yatışta ve immunkompromize hastalar arasında morbidite ve mortalitede önem taşımaktadır (16). Elizaga ve arkadaşlarının, 450 kemik iliği transplantasyonu yapılan hasta arasında yaptığı bir çalışmada 24 (%5) PIV-3 pozitif hasta bulmuşlar ve bunların 10'u üst solunum yolu infeksiyonu iken 14'ünün pnömoniden öldüğünü vurgulamışlardır (70).

Templeton ve arkadaşlarının 2004'te yaptığı bir çalışmada 358 hastadan nazofarengeal sürüntü alınmış ve multipleks PZR yöntemi ile 87'sinde ve virus kültürü yöntemiyle 67'sinde virus tespit edilmiştir. PZR yöntemiyle 63'ü RSV, 8'i İnfluenza A,

4'ü PIV-1, 3'ü PIV-3, 4'ü PIV-4 bulunmuştur. Yine bizim çalışmamızdaki gibi en yüksek oranda bulunan virus RSV olmuştur (71).

HMPV 2001'de tanımlanan bir virustur ve infeksiyonun tanımlanması hem klinik yönden hem de ekonomik yönden önemlidir. Genellikle retrospektif çalışmalar yapılmıştır. 2009'da Japonya'da yazın yapılan bir çalışmada 18 örnekte HMPV bulunmuş ve daha sonra yapılan filogenetik analizde A2 alttipinin baskın olduğu görülmüştür(30,72,73).

Barenfanger ve arkadaşlarının 2008'de yaptığı bir çalışmada 400 hastada immunfloresan yöntemle virus aranmış ve bunların 11(%2.5)'inde HMPV bulunmuştur. Pozitif bulunan yetişkinlerin, şiddetli pnömoni olduğu ve zeminde kronik obstrüktif akciğer hastalığı olduğu vurgulanmıştır (25,74).

2006 ve 2008 yılları arasındaki üç kış sezonunda, Brezilya'da yapılan bir çalışmada 1500 hastadan örnek toplanmış ve RT-PZR ile virus aranmış, sonuç olarak 60 (%3.9) hastada HMPV bulunmuş. HMPV'nin tüm yaş gruplarında görülen bir virus olduğu, hastalığın şiddeti ile alttipi arasında bir bağlantı olmadığı ve aynı mevsimde birden çok alttipin görülebileceği vurgulanmıştır (22).

Koronaviruslar, genellikle üst solunum yolu hastalıkları yaparlar, ama küçük çocuklarda, yaşlılarda ve immun sistemi baskılanmış hastalarda pnömoni de yapabilirler. Yaşlı hastaların akut solunum yolu hastalıklarından %17 oranında koronaviruslar izole edilmiştir, bunların da yarısı pnömonidir (5,75).

Peiris ve arkadaşlarının 2003'te yaptığı bir çalışmada SARS bulguları olan 50 erişkinde PZR ile virus aranmış ve bu sonuçlar serumdaki antikor seviyeleri ve hücre kültürüyle karşılaştırılmıştır. ile karşılaştırılmış; sonuçta 50 hastanın 22(%44)'sinde koronavirus RNA'sı tespit edilmiş ve serumlarında akut ve konvelesan dönemde 4 kat titre artışı gösterilmiştir. Ayrıca aynı sonuçlar hücre kültürüyle doğrulanmıştır(76).

Graat ve arkadaşlarının 2003'te yaptığı bir çalışmada, akut solunum yolu infeksiyonlu, 70 yaş üzeri 100 hastada multipleks PZR ile virus aranmış ve %32'sinde rinovirus, %17'sinde koronavirus ve %7'sinde influenza virus saptanmıştır. İnfluenza aşısı oranı %75 olduğu için influenza oranının bu kadar düşük olduğu ve rinovirus ve koronavirusun yaşlı hastalarda yüksek oranda olduğu vurgulanmıştır (77).

Choi ve ark.nın 2006'da yaptığı alt solunum yolu infeksiyonu bulguları olan 515 hastada multipleks RT-PZR ile virus aranmış ve 122 (%23)'sinde RSV, 33 (%6.5)'ünde influenza virus, 41(%8)'inde parainfluenzavirus, 35(%6.8)'inde Adenovirus ve 8 (%1.6)'inde Koronavirus bulunmuştur (78).

Erdman ve ark.nın 2003'te yaptığı 470 hastalık çalışmada ise multipleks PZR ile 95 hastada RSV, 13 hastada influenza ve 11 hastada ise parainfluenzavirus bulunmuş ve bu sonuçlar hücre kültürü ile de doğrulanmıştır (79). Her iki çalışmada da en yüksek oranda bulunan virus, bizim çalışmamızda olduğu gibi RSV olmuştur.

Sezer ve ark.nın 2011'de yaptığı bir çalışmaya bronkopnömonisi olan 14 yaş altı 258 çocuk hasta alınmış ve multipleks PZR yöntemiyle virus aranmış ve çalışmada bizim kullandığımız ticari multipleks PZR kiti kullanılmıştır. Sonuç olarak 75 (% 29) hastada Rinovirus A, 25 (% 9.6) hastada Rinovirus B ve 14 (%5.4) hastada Rinovirus C tespit edilmiştir (80).

Sonuç olarak;

1. Bölgemizde, Kasım 2010 ile Mart 2011 tarihleri arasında pnömoni tanısı alan, 150'si çocuk ve 150'si yetişkin toplam 300 hastadan nazofarengeal sürüntü örneği alınarak multipleks PZR yöntemiyle viral etyoloji araştırıldı.
2. Toplam 300 örneğin 139 (%46.2)'unda virus bulundu. 139 pozitif örneğin 107 (%35.6)'si çocuk ve 32 (%10.6)'si yetişkindi. Çocuklarda 50 (%36)'si RSV, 10 (%7.1)'u İnfluenza A, 23 (16.5)'ü Rinovirus, 8 (%5.7)'i Parainfluenza virus, 3 (%2.1)'ü Adenovirus, 2 (%1.4)'si İnfluenza B, 4 (%2.9)'ü Koronavirüs, 2 (%1.4)'si Metapnömovirus bulundu. 5 hastada ikişer virus bulundu. 1 hastada İnfluenza A ve RSV, 1 hastada Adenovirus ve RSV, 3 hastada ise Rinovirus ve RSV birlikte bulundu. Yetişkinde ise 12 (%8.6)'si RSV, 9 (%6.4)'u İnfluenza A, 4 (%2.9)'ü Rinovirus, 1(%0.7)'i Parainfluenza virus, 2 (%1.4)'si Adenovirus, 4 (%2.9)'si İnfluenza B bulundu.  
**Toplamda ise** RSV % 44.6, İnfluenza A %13.6, Rinovirus %19.4, Parainfluenza % 6.5, Adenovirus % 3.6, İnfluenza B %4.3, Koronavirüs % 2.9, Metapnömovirus ise %1.4 oranında bulundu.
3. Bizim çalışmamızda çocuklarda viral pnömoni oranı %70, yetişkinlerde %21 bulunurken; hem çocukta hem de yetişkinde en yüksek oranda viral pnömoni sebebi RSV, ikinci sıklıkta ise çocukta rinovirus ve yetişkinde influenza A bulundu. Çocuklardaki pnömonilerde viral etken bulunma sıklığının, yetişkinlerdeki pnömonilerde viral etken bulunma sıklığından daha fazla olduğu ve yapılan t testine göre bu farklılığın anlamlı olduğu gösterildi ( $p > 0.463$ ).

4. Viral DNA'nın pozitif olduğu 139 hastanın 124 (%89)'ünde ateş, 139 (%100)'unda öksürük, 110 (%79)'unda burun akıntısı, 115 (%82)'inde burun tıkanıklığı, 30 (%22)'unda kas ağrısı, 115 (%83)'inde nefes darlığı vardı.
5. PZR 8 saat içinde sonuç verebildiğinden hızlı, kolay, güvenilir ve konvansiyonel metotlara alternatif ama pahalı bir laboratuvar metodudur. Kültürde üretilmesi çok zor olan bazı virusların laboratuvarında tanımlanmasını sağlar.
6. İnfluenza A ve B, RSV gibi antiviral tedaviden faydalanabilecek viruslar için erken tanı önemlidir. Multipleks PZR erken tanı için tercih edilebilir bir yöntemdir. Böylece, erken antiviral tedaviye geçilmesinin sağlanıp, gereksiz antibiyotik tedavisi alınması ve hastalığın nazokomiyal geçişinin engellenmesi gibi avantajları beraberinde getirecektir. Ayrıca bölgemizde viral pnömoni etkenlerinin bilinmesi aşı çalışmaları için yol göstericidir.
7. Çalışma sonunda 161 (% 55.4) hastada hiçbir virus tespit edilemedi. Bunun sebepleri;
  - a. Hastalık etkeninin bizim çalıştığımız kitte olmayan bir virus olması
  - b. Nazofarengeal sürüntünün uygunsuz şekilde alınmış olması
  - c. Bakteriyel bir pnömoni olması
  - d. Örnek alımından, transferinden ve çalışma tekniklerinden kaynaklanan yalancı negatiflik olması olabilir.

**Tablo-8.** Türkiye’de ve çeşitli ülkelerde, solunum yolu hastalıklarında PZR yöntemiyle yapılan çalışmalarda bulunan virusların oranları

| YIL              | ARAŞTIRICILAR         | YER       | VİRUSLAR |      |                |    |      |     |           |      |
|------------------|-----------------------|-----------|----------|------|----------------|----|------|-----|-----------|------|
|                  |                       |           | RSV      |      | İNFLUENZAVİRUS |    | PIV  |     | RİNOVİRUS |      |
| <b>YURT DIŞI</b> |                       |           |          |      |                |    |      |     |           |      |
|                  |                       |           | SAYI     | %    | SAYI           | %  | SAYI | %   | SAYI      | %    |
| 2003             | Erdman ve ark.        | ABD       | 44       | 62   | 14             | 20 | 10   | 14  |           |      |
| 2003             | Boivin ve ark.        | Kanada    | 106      | 51   | 45             | 22 |      |     |           |      |
| 2004             | Templeton ve ark.     | Hollanda  | 57       | 65   | 5              | 6  |      |     |           |      |
| 2005             | Falsey ve ark.        | İngiltere | 144      | 41   | 200            | 57 |      |     |           |      |
| 2005             | Bellau-Pugol ve ark   | Fransa    | 30       | 27   | 30             | 27 | 14   | 13  | 15        | 13,5 |
| 2006             | Choi ve ark.          | Kore      | 122      | 39   | 33             | 10 | 41   | 13  |           |      |
| 2007             | Brittain-Long ve ark. | İsveç     |          |      |                | 25 |      |     |           | 20   |
| 2008             | Liao ve ark.          | Kanada    | 119      | 67   | 59             | 33 |      |     |           |      |
| 2009             | Kim ve ark.           | Kore      | 24       | 36   | 4              | 6  | 33   | 49  |           |      |
| 2009             | Muralı ve ark.        | ABD       | 12       | 39   | 5              | 16 | 1    | 3,2 |           |      |
| 2010             | Lee ve ark.           | Kore      | 55       | 53   | 13             | 13 | 4    | 3   |           |      |
| 2010             | Berkley ve ark.       | Kenya     | 260      | 61   | 44             | 10 | 29   | 7   |           |      |
| <b>TÜRKİYE</b>   |                       |           |          |      |                |    |      |     |           |      |
| 2008             | Yüksel ve ark.        | Manisa    | 12       | 32   | 9              | 24 | 10   | 26  |           |      |
| 2009             | Gökalp ve ark.        | Kayseri   | 20       | 27   |                |    |      |     |           |      |
| 2009             | Topoçuoğlu ve ark     | Mersin    | 33       | 43   | 34             | 44 |      |     |           |      |
| 2011             | Bizim çalışmamız      | Konya     | 62       | 44,6 | 25             | 18 | 9    | 6,5 | 27        | 19,4 |

## 6. ÖZET

**Amaç:** Çalışmanın amacı Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Hastanesi'ne pnömoni nedeniyle başvuran çocuk ve yetişkin hastalarda, viral etkenlerin multiplex polimeraz zincir reaksiyonuyla tespit edilmesidir.

**Gereç ve Yöntem:** Ekim 2010 – Nisan 2011 tarihleri arasında hastaneye başvuran 150 çocuk ve 150 yetişkin pnömonili hastadan nazofarengeal sürüntü örneği toplandı. Bu örnekler çalışılincaya kadar -20°C'de saklandı. Viral DNA/RNA ekstraksiyonu ve amplifikasyonu Seeplex®RV12 multiplex PZR kiti kullanılarak yapıldı. Viral DNA/ RNA çoğaltıldıktan sonra etidyum bromid ile boyanıp %2 agaroz jelde yürütüldü ve büyüklüklerine göre viruslar identifiye edildi.

**Bulgular:** Hastaların 150(%50)'si çocuk kliniğinden, 150(%50)'si ise Göğüs Hastalıkları Kliniği'nden gönderildi. Tüm hastaların %46.2'sinde, en az 1 virus tespit edildi. Pozitif hastaların %45'i RSV olarak tespit edildi. Bunu %19.4 ile rinovirüs, %13.6 ile influenza A, %6.5 ile parainfluenza, %4.3 ile influenza B, %3.6 ile adenovirüs, %2.9 ile koronavirüs ve %1.4 ile metapnömovirus izledi. Toplam 139 olan pozitifin 107'si çocuk ve 32'si yetişkindi. 5 (%1.6) hastada ko-infeksiyon izlendi. 0-4 yaş grubunun %71'inde ve 5-9 yaş grubunun %75'inde etken virus bulundu. Erişkinde virus bulunma oranı düşüktü. Bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu( $p > 0.537$ ).

**Sonuç:** Bizim çalışmamızda %44.6 RSV, %19.4 rinovirus, %17.9 influenza virus, %6.5 parainfluenza virus, %3.6 adenovirus, %2.9 koronavirüs, %1.4 metapnömovirus tespit edildi.

Multipleks PZR testleri, solunum yolu infeksiyonları için kolay, hızlı ve güvenli testlerdir. Bu testlerin, klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında rutin tanı testleri arasında yer alması gereklidir. Viral hastalıklarda etkenin tespit edilmesi, gereksiz antibiyotik reçetelenmesinin önlenmesi ve gerektiğinde uygun antiviralin verilmesini sağlar.

**Anahtar kelimeler:** Solunum yolu infeksiyonları, multipleks PZR, nazofarengeal sürüntü.



## ABSTRACT

**Objective:** The aims of this study was to determine the viral etiology of pneumonia among children and adults at Selcuk University Meram Medical Faculty Hospital using multiplex Polymerase Chain Reaction (PCR) assay.

**Materials And Methods:** Between October 2010-April 2011, nasopharyngeal swab samples were collected from 150 children and 150 adults with pneumonia. All the samples were stored in a freezer at -20°C until PCR was carried out. Viral DNA/RNA was extracted using Viral Gene Spin™ kit according to the manufacturer's instructions and was amplified by Seeplex®RV12 multiplex PCR kit. The amplified products were visualized by electrophoresis an ethidium bromide-stained 2% agarose gel and analyzed by identifying bands.

**Results:** 150 patients were from pediatric clinics and 150 patients were from pulmonary diseases clinics. At least one viral agent was detected in 46.2% of all patients. RSV was the most common agents encountered among virus DNA positive patients (45%), and followed by rhinovirus (19.4%), influenza A (13.6%), parainfluenza (6.5%), influenza B(4.3%), adenovirus (3.6%), koronavirus (2.9%) and human metapneumovirus (1.4%) viruses. Positive in 107 (35.6%) of the 139 patients were children and 32 (10.6%) were adults. Co-infection was detected in 5 (1.6%) of all patients. The rate of virus positive was found to be 71% in age group of 0-4 and was found to be 75% in age group of 5-9. The rate of virus positive in adults was lower. This difference was found statistically significant ( $p > 0.537$ ).

**Conclusion:** In this study, the rate of RSV was found to be 45%, rinovirus was found to be 19.4%, influenza virus was found to be 18%, parainfluenza was found to be 6.5%, adenovirüs was found to be 3.6%, koronavirüs was found to be 2.9 % and metapnömovirus was found to be 1.4%.

Multiplex PCR assays are rapid, easy and reliable methods and used in the diagnosis of respiratory diseases. These tests are required to take place among the routine diagnostic procedurs at clinical microbiology laboratories. Viral detection may reduce unnecessary prescription of antibiotics and may prompt antiviral treatment such as oseltamivir (against influenza) to the patient or exposed family members.

**Key words:** Respiratory tract infections, multiplex PCR, nasopharyngeal aspirates.

## **7. TEŞEKKÜR:**

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, tez çalışmamda ve her konuda yardımlarını esirgemeyen tez danışmanım ve Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Bülent BAYSAL'a, Sayın Prof. Dr. Mahmut BAYKAN'a, Sayın Yrd. Doç. Dr. Mehmet ÖZDEMİR'e, Yrd. Doç. Dr. Bahadır Feyzioğlu'na teşekkür ediyorum. Ayrıca meslek hayatıma katkılarından dolayı hocalarım Sayın Prof. Dr. İnci TUNCER'e, Sayın Prof. Dr. Duygu FINDIK'a, tezimi 10102008 nolu projeyle destekleyen Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne, birlikte çalıştığım asistan arkadaşlarıma, tüm mikrobiyoloji laboratuvarı teknisyen ve personeline, hayatım boyunca hep yanımda olan ve benden desteğini, sabrını ve anlayışını hiçbir zaman esirgemeyen sevgili aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

## KAYNAKLAR

1. Murray P, Baron E, Jergensen J, Landry M, Pfaller M. Klinik Mikrobiyoloji 9.baskı Böl:85-86-87-89-90 s: 1340-1420
2. Aslan SS. İnfluenza Virusunun Tanısında Hücre Kültürü, Hızlı Test, Real Time PCR Yöntemlerinin Karşılaştırılması ve İzole Edilen Virusların Tiplendirilmesi (Doktora Tezi). İstanbul: İ.Ü Sağlık Bilimleri Enstitüsü 2006
3. Yenen O. Pandemik İnfluenza Aşılı. İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi 2010: Vol 73, Sayı 1, 20-26.
4. Cox NJ, Ziegler T, İnfluenza Viruses. In: Muray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editors: Manual of Clinical Microbiology. First ed.Washington: ASM Press; 2003. p. 1360-7
5. Falsey A, Walsh E. Viral pneumonia in older adults. Aging and infectious disease 2006; 42: 518-524
6. Hançerli S, Somer A, Salman N, Elshana H, Demirkol D, Kanturvardar M. Pandemik influenza; İstanbul'da bir üniversite hastanesine yatan çocuk vakaların klinik ve epidemiyolojik değerlendirmesi. Çocuk Enfeksiyon Dergisi 2010;4: 104-109
7. Aydın F, Buruk K, Ertürk M: Hastanemizde Klinik Olarak Grip Tanısı Alan Hasta Örneklerinde Pandemik İnfluenza A/H1N1/2009 Virus RNA İzolasyon Oranı. Mikrobiyoloji Bülteni 2010; 44: 527-528
8. Badur S. İnfluenza İnfeksiyonlarının Epidemiyolojik Özellikleri. Çocuk Enf. Derg . 2007; 1: 56-60
9. Babcock H, Merz L, Fraser V. Is Influenza an İnfluenza-like Illness? Clinical presentation of İnfluenza in hospitalized. Infection Control and Hospital Epidemiology 2006; 27: 3
10. Badur S, Abacıoğlu H. Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji, 2006. Bölüm 5: 61-75
11. Özdemir M: Konya bölgesinde grip hastalığı etkeni influenza viruslarının farklı yöntemlerle araştırılması(Doktora Tezi). Konya: Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2011
12. Kaygusuz S, Köksal İ, Aydın K, Çaylan R. Investigation of atypical bacteria and virus antigens in respiratory tract infections by use of an immunofluorescence method. Jou.Infect Dis. 2004;57: 33-36
13. White D, Fenner F. Medikal Viroloji, 2000. Bölüm 19 s.307-315

14. Kocabaş E, Ersöz D, Karakoç F, Tanır G, Cengiz A, Gür D. Türk Toraks Derneği. Çocuklarda toplumda gelişen pnömoni tanı ve tedavi uzlaşma raporu 2009.
15. Sung R.Y.T, Chan P, Tsen T, Li A, Lau W, Young A. Identification of viral and atypical bacterial pathogens in children hospitalized with acute respiratory infections in Hong Kong by multiple PCR assays. *Journal Medical Virology* 2009; 81: 153-159
16. Bozkaya E. Parainfluenza, adeno, korona ve rinoviruslar. *Ankem Dergisi* 2006; 20: 248-253.
17. Elizaga J, Olavarria E, Apperley F, Goldman M, Ward K. Parainfluenza virus 3 infection after stem cell transplant: Relevance to outcome of rapid diagnosis and ribavirin treatment. *Clinical Infectious Diseases* 2001; 32: 413-418.
18. Thwates R, Piercy J. Nasocomial respiratory syncytial virus infection in neonatal units in the United Kingdom. *Acta Pediatrica Suppl* 2004; 444: 23-25
19. Tsolia M.N, Kafetzis D, Danelatou K, Astra H, Kallergi K, Spyridis P. Epidemiology of respiratory syncytial virus bronchiolitis in hospitalized infants in Greece. *European Journal of Epidemiology* 2003; 18: 55-61
20. Jartti T, Lehtinen P, Vuorinen T, Osterbach R, Hoogen B, Osterhaus A. Respiratory Picornaviruses and Respiratory Syncytial virus as causative agents of acute expiratory wheezing in children. *Emerging Infectious Diseases*. 2004;10: 6
21. Kaygusuz S. Hastane kökenli pnömonilerde infeksiyona neden olan mikroorganizmalar. *Yoğunbakım Dergisi* 2007;7(1): 123-127
22. Debur M, Vidal L, Stroparo E, Nogueira M, Almeida S, Takahashi G. Impact of human metapneumovirus infection on in and outpatients for the years 2006-2008 in Southern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2010; 105(8): 1010-1018
23. Sandrock C, Stollenwerk N. Acute Febrile Respiratory Illness in the ICU. *Chest* 2008; 133:1221-1231.
24. Englund J, Boeckh M, Kuypers J, Nichols G: Brief Communication. Fatal Human Metapneumovirus Infection in Stem-cell Transplant Recipients. *Ann Intern Med* 2006; 144: 344-349.
25. Devrim İ, Seçmeer G. Yeni tanımlanan solunum yolu virusu insan metapnömoviruslarına bağlı infeksiyonlar. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2005; 36: 163-167
26. Kahn J. Human Metapneumovirus: a newly emerging respiratory pathogen. *Current Opinion in Infectious Diseases* 2003; 16: 255- 258

27. Larcher C, Geltner C, Fischer H, Nachbaur D, Muller LC, Huemer HP. Human metapneumovirus infection in lung transplant recipients: clinical presentation and epidemiology. *Journal Heart Lung Transplant* 2005; 24: 1891–901
28. Van Den Hoogen BG, Van Doornum GJ, J.C.Fockens, Comelissen JJ, Beyer WE, Groot R, Osterhaus AD, Fouchier RA. Prevalance and clinical symptoms of human metapneumovirus infection in hospitalized patients. *Journal of Infectious Diseases* 2003; 188: 1571-1577
29. Van Den Hoogen BG, Jong JC, Groen J, Kuiken T, Groot R, Fouchier RA ve Osterhaus AD. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract diseases. *Nat Med* 2001 Jun; 7(6): 719-24.
30. Falsey A, Hennessey P, Formica M, Criddle M, Biear J, Walsh E. Humoral immunity to human metapneumovirus infection in adults. *Vaccine* 2010; 28: 1477-1480
31. Mackaya I.M. Human rhinoviruses: The cold wars resume. *Journal of Clinical Virology* 2008; 42: 297–320
32. Kling S, Donniger H, Williams Z, Vermeulen J, Weinberg E, Latif K, Ghildyal R. Persistence of rhinovirus RNA after asthma exacerbation in children. *Clin Exp Allergy* 2005; 35: 672-678
33. Xatzipsalti M, Kyrana S, Tsofia M, Psarros S, Bossios A, Stanca V. Rhinovirus viremia in children with respiratory infections. *Respir Crit Care Med.* 2005; 172: 1037-1040
34. Kuypers J, Martin E, Heugel J, Wright N, Morrow R, Englund J. Clinical Diseases in Children Associated with Newly Described Coronavirus Subtypes. *ANKOS* 2006; 10: 1542
35. Alkan S, Özge Yılmaz Ö, Yüksel H. Çocukluk Çağı Alt Solunum Yolu Enfeksiyonlarında Yeni Etkenler. *Türkiye Çocuk Hast. Derg* 2010; 4(3): 187-192
36. Ruh E. SARS Aşı Çalışmalarında Son Gelişmeler. *Mikrobiyoloji Bülteni* 2010; 44: 505-517
37. Yu X, Pan J, Ye R, Xiang H, Kou Y, Huang Z. Preparation of armored RNA as a control for multiplex real-time reverse transcription-PCR detection of influenza virus and severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Journal of Clinical Microbiology* 2008; 46 (3): 837-841
38. Xu W, Mc Donough M, Erdman D: Species- specific Identification of Human Adenoviruses by a multiplex PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology* 2000; 38 (11): 4114-4120

39. Echavarria M, Kolavic SA, Cersovsky S, Mitchell F, Sanchez JL, Polyak C, Innis BL, Binn LN. Detection of adenoviruses (AdV) in culture-negative environmental samples by PCR during an AdV-associated respiratory disease outbreak. *Journal of Clinical Microbiology* 1998; 36(11): 3323-26
40. Ellis JS, Zambon MC. Molecular diagnosis of influenza. *Rev Med Virol* 2002; 12: 375-89
41. Yüksel H, Yılmaz Ö, Akçalı S, Söğüt A, Yılmaz D, Urk V. Küçük çocuklarda toplum kökenli viral alt solunum yolu enfeksiyonu etkenlerinin sıklığı ve uzun dönem komplikasyonu ile ilişkileri. *Mikrobiyoloji Bülteni* 2008; 42: 429-435
42. Oliveira E, Lee B, Colice G. Influenza in the intensive care unit. *Journal of Intensive Med.* 2003; 18: 80-91
43. Selçuk T: Viral Pnömoniler. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2002
44. Paketçi C. Çocuk polikliniğimize başvuran hastalarda hızlı test ile influenza tanısı. Sağlık Bakanlığı Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi (Uzmanlık tezi)2008: 1-48
45. Bryce J, Pinto C, Shibuya K, Black R, WHO Child Health Epidemiology Reference Group. WHO estimates of the causes of death in children *Lancet* 2005; 365: 1147-1152
46. Stein R, Marostica P. Community- acquired pneumonia. *Ped Pulmonology* 2007; 42: 1095-1103
47. Long R, Westin J, Olofson S, Lindh M, Anderson L. Prospective evaluation of a novel multiplex real-time PCR assay for detection of fifteen respiratory pathogens—Duration of symptoms significantly affects detection rate. *Journal of Clinical Virology* 2010; 47: 263-267
48. Lee J, Chun J, Kim D, Park Y, Choi J, Kim H. Identification of Adenovirus, Influenza Virus, Parainfluenza Virus, and Respiratory Syncytial Virus by Two Kinds of Multiplex Polymerase Chain Reaction (PCR) and a Shell Vial Culture in Pediatric Patients with Viral Pneumonia. *Yonsei Med Journal* 2010; 51(5): 761-767
49. Topçuoğlu S, Arslanköylü A, Kuyucu S, Kuyucu N. Hışılılı çocuklarda Respiratuvar Sinsisyal Virus, Parainfluenza Virus, İnfluenza Virus ve Metapnömovirus sıklığının araştırılması. *Çocuk İnfeksiyon Dergisi* 2009; 3: 153-160
50. Kim S, Ki C, Lee N. Rapid detection and identification of 12 respiratory viruses using a dual priming oligonucleotide system-based multiplex PCR assay. *Journal of Virological Methods* 2009; 156: 111-116

51. Kehl S, Henrickson K, Hua W, Fan J. Evaluation of the Hexaplex Assay for detection of respiratory viruses in children. *Journal of Clinical Microbiology* 2001;39(5): 1696-1701
52. Zhang H, Li Z, Zhang G, Diao T, Cao C, Sun H. Respiratory viruses in Hospitalized Children with Acute Lower Respiratory Tract Infections in Harbin. *Journal Infection Diseases* 2009; 62: 458-460
53. Eidelman A, Megged O, Feldman R, and Toker O. The Burden of Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis on a Pediatric Inpatient Service. *IMAJ* 2009; 11
54. Gökalp C, Gökahmetoğlu S, Deniz E, Güneş T. Alt solunum yolu enfeksiyonu olan çocuklarda solunum sinsisyal virus varlığının üç farklı yöntemle araştırılması. *Mikrobiyoloji Bülteni* 2009; 43: 433-438
55. Liao RS, Tomalty LL, Majury A, and Zoutman DE . Comparison of Viral Isolation and Multiplex Real-Time Reverse Transcription-PCR for Confirmation of Respiratory Syncytial Virus and Influenza Virus Detection by Antigen Immunoassays. *Journal of Clinical Microbiology* 2009; 3: 527–532
56. Brittain-Long R, Nord S, Olofsson S, Westin J, Anderson L, Lindh M: Multiplex real-time PCR for detection of respiratory tract infections. *Journal of Clinical Virology* 2008; 41: 53-56
57. Bellau-Pujol S, Vabret A, Legrand L, Dina J, Gouarin S, Pozzetto B. Development of three multiplex RT-PCR assays for the detection of 12 respiratory RNA viruses. *Journal of Virological methods* 2005;11: 53-63
58. Falsey A, Hennessey P, Formica M, Cox C, Walsh E. Respiratory Syncytial Virus Infection in Elderly and High-Risk Adults. *N Engl J Med* 2005; 352;17
59. Boivin G, Cote S, Dery P, Serres G, and Bergeron M. Multiplex Real-Time PCR Assay for Detection of Influenza and Human Respiratory Syncytial Viruses. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; 4: 45–51
60. Çarhan A, Atlas A.B, Albayrak N, Uyar Y. 2007-2008 Kış sezonunda Türkiye'nin Dokuz İlinde İnfluenza Sürveyans Sonuçları. *Mikrobiyoloji Bul* 2009; 43: 235-241
61. Watanebe A, Carraro E, Candeias J, Donalisio M, Leal E, Granato C, Bellei N. Viral etiology among the elderly presenting acute respiratory infection during the influenza season. *Medicina Tropical* 2011; 44(1): 18-21
62. Louie J, Hacker J, Gonzales R, Mark J, Maselli J, Yagi S, Drew L. Characterization of Viral Agents Causing Acute Respiratory Infection in a San Francisco University Medical Center Clinic during the Influenza Season. *Clinical Infectious Diseases* 2005; 41: 822-828

63. Muralı S, Langston A, Nolte F, Banks G, Martin R, Caliendo A. Detection of respiratory viruses with a multiplex polymerase chain reaction assay (MultiCode-PLx Respiratory Virus Panel) in patients with hematologic malignancies. *Leukemia and Lymphoma* 2009; 50(4): 619-624.
64. Wilkesmann A, Schildgen O, Hubinger M, Geikowski T, Glatzel T, Lentze M, Bode U, Simon A. Human metapneumovirus infections cause similar symptoms and clinical severity as respiratory syncytial virus infections. *Eur J Pediatr* 2006; 165: 467-475
65. Smuts H, Workman L, Zar H. Human rhinovirus infection in young African children with acute wheezing. *Infectious Diseases* 2011;6: 11:65
66. Bodur E, Yapar M, Şener K, Çökmüş C, Güney Ç, Kubar A. Üst solunum yolu yakınmaları olan ilköğretim çağı çocuklarında polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi kullanılarak adenovirus araştırılması. *Gülhane Tıp Dergisi* 2009; 51: 162-167
67. Aslan SS, Yılmaz G. Akut solunumyolu infeksiyonlu çocuklarda adenovirus insidansının saptanması. *Türk Mik Cem Der* 2001; 31: 242-244
68. Şener K, Yapar M, Güney Ç, Kubar A, Kılıç A, Altaylı E. Solunum yolu infeksiyonu olan askerlerin nazofarengeal örneklerinde Adenovirus varlığının ve alt gruplarının araştırılması. *Mikrobiyoloji Bülteni* 2009; 43: 91-101
69. Berkley J, Munywoki P, Ngama M, Kazungu S, Abwao J, Bett A. Viral Etiology of Severe Pneumonia Among Kenyan Infants and Children. *JAMA* 2010; 303: 20
70. Elizaga J, Olavarria E, Apperley J.F, Goldman M, Ward K.N. Parainfluenza virus 3 Infection after stem cell transplant: Relevance to outcome of rapid diagnosis and ribavirin treatment. *Clinical Infectious Diseases* 2001; 32: 413-418
71. Templeton K, Scheltinga S, Beersma M, Kroes A, Claas E. Rapid and sensitive method using multiplex Real-time PCR for diagnosis of infections by Influenza A and Influenza B viruses, RSV, and Parainfluenza viruses 1,2,3, and 4. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; 4: 1564-1569
72. Toda S, Kimura H, Noda M, Mizuta K, Matsumoto T, Suzuki E, Shirabe K. Phylogenetic analysis of human Metapneumovirus from children with acute respiratory infection in Yamaguchi, Japan, during summer 2009. *Journal Infection Diseases* 2010; 63
73. Peiris J.S, Tang W, Chan K, Khong P, Guan Y, Lau Y, Chiu S. Children with respiratory diseases associated with Metapneumovirus in Hong Kong. *Emerging Infectious Diseases* 2003; 9:6



74. Barenfanger J, Mueller T, O'Brian J, Drake C, Lawhorn J. Prevalance of Human Metapneumovirus IN Central Illinois in Patients Thought to have Respiratory Viral Infection. *Journal of Clinical Microbiology* 2008; 4: 1489-1490
75. Woo P, Lau S, Chu C, Chan K, Tsoi H, Huang Y. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *Journal of Virology* 2005; 1: 884-895
76. Peiris JS, Lai ST, Poon LL, Guan Y, Yam LYC, Lim W. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *The Lancet* 2003; 361: 1319-1325
77. Graat J, Schouten E, Heijnen M, Kok F, Pallast E, Greeff S. A prospective, community-based study on virologic assesment among elderly people with and without symptoms of acute respiratory infection. *Journal of Clinical Epidemiology* 2003;56: 1218-1223
78. Choi E, Lee H, Kim S, Eun B, Kim N, Lee J. The association of newly identified respiratory viruses with lower respiratory tract infections in Korean children 2000-2005. *Clinical Infectious Diseases* 2006; 43: 585-592
79. Erdman D, Weinberg G, Edwards K, Walker F, Anderson B, Winter J. GeneScan Reverse Transcription-PCR Assay for detection of six common respiratory viruses in young children hospitalized with acute respiratory illness. *Journal of Clinical Microbiology* 2003; 41: 4298-303
80. Sezer G, Ünsür E, Akçay F, Gökalp A. Onüç aylık bir süt çocuğunda bronkopnömoniye neden olan yeni bir Rinovirus. *Rinovirus C. Ankem Dergisi* 2011;2: 114-116