

Solunum Virusları ve İnfluenza A Virus Alt Tiplerinin Multipleks PCR Yöntemi ile Aynı Anda Saptanması*

Simultaneous Detection of Respiratory Viruses and Influenza A Virus Subtypes Using Multiplex PCR

Candan ÇİÇEK¹, Nuri BAYRAM², Murat ANIL³, Figen GÜLEN⁴, Hüsnü PULLUKÇU⁵, Eylem Ulaş SAZ⁴, Canan TELLİ⁶, Gürsel ÇOK⁷

¹ Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

¹ Ege University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Izmir, Turkey.

² Dr. Behçet Uz Çocuk Hastanesi, Çocuk Enfeksiyon Hastalıkları Kliniği, İzmir.

² Dr. Behcet Uz Children's Hospital, Department of Pediatric Infectious Diseases, Izmir, Turkey.

³ Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Bölümü, İzmir.

³ Tepecik Educational and Research Hospital, Department of Pediatrics, Izmir, Turkey.

⁴ Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, İzmir.

⁴ Ege University Faculty of Medicine, Department of Pediatrics, Izmir, Turkey.

⁵ Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

⁵ Ege University Faculty of Medicine, Department of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, Izmir, Turkey

⁶ Ege Üniversitesi Hastanesi, Göğüs Hastalıkları Kampüs Polikliniği, İzmir.

⁶ Ege University Hospital Outpatient Clinic of Chest Diseases, Izmir, Turkey.

⁷ Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı, İzmir.

⁷ Ege University Faculty of Medicine, Department of Chest Diseases, Izmir, Turkey.

* Bu çalışma, Ege Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Fonu (Proje No: 2010TIP25) tarafından desteklenmiş ve 2. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi (9-13 Kasım 2013, Belek, Antalya) ile 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (May 10-13, 2014, Barcelona, Spain)'de poster olarak sunulmuştur.

Geliş Tarihi (Received): 18.07.2014 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 15.09.2014

ÖZET

Bu çalışmada, influenza A (H1N1)pdm09 virusu ile oluşan salgın sonrasında, grip semptomu olan hastalarda solunum viruslarının araştırılması ve influenza A virusu saptanan hastalarda alt tiplerin multipleks PCR yöntemiyle tiplendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya, Eylül 2010-Ocak 2013 tarihleri arasında, 38°C'nin üzerinde ateş, halsizlik, rinit, baş ve boğaz ağrısı, öksürük, miyalji gibi Dünya Sağlık Örgütü'nün tanımladığı grip semptomları olan 700 olgudan (313 kadın, 387 erkek; yaş aralığı: 24 gün-94 yıl, ortalama yaş: 1 yıl) alınan nazofaringeal sürüntü örnekleri dahil edilmiştir. Örneklerden nükleik asit ekstraksiyonu (Viral DNA/RNA Extraction Kit, iNtRON, Güney Kore) ve cDNA sentezi (RevertAid First Strand cDNA

İletişim (Correspondence): Prof. Dr. Candan Çiçek, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 35100 Bornova, İzmir, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 232 390 2993, **E-posta (E-mail):** candan.cicek@ege.edu.tr

Synthesis Kit, Fermentas, ABD) üretici firmaların önerileri doğrultusunda yapılmıştır. İnfluenza A (INF-A), influenza B (INF-B), solunum sinsityal virusu (RSV) ve diğer solunum viruslarına ait nükleik asitlerin multipleks amplifikasyonu, DPO (dual priming oligonucleotide) primerler ve RV5 ACE Screening Kit (Seegene, Güney Kore) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PCR ürünleri, Screen Tape çoklu tanımlama sistemi kullanılarak otomatize poliakrilamid jel elektroforezi ile saptanmıştır. Pozitifliğin saptandığı örnekler, özgül DPO primerleri, FluA ACE Subtyping ve RV15 Screening (Seegene, Güney Kore) kitleri ile tekrar çalışılmış; bu kitlerle INF-A virusunun dört alttipi [human H1 (hH1), human H3 (hH3), swine H1 (sH1), avian H5 (aH5)] ile diğer 11 solunum virusu [Adenovirus, parainfluenza virus (PIV) tip 1-4, insan bokavirüsü (HBoV), insan metapnömovirüsü (HMPV), rinovirus tip A ve B, koronavirus (HCoV) OC43 ve 229E/NL63] araştırılmıştır. Çalışılan örneklerin %53.6 (375/700)'sında en az bir solunum virusuna ait nükleik asit pozitifliği saptanmış; pozitif olguların %15.7 (59/375)'sinde çoklu etken tespit edilmiştir. Çoklu virus enfeksiyonlarının %83 (49/59)'ü pediatrik grupta görülmüştür. İkili etken enfeksiyonlarında en sık RSV ve rinovirus birlikteliği (18/29, %62.7) izlenmiştir. Hastalarda (n= 375) saptanan toplam 436 solunum virusunun 189 (%43.3)'ü RSV, 93 (%21.4)'ü rhinovirus, 86 (%19.8)'sı INF-A, 7 (%1.6)'si INF-B, 22 (%5)'si PIV tip 1-3, 14 (%3.2)'ü HMPV, 11 (%2.5)'i HCoV, 9 (%2)'ü HBoV ve 5 (%1.2)'i adenovirus olarak tanımlanmıştır. Toplam 86 INF-A virusunun 55 (%64)'i hH3, 24 (%27.9)'ü sH1 ve 7 (%8.1)'si hH1 olarak tiplendirilmiş; aH5 hiç bir örnekte tespit edilmemiştir. INF-A, INF-B, RSV ve diğer solunum viruslarının prevalansı sırasıyla; %12, %1, %27 ve %14.6 olarak bulunmuştur. RSV çocuklarda (161/313, %51), INF-A ise erişkinlerde (24/62, %38.7) en sık saptanan solunum virusları olmuştur. Grip semptomları olan hastaların %13.3 (93/700)'ünde sorumlu etkenin influenza virusları olduğu görülmüştür. Olgulardan, 1 aylık bir bebeğin üç virus tipi (INF-A hH1 + INF-A sH1 + HCoV OC43), 82 yaşında bir olgunun ise iki ayrı INF-A alt tipi (hH3 + sH1) ile enfekte olduğu belirlenmiştir. INF-A viruslarının en sık aralık-mart ayları arasında (79/86) saptandığı izlenmiştir. INF-A sH1, Şubat 2011 tarihine kadar grip olgularında en sık saptanan alt tip olmuş (22/86) ve daha sonra yerini hH3'e bırakmıştır. Şubat 2012 tarihinden itibaren grip olgularında INF-A hH3 alt tipinde belirgin bir artış (39/86) görülmüştür. Sonuç olarak, toplumda dolaşan influenza virus tip ve alt tiplerinin belirlenmesi ve sürvayansının, hem epidemiyolojik verilere katkı sağlamak hem de aşı tiplerinin seçimine yardımcı olmak açısından önemli olduğu düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: İnfluenza tip A virusu; alt tip; multipleks PCR; solunum virusları.

ABSTRACT

This study was conducted to investigate the respiratory viruses and subtyping of influenza A virus when positive by multiplex PCR in patients with flu-like symptoms, after the pandemic caused by influenza A (H1N1)pdm09. Nasopharyngeal swab samples collected from 700 patients (313 female, 387 male; age range: 24 days-94 yrs, median age: 1 yr) between December 2010 - January 2013 with flu-like symptoms including fever, headache, sore throat, rhinitis, cough, myalgia as defined by the World Health Organization were included in the study. Nucleic acid extractions (Viral DNA/RNA Extraction Kit, iNTRON, South Korea) and cDNA synthesis (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kits, Fermentas, USA) were performed according to the manufacturer's protocol. Multiplex amplification of nucleic acids was performed using DPO (dual priming oligonucleotide) primers and RV5 ACE Screening Kit (Seegene, South Korea) in terms of the presence of influenza A (INF-A) virus, influenza B (INF-B) virus, respiratory syncytial virus (RSV), and the other respiratory viruses. PCR products were detected by automated polyacrylamide gel electrophoresis using Screen Tape multiple detection system. Specimens which were positive for viral nucleic acids have been further studied by using specific DPO primers, FluA ACE Subtyping and RV15 Screening (Seegene, South Korea) kits. Four INF-A virus subtypes [human H1 (hH1), human H3 (hH3), swine H1 (sH1), avian H5 (aH5)] and 11 other respiratory viruses [Adenovirus, parainfluenza virus (PIV) types 1-4, human bocavirus (HBoV), human metapneumovirus (HMPV), rhinovirus types A and B, human coronaviruses (HCoV) OC43, 229E/NL63] were investigated with those tests. In the study, 53.6% (375/700) of the patients were found to be infected with at least one virus and multiple respiratory virus infections were detected in 15.7% (59/375) of the positive cases, which

were mostly (49/59, 83%) in pediatric patients. RSV and rhinovirus coinfections were the most prevalent (18/29, 62.7%) dual infections. The distribution of 436 respiratory viruses identified from 375 patients were as follows; 189 (43.3%) RSV, 93 (21.4%) rhinovirus, 86 (19.8%) INF-A, seven (1.6%) INF-B, 22 (5%) PIV types 1-3, 14 (3.2%) HMPV, 11 (2.5%) HCoV, nine (2%) HBoV, and five (1.2%) adenovirus. Fifty-five (64%) out of 86 INF-A viruses were subtyped as hH3, 24 (27.9%) were sH1 and seven (8.1%) were hH1. Avian H5 was not detected in any samples. The overall prevalence rates of INF-A, INF-B, RSV and other respiratory viruses were 12%, 1%, 27%, and 14.6%, respectively. RSV was the most prevalent respiratory agent in pediatric (161/313, 51%) cases, while INF-A virus in adult (24/62, 38.7%) patients. Influenza viruses were detected as responsible pathogens in 13.3% (93/700) of the patients with flu-like symptoms. Among the cases, a 1-month-old baby was infected with three virus strains (INF-A hH1+INF-A sH1+HCoV OC43) and a 82-year-old patient was infected with two INF-A virus subtypes (hH3 + sH1). INF-A viruses were mostly detected (79/86) in winter period, from December to March. INF-A virus sH1, was the most prevalent subtype in flu cases till February 2011 (22/86), after replaced by INF-A virus hH3. Beginning from February 2012, a significant increase observed in the cases infected with INF-A virus subtype hH3 (39/86). In conclusion, the identification and surveillance of influenza virus types and subtypes circulating in populations have importance both for epidemiological data and selection of vaccine strains.

Key words: *Influenza virus type A; subtype; multiplex PCR; respiratory viruses.*

GİRİŞ

Akut solunum yolu hastalıkları toplumda en yaygın görülen enfeksiyon hastalıklarından biridir. Çocuklarda ve yaşlılarda ciddi ve yaşamı tehdit eden klinik bulgularla seyredebilir ve özellikle beş yaş altı çocuklarda tüm ölümlerin 1/5'inin nedenidir^{1,2}. Akut solunum yolu enfeksiyonlarının yaklaşık %20-60'ının virus kaynaklı olduğu vurgulanmaktadır^{2,3}. Genel olarak, çocuklarda en sık görülen etken solunum sinsityal virusu (RSV), erişkinlerde ise influenza viruslarıdır^{2,3}. Yapılan araştırmalarda, özellikle yaşamın erken dönemlerinde kişilerin yılda 5-6 kez viral solunum yolu enfeksiyonu geçirdikleri bildirilmiştir².

Epidemi ve pandemilere neden olan influenza A (INF-A) virusunun toplumdaki yaygınlığı, diğer solunum viruslarından farklıdır. Her bölgeye göre influenza viruslarının etkinliğinin başladığı aylar, süresi ve pik yaptığı dönemler değişmektedir. İnfluenza virusları hızla toplumda yayıldığı ve kitleleri etkilediği için grip surveyansına tüm dünyada önem verilmektedir^{4,5}. Ülkemizde de 2005 yılından itibaren "Ulusal Sentinel Surveyans Ağı" kurularak, ülke düzeyinde aktivite gösteren INF-A virusunun alt tipleri, yaygınlığı, mevsimsel özellikleri gibi verilere ulaşılması sağlanmıştır^{6,7}. Böylece dünya çapında influenza aktivitesi ile ilgili bilgiler paylaşılmakta, yeni bir alt tipin ortaya çıkıp çıkmadığı belirlenebilmekte ve ulusal ve uluslararası platformda influenza viruslarının yayılımının en aza indirilebilmesi için önlemler alınabilmektedir. Bu çalışmada, 2010-2013 yılları arasında grip semptomlarıyla başvuran hastalardan alınan nazofaringeal sürüntü (NFS) örneklerinde multipleks PCR yöntemiyle solunum viruslarının dağılımının araştırılması ve INF-A virusu pozitif olanların alt tiplerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Eylül 2010-Ocak 2013 tarihleri arasında 38°C'nin üzerinde ateş, halsizlik, rinit, baş ve boğaz ağrısı, öksürük, miyalji gibi Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün tanımladığı⁸ grip semptomları olan 557 çocuk ve 143 erişkin olmak üzere toplam 700 hastanın (313 kadın, 387 erkek; yaş aralığı: 24 gün-94 yıl, ortanca: 1 yıl) NFS örnekleri toplandı. Örnekler laboratuvara soğuk zincir kurallarına uyularak viral taşıma besiyeri (VTM, Vircell, İspanya) içinde gönderildi. Çalışma, Ege Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı (11.01.2010, sayı: 09-10.1/3) ile gerçekleştirildi.

Örneklerden nükleik asit ekstraksiyonu, Viral DNA/RNA Extraction Kit (iNtRON, Güney Kore) kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda yapıldı. Ekstraksiyon işleminden itibaren reaksiyona internal kontroller ilave edildi. Ekstraksiyon işleminden sonra, ters transkripsiyon ile cDNA'lar üretici firmanın (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kits, Fermentas, ABD) önerileri doğrultusunda sentezlendi ve cDNA'ların multipleks amplifikasyonu DPO (dual priming oligonucleotide) primerler ve "RV5 ACE Screening Kit" (Seegene, Güney Kore) (Influenza virus tip A ve B, RSV ve diğer solunum virusları) kullanılarak üretici firmanın önerilerine göre yapıldı. Amplifiye ürün tam otomatize "Screen Tape" çoklu tanımlama cihazına yüklendi. Bu cihazda, PCR ürününe otomatize poliakrilamid jel elektroforezi uygulandı ve sonuçlar "RV5 ACE Screening Software" kullanılarak belirlendi.

Diğer solunum virusları veya INF-A virusu pozitif bulunan örneklerle tekrar multipleks PCR (mPCR) uygulanarak tiplendirme yapıldı. Gruplandırılmış şekilde diğer solunum virusları [adenovirus (AdV), parainfluenza virus tip 1-4 (PIV 1-4), insan bokavirüsü (HBoV), insan metapnömovirüsü (HMPV), rinovirus A/B (HRV), insan koronavirüsü (HCoV) OC43, 229E/NL63] pozitif bulunan örnekler, her bir virusa özgül DPO primerleri, DNA polimeraz enzimi, dNTPs, ana karışım (mastermix), 8-MOP solüsyonu, internal kontrol bulunan "RV15 ACE Screening" (Seegene, Güney Kore) kiti kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda cDNA'lar çoklu amplifiye edildi. Amplifiye ürün tam otomatize "Screen Tape" çoklu tanımlama cihazına yüklendi. Bu cihazda, PCR ürününe otomatize poliakrilamid jel elektroforezi yapıldı ve sonuçlar "RV15 ACE Screening Software" kullanılarak belirlendi.

INF-A virusu pozitif bulunan örneklerle, içeriğinde; "human" H1 ve H3 (hH1, hH3), "swine" H1 (sH1) ve "avian" H5 (aH5) serotiplerine özgül DPO primerleri, DNA polimeraz enzimi, dNTPs, ana karışım, 8-MOP solüsyonu, internal kontrol bulunan "FluA ACE Screening" (Seegene, Güney Kore) kiti kullanılarak üretici firmanın önerilerine göre cDNA'lar çoklu amplifiye edildi. Amplifiye ürün tam otomatize "Screen Tape" çoklu tanımlama cihazına yüklendi; yukardaki işlemler tekrarlandı ve "FluA ACE Subtyping Software" ile INF-A virusu tiplendirildi.

Tüm testlerde pozitif ve negatif kontroller kullanıldı. Kullanılan kitlerin tümünde solunum viruslarının ve INF-A alt tiplerinin özgül bölgeleri çoğaltıldı ve her biri farklı amplikon boyutlarında sentezlendi⁹. Elde edilen sonuçlarda, sınırda bant yoğunluğu olan ve geçersiz sonuç alınan örneklerin tümünde test tekrarlandı.

İstatistiksel analizde, oranların belirlenmesi ve ki-kare testi (Pearson Chi-Square), SPSS (v21) programıyla yapıldı.

BULGULAR

Çalışmamızda, grip semptomları olan toplam 700 hastanın 375 (%53.6)'inde, en az bir solunum virusuna ait nükleik asit pozitifliği saptanmıştır. Pozitiflik oranı çocuklarda %56.2 (313/557), erişkinlerde ise %43.4 (62/143) olarak belirlenmiştir ($p < 0.005$). Virus pozitifliği tespit edilen olguların %15.7 (59/375)'sinde çoklu etken saptanmış; bu olguların 49'unun çocuk, 10'unun erişkin olduğu izlenmiştir (Tablo I). Pozitif 375 örnekte saptanan toplam 436 solunum virusunun dağılımı Tablo II'de görülmektedir.

INF-A virus pozitifliği çocuklarda %16.8 ($n = 60$), erişkinlerde ise %10.8 ($n = 24$) oranında saptanmış ($p < 0.048$); toplam 84 hastada saptanan 86 INF-A suşunun 55 (%64)'i hH3, 24 (%27.9)'ü sH1 ve 7 (%8.1)'si hH1 olarak tiplendirilmiştir. Toplam 60 çocukta saptanan 61 INF-A suşunun %78.7 ($n = 48$)'si hH3, %13.1 ($n = 8$)'i sH1 ve %8.2 ($n = 5$)'si hH1 olarak tanımlanırken; bu oranlar toplam 24 erişkin hastada saptanan 25 INF-A suşu için sırasıyla %28 ($n = 7$), %64 ($n = 16$) ve %8 ($n = 2$) olarak belirlenmiştir. Bir aylık bir bebekte INF-A hH1, sH1 ve HCoV OC43 üçlü etken, 82 yaşında bir erkek hastada ise INF-A hH3 ve sH1 ikili etken olarak saptanmıştır. Parainfluenza virus tip 4, HCoV serotip 229E ve INF-A aH5 alt tipi hiçbir örnekte pozitif bulunmamıştır.

Grip semptomları olan hastalardan en fazla örnek aralık, ocak ve şubat aylarında toplanmış ve solunum virusları için pozitiflik oranları bu aylarda sırasıyla %62.4, %63.9, %62.2 olarak bulunmuştur. INF-A virus pozitifliği ise aralık, ocak ve şubat aylarında sırasıyla %7.2 ($n = 9$), %9.5 ($n = 14$) ve %24.9 ($n = 46$) olarak saptanmıştır (Tablo III).

TARTIŞMA

Akut solunum yolu (ASY) enfeksiyonlarında en sık rastlanılan viral etken RSV (%24-29) olup, onu rinoviruslar (%24), parainfluenza viruslar (%10), adenoviruslar (%7) ve influenza virusları (%4-5) izlemektedir^{2,10-12}. Ülkemizde yapılan çalışmalarda, solunum viruslarının pozitiflik oranları %41.8-67.8 arasında bildirilmektedir^{13,14}. Bizim çalışmamızda da, grip olgularının %53.6 (375/700)'sında bir veya birden fazla solunum virusu pozitifliği saptanmış; ASY enfeksiyonu olan pediatrik grupta, erişkin gruba göre solunum viruslarının tespit edilme oranı istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (%56.2'ye karşı %43.4, $p < 0.005$). Tek veya çoklu etken enfeksiyonlarında, pediatrik grupta en sık RSV'nin, erişkin grupta ise en sık INF-A'nın etken olduğu görülmüştür (Tablo I). Rinoviruslar (HRV), pediatrik ve erişkin gruplarda benzer oranlarda saptanırken, HMPV sadece pediatrik olgularda tespit edilmiştir. Ülkemizde yapılan çalışmalarda, ASY enfeksiyonu olan çocuklarda RSV, influenza virusları ve rinoviruslar ilk sırayı almaktadır¹³⁻¹⁵. Goka ve arkadaşları¹⁶, viral ASY enfeksiyonlarında ko-enfeksiyon oranlarının %5-62 (ortalama %23) arasında değiştiğini ve en sık saptanan etkenin RSV olduğunu rapor etmişlerdir. Bizim çalışmamızda da, virus pozitifliği tespit edilen olguların %15.7'sinde çoklu etken saptanmış; olguların çoğunun pediatrik grupta olduğu izlenmiş ve çoklu etken enfeksiyonlarında ilk sırayı RSV, ikinci sırayı HRV almıştır (Tablo I). Çalışmamızda saptanan ko-enfeksiyon oranları ve RSV-HRV birlikteliği, ülkemizde yapılan diğer çalışmaların^{13,14} bulgularına paraleldir.

Tablo I. Grip Semptomları Olan Hastalarda Saptanan Solunum Virusları

Grup	Virus(lar)	Çocuk (n= 557) n (%)*	Erişkin (n= 143) n (%)*	Toplam (n= 700) n (%)*
Tek etken enfeksiyonu	RSV	134 (24.1)	14 (9.8)	148 (21.1)
	HRV	46 (8.3)	12 (8.4)	58 (8.3)
	INF-A	45 (8.1)	20 (14.0)	65 (9.3)
	INF-B	6 (1.1)	0	6 (0.9)
	PIV-1	7 (1.3)	0	7 (1.0)
	PIV-3	4 (0.7)	2 (1.4)	6 (0.9)
	HCoV (OC43, NL63)	2 (0.4)	3 (2.1)	5 (0.7)
	HMPV	12 (2.2)	0	12 (1.7)
	HBoV	6 (1.1)	1 (0.7)	7 (1.0)
	AdV	2 (0.4)	0	2 (0.3)
İkili etken enfeksiyonu	RSV + HRV	18 (3.2)	3 (2.1)	21 (3.0)
	RSV + AdV	3 (0.5)	0	3 (0.4)
	RSV + PIV-1	1 (0.2)	0	1 (0.1)
	RSV + PIV-3	3 (0.5)	0	3 (0.4)
	RSV + HCoV OC43	1 (0.2)	0	1 (0.1)
	RSV + INF-B	0	1 (0.7)	1 (0.1)
	INF-A + RSV	7 (1.3)	3 (2.1)	10 (1.4)
	INF-A + HCoV OC43	1 (0.2)	0	1 (0.1)
	INF-A (hH3 + sH1)	0	1 (0.7)	1 (0.1)
	INF-A + HRV	6 (1.1)	0	6 (0.9)
	HRV + HCoV OC43	2 (0.4)	0	2 (0.3)
	HRV + PIV-2	1 (0.2)	0	1 (0.1)
	HRV + PIV-3	0	2 (1.4)	2 (0.3)
	HRV + HMPV	2 (0.4)	0	2 (0.3)
	PIV-3 + HBoV	2 (0.4)	0	2 (0.3)
	Üçlü etken enfeksiyonu	1 (0.2)	0	1 (0.1)
	INF-A (hH1 + sH1) + HCoV OC43	1 (0.2)	0	1 (0.1)
	RSV + HRV + HCoV OC43	1 (0.2)	0	1 (0.1)
Toplam		313 (56.2)	62 (43.4)	375 (53.6)

* Sütun yüzdesidir. RSV: Solunum sinsiyal virusu; HRV: İnsan rinovirusları; INF-A: İnfluenza A virusu; INF-B: İnfluenza B virusu; PIV: Parainfluenza virus; HCoV: İnsan koronavirusu; HMPV: İnsan metapnömovirusu; HBoV: İnsan bokavirüsü; AdV: Adenovirus; hH1: Human H1; sH1: Swine H1; hH3: Human H3.

Tablo II. Pozitif Örneklerde Solunum Viruslarının Dağılımı

Solunum virusları	Sayı (%)
Solunum sinsityal virusu	189 (43.3)
İnsan rinovirusları	93 (21.4)
İnfluenza A virusu	86 (19.8)
Parainfluenza virus tip 1-3	22 (5)
İnsan metapnömovirusu	14 (3.2)
İnsan koronavirüsleri*	11 (2.5)
İnsan bokavirüsü	9 (2)
İnfluenza B virusu	7 (1.6)
Adenovirus	5 (1.2)
Toplam	436 (100)

* Örneklerin 10'unda OC43, birinde ise 229E/NL63 serotipi saptanmıştır.

Tablo III. İnfluenza A ve B Virus Pozitifliklerinin Aylara Göre Dağılımı

Aylar (örnek sayısı)	INF-A					INF-B	Toplam
	hH1	hH3	sH1	hH3 + sH1	hH1 + sH1		
Aralık 2010 (90)	0	2	0	0	1	2	5
Ocak 2011 (76)	0	1	4	0	0	0	5
Şubat 2011 (129)	3	5	17	0	0	3	28
Mart 2011 (37)	0	1	0	0	0	0	1
Ocak 2012 (13)	0	6	0	0	0	0	6
Şubat 2012 (56)	1	16	0	1	0	0	18
Mart 2012 (28)	2	13	0	0	0	1	16
Eylül 2012 (31)	0	5	0	0	0	0	5
Aralık 2012 (35)	0	4	0	0	0	0	4
Ocak 2013 (58)	0	1	1	0	0	1	3
Toplam	6	54	22	1	1	7	91

INF-A: İnfluenza A virusu; hH1: Human H1; sH1: Swine H1; hH3: Human H3; INF-B: İnfluenza B virusu.

Ülkemizde dolaşımda olan influenza virusları sentinel süzveyans kapsamında⁷. Bu çalışmada sadece grip sezonunda değil diğer aylarda da örnek toplanmasına devam edilmiş ve bölgemizde mevsimlere ve yaş grubuna göre INF-A alt tipleri saptanmıştır. Hastaların %12'sinde INF-A, %1'inde INF-B pozitif bulunmuştur. INF-A virusu erişkin grupta pediatrik gruba göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha fazla oranda saptanmıştır. Pediatrik grupta en fazla bulunan INF-A alt tipi hH3, erişkin grupta ise sH1 olmuştur. INF-A virusunun farklı alt tiplerinin aynı hücrede replike olması sonucu anti-jenik shift olasılığının arttığı bilinmektedir¹⁷. Bu çalışmada bir aylık bir bebek (hH1,sH1) ve 82 yaşındaki bir erkek hastanın (hH3,sH1), iki farklı INF-A alt tipi ile enfekte olduğu

saptanmıştır. Daha önce yapılan çalışmalarda, bu yöntemle solunum viruslarının saptanmasında duyarlılığın %67-97, özgüllüğün %80-100 arasında; INF-A alt tiplerinin saptanmasında ise konvansiyonel yöntemlere göre test pozitiflik oranının %89.7 olduğu bildirilmiştir^{9,18}. Kullanılan testleriyle, daha önce herhangi bir çapraz reaksiyon bildirilmediği^{9,18} ve her bir solunum virusuna ait hedeflenen özgül bölgeler ve amplikon boyutları farklı olduğu için, çoklu etken enfeksiyonların çapraz reaksiyon nedeniyle olduğu düşünülmemiştir.

Ciblak ve arkadaşlarının¹⁹ çalışmasında, 2010-2011 influenza sezonunda grip olgularında en fazla A(H1N1)pdm09, 2011-2012 sezonunda ise en sık INF-A (H3N2) alt tipi bulunmuştur. Bu çalışmada da benzer olarak, INF-A sH1 alt tipi, çalışmanın başlangıcından Şubat 2011 tarihine kadar grip olgularında en fazla bulunan alt tip olmuştur. DSÖ²⁰ tarafından 2012 yılı başlarından itibaren INF-A (H3N2v) alt tipinin ABD ve dünyada yaygınlaşmaya başladığı bildirildikten sonra, bu çalışmada da Şubat 2012 tarihinden itibaren hH3 olgularında belirgin bir artış görülmüştür. INF-A aH5 alt tipi hiçbir olguda saptanmamıştır. Ulusal influenza verileri ile bu çalışma ile karşılaştırıldığında, grip semptomları olan hastalarda influenza viruslarının daha az oranda saptandığı görülmüş; bunun mevsimsel farklılıklardan veya çalışmada kullanılan yöntemlerden kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

Grip semptomları olan hastalar, polikliniklere en fazla aralık-mart ayları arasında başvurmuş ve solunum viruslarının pozitiflik oranları da bu aylarda diğerlerine göre daha yüksek bulunmuştur. Bölgemizde, INF-A ile oluşan ASY enfeksiyonları en sık kış aylarında görülmesine karşın, Şubat ayındaki belirgin artış dikkati çekmiştir (Tablo III).

Sonuç olarak çalışmamızda, grip semptomları olan çocuklarda RSV, erişkinlerde ise INF-A en sık saptanan solunum virusları olmuştur. Solunum virusları ile ko-enfeksiyon oranları, uluslararası verilere göre düşük, ulusal verilerle benzer oranlarda bulunmuştur. İnfluenza viruslarının, bölgemizde genel olarak dört ay (aralık-ocak-şubat-mart) aktif olduğu, INF-A alt tiplerinin ulusal ve uluslararası verilere benzer olduğu görülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Shafik CF, Mohareb EW, Yassin AS, et al. Viral etiologies of lower respiratory tract infections among Egyptian children under five years of age. BMC Infect Dis 2012; 12: 350.
2. Tregoning JS, Schwarze J. Respiratory viral infections in infants: causes, clinical symptoms, virology, and immunology. Clin Microbiol Rev 2010; 23(1): 74-98.
3. Zambon MC, Stockton JD, Clewley JP, Fleming DM. Contribution of influenza and respiratory syncytial virus to community cases of influenza-like illness: an observational study. Lancet 2001; 358(9291): 1410-6.
4. Centers for Disease Control and Prevention. Flu Activity & Surveillance. Available at: <http://www.cdc.gov/flu/weekly/fluactivitysurv.htm>
5. European Centre for Disease Prevention and Control. European Influenza Surveillance Network. Available at: <http://ecdc.europa.eu/en/Activities/Surveillance/EISN/Pages/index.aspx>
6. T.C. Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü. Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sürveyansı-Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi. 2005. Aydoğdu Ofset, Ankara.

7. Çıblak MA, Aslan S, Bozkaya E, Badur S. Ülkemizde 2005-2006, 2006-2007 ve 2007-2008 yıllarında grip sürveyansı ve izole edilen influenza virusu suşlarının tiplendirimi. *Klimik Derg* 2008; 21(3): 87-92.
8. World Health Organization. Influenza (Seasonal). Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/>
9. Kyung LM, Kim HR. Comparison of molecular assays for the rapid detection and simultaneous subtype differentiation of the pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus. *J Microbiol Biotechnol* 2012; 22(8): 1165-9.
10. Hak E, Rovers MM, Kuyvenhoven MM, Schellevis FG, Verheij TJ. Incidence of GP-diagnosed respiratory tract infections according to age, gender and high-risk co-morbidity: the Second Dutch National Survey of General Practice. *Fam Pract* 2006; 23(3): 291-4.
11. Fleming DM, Zambon M, Bartelds AI. Population estimates of persons presenting to general practitioners with influenza-like illness, 1987-96: a study of the demography of influenza-like illness in sentinel practice networks in England and Wales, and in The Netherlands. *Epidemiol Infect* 2000; 124(2): 245-53.
12. Jin Y, Zhang RF, Xie ZP, et al. Newly identified respiratory viruses associated with acute lower respiratory tract infections in children in Lanzou, China, from 2006 to 2009. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18(1): 74-80.
13. Akçali S, Yılmaz N, Güler Ö, Şanlıdağ T, Anıl M. Alt solunum yolu enfeksiyonu olan çocuklarda solunum yolu viral etkenlerinin sıklığı. *Türk Pediatri Arşivi* 2013; 48(3): 215-20.
14. Sancaklı Ö, Yenigün A, Kırdar S. Alt solunum yolu enfeksiyonunda nazofaringeal örneklerde polimeraz zincir reaksiyonu sonuçları. *Çocuk Enfeksiyon Derg* 2012; 6(3): 84-9.
15. Torun SH, Somer A, Kanturvardar M, Badur S, Salman N, Yekeler E. Respiratory Viruses; Today's Troubled Agents, Candidates for Marker of Diagnosis and Prognosis. *Indian J Applied Research* 2013; 3(10): 1-6.
16. Goka EA, Vally PJ, Mutton KJ, Klapper PE. Single and multiple respiratory virus infections and severity of respiratory disease: A systematic review. *Paediatr Respir Rev* 2013; pii: S1526-0542(13)00143-7.
17. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA (eds). Orthomyxoviruses, pp: 524-32, In: *Medical Microbiology*. 2013, 7th ed. Elsevier Saunders, Philadelphia.
18. Cho CH, Chulten B, Lee CK, et al. Evaluation of a novel real-time RT-PCR using TOCE technology compared with culture and Seeplex RV15 for simultaneous detection of respiratory viruses. *J Clin Virol* 2013; 57(4): 338-42.
19. Akçay Ciblak M, Kanturvardar Tütenyurd M, Asar S, Tulunoğlu M, Fındıkcı N, Badur S. 2003-2012 yıllarını kapsayan dokuz sezonda grip sürveyansı bulguları: İstanbul Tıp Fakültesi Ulusal İnfluenza Referans Laboratuvarı sonuçları. *Mikrobiyol Bul* 2012; 46(4): 575-93.
20. Jhung MA, Epperson S, Biggerstaff M, et al. Outbreak of variant influenza A (H3N2) virus in the United States. *Clin Infect Dis* 2013; 57(12): 1703-12.