

İnfluenza Virüsleri: Mikrobiyolojik Özellikler ve Mikrobiyolojik Tanı

Prof. Dr. Canan Külak

ZBE Tıp Fakültesi

Tıbbi Mikrobiyoloji AD



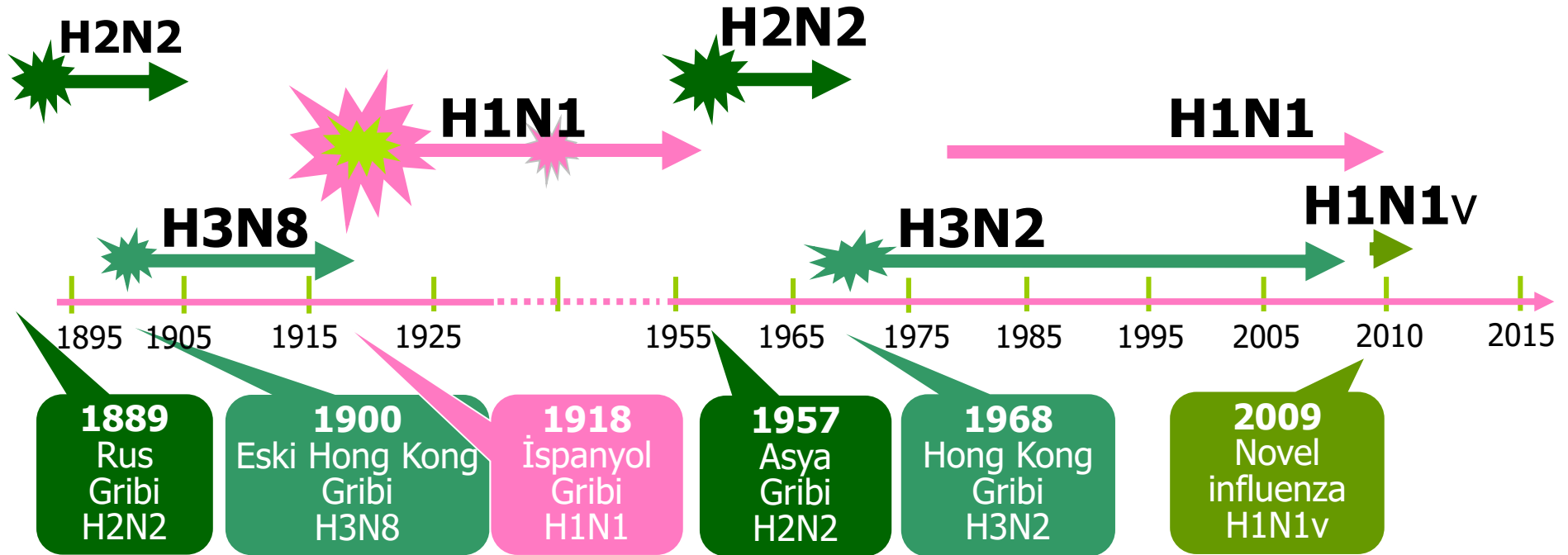
Influenza virus

April 22, 2009

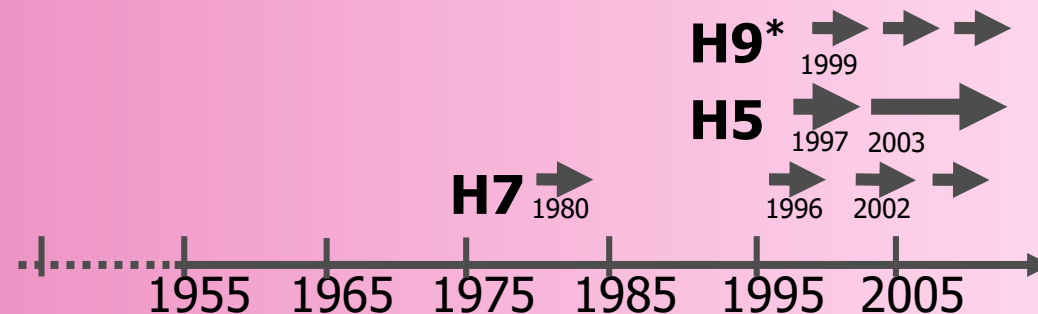
2019 salgını
Vaka: ~ 420 000
Ölüm: ~ 5000



İnfluenza Pandemileri (insan)

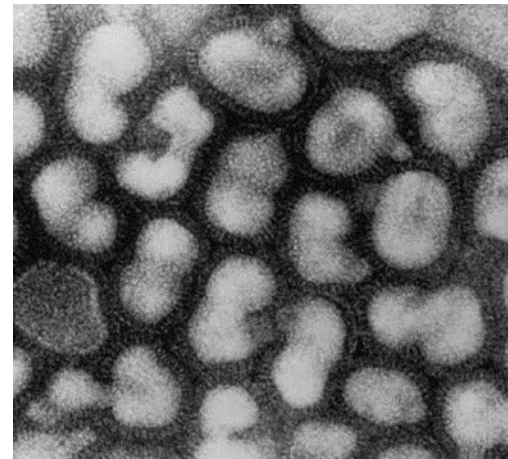


Kaydedilmiş Kuş Gripleri

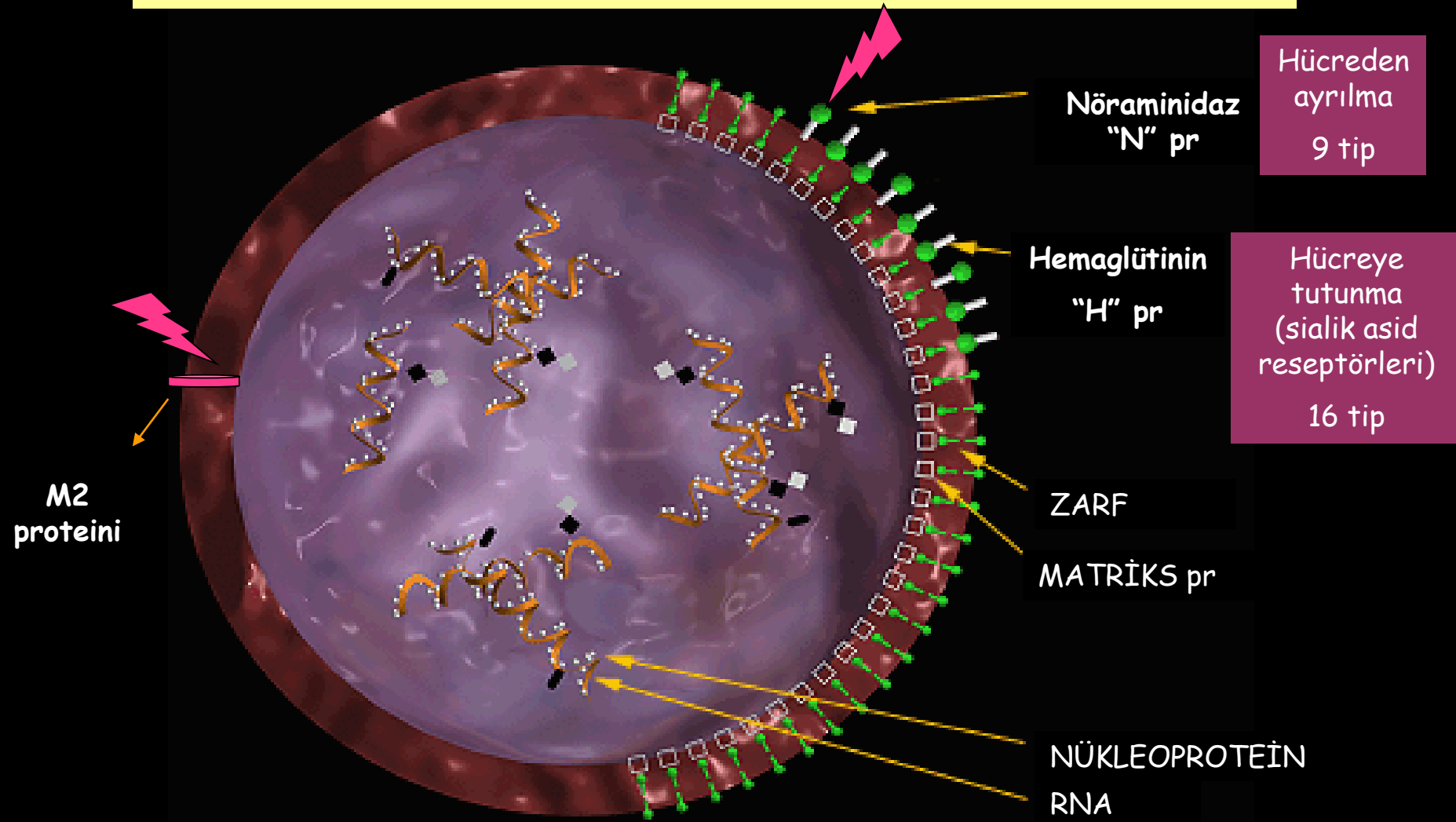


Virion

- (-) polariteli RNA virüsü
- Segmentli genom
- Zarflı virus
- Pleomorfik
 - Elipsoid/sferik/tübüler



İNFLUENZA VİRİON GÖRÜNÜMÜ



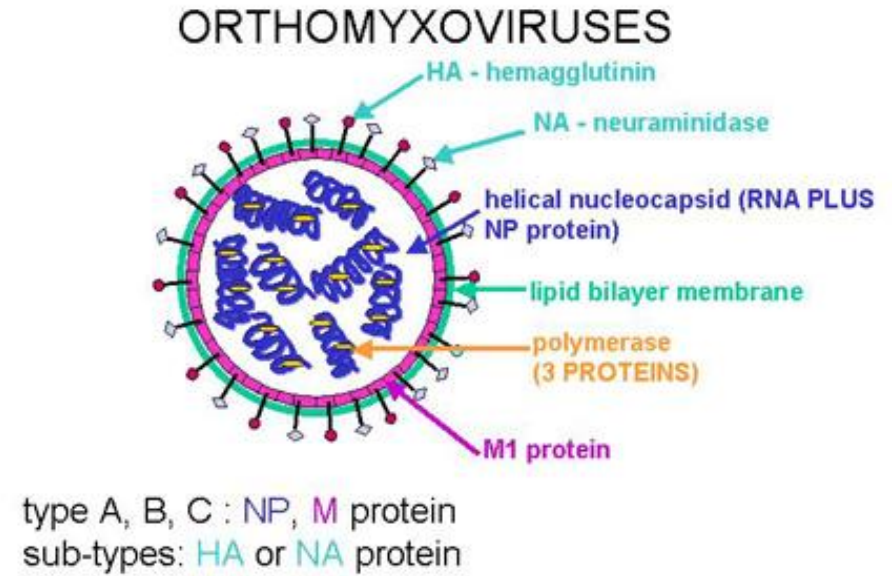
Modified with permission from HN Eisen and Lippincott - Raven,
Microbiology, Fourth Ed., J.B. Lippincott Company, Philadelphia, 1990.

- **Segmentli genom**

- Influenza A ve B
 - Sekiz segment
 - Her protein ayrı bir segmentte kodlu
- Influenza C
 - Yedi segment

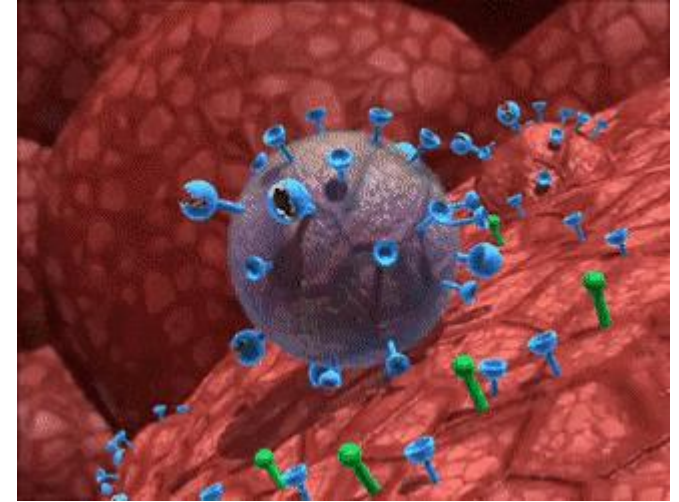
Virus yapısı

- Viral proteinler
 - Hemaglütinin (HA)
 - Nörominidaz (NA)
 - Nükleoprotein (NP)
 - Polimeraz
 - Matriks proteini (M1)
 - Membran proteini (M2)
 - Yapısal olmayan proteinler



Viral proteinler

- Hemaglütinin (HA)
 - Yüzeyde dikensi çıkıntılar
- Konak hücrelerine bağlanma
 - Epitel hücre yüzeyinde siyalik asit reseptörleri
 - Hücre membranı ile virüs zarfı arasında füzyon oluşumu
- Koruyucu antikor yanıtı oluşumu

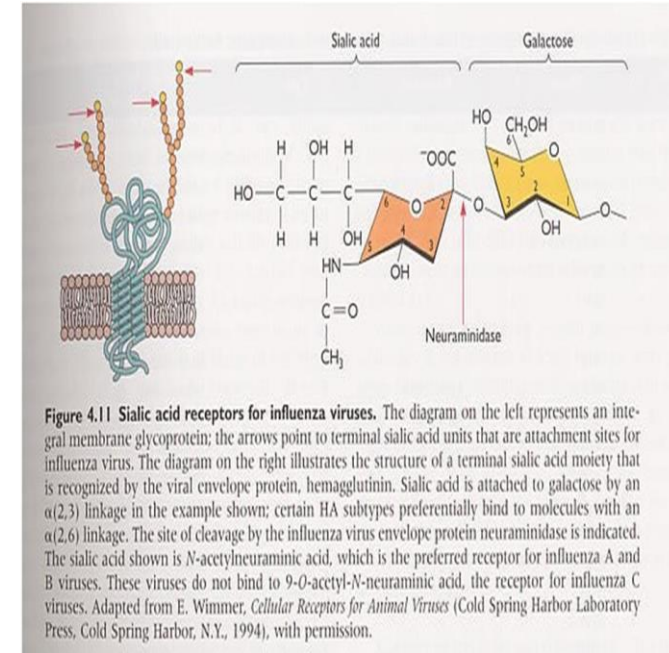
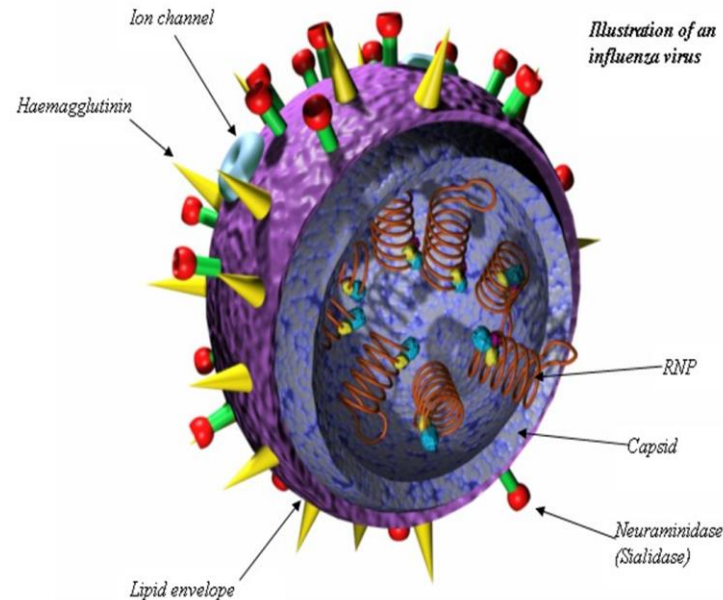


Viral proteinler

- **Nörominidaz (NA)**
 - Enzim aktivitesi
 - Glikoproteinlerden sialik asit ayrılması
 - Virüsün hücreye tutunması ve hücreden salınması

NA hedefli antiviraller

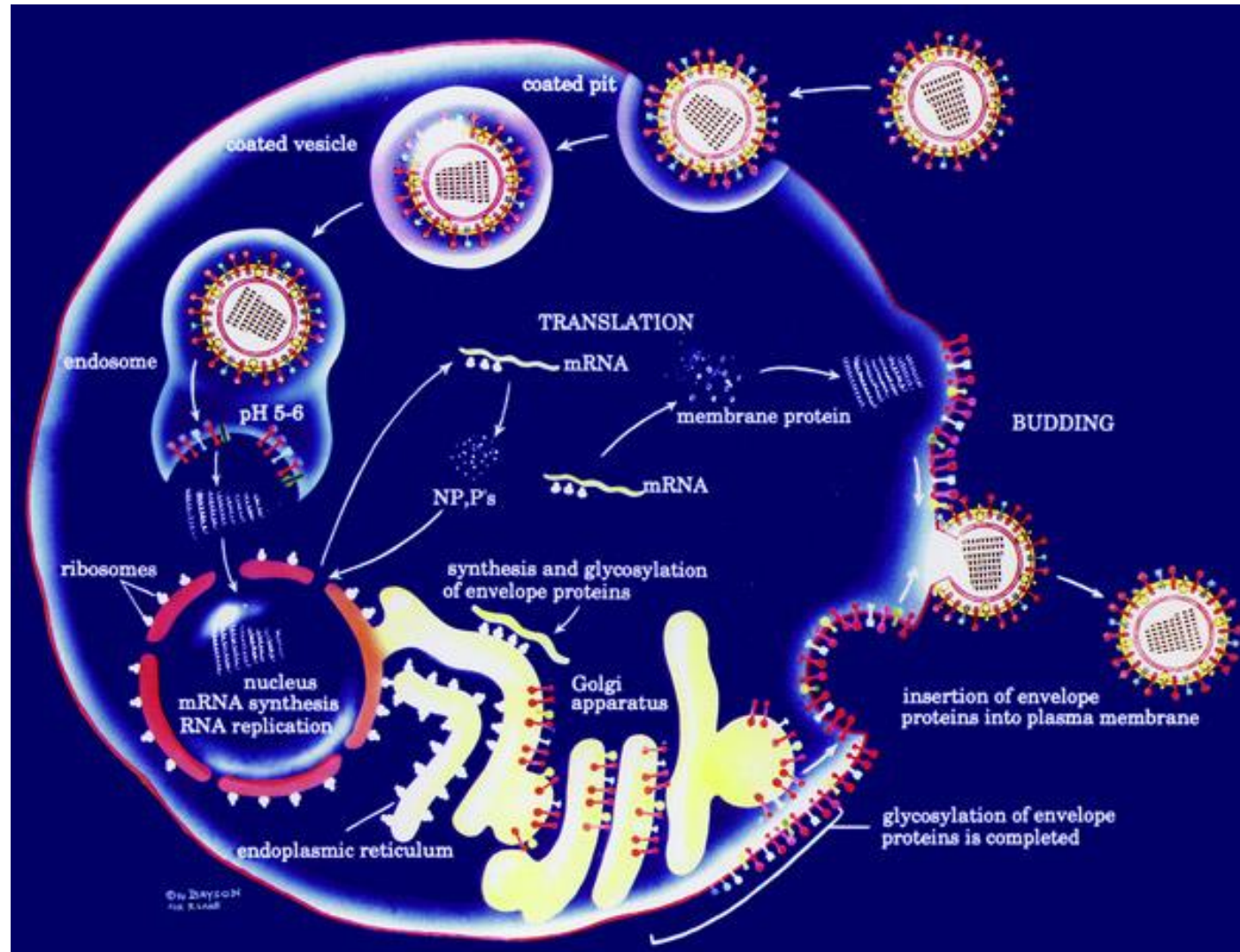
- Zanamivir (Relenza)
- Oseltamivir (Tamiflu)



Viral proteinler

- M1, M2 ve NP ler
 - Tipe özgül
 - Influenzae A, B ve C tanımlamasında
- M1 virion içinde
 - Viral toparlanma
- M2 membranda proton kanalları
 - Viral soyunma ve viral salınımaya yardımcı
 - M2 proteini amantadin ve rimantadin hedefi
- Polimeraz proteinleri
 - PB1
 - PB2
 - PA

Viral replikasyon



- Orthomyxoviridae ailesinde

- Influenzae A

(insan ve hayvanlarda)

Serotipleri:

- H1N1, H1N2, H2N2, H3N1, H3N2, H3N8, H5N1, H5N2, H5N3, H5N8, H5N9, H7N1, H7N2, H7N3, H7N4, H7N7, H7N9, H9N2, H10N7

- Influenzae B

(sadece insan ve deniz aslanında)

Serotipleri:

- Victoria, Yamagata

- Influenzae C

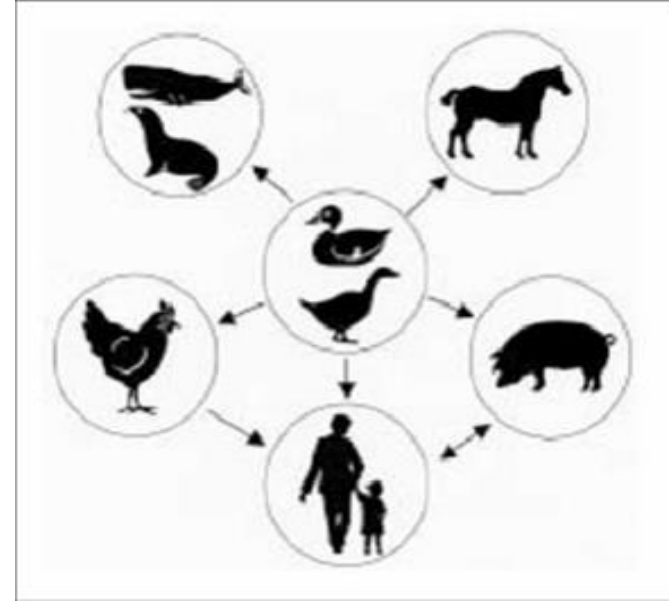
(insan ve domuzlarda)

- Influenzae D

(Sadece domuz ve sığırlarda)

Influenzae A infeksiyonları

- İnsan
- Kuş
 - Yaban kuşlarında taşıyıcılık
 - Kümes hayvanlarında infeksiyon
- Domuz
 - Kuş ve insan virüslerini de taşıyabilir
- At
- Deniz memelileri



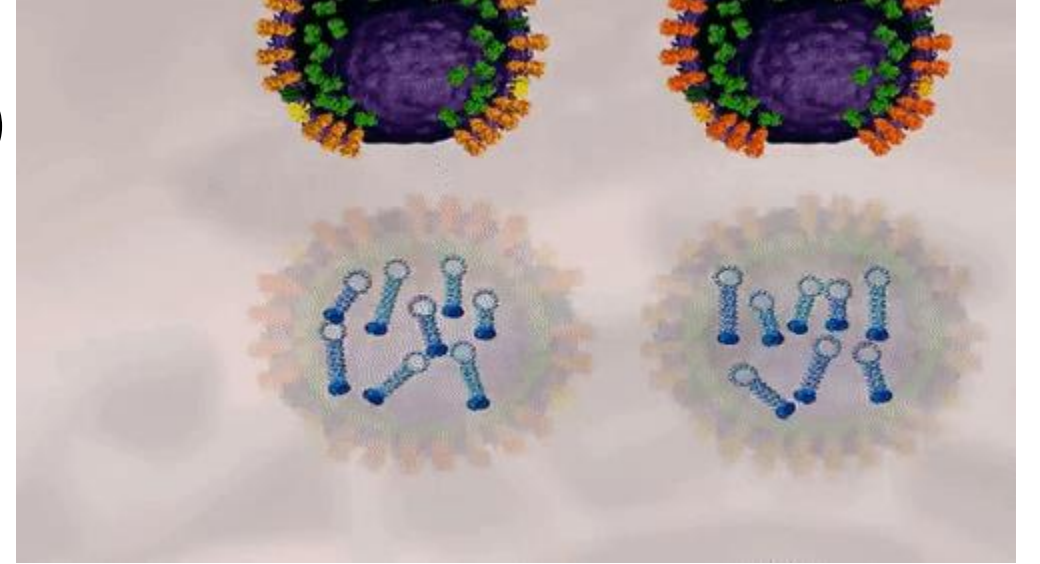
İnfluenza A antijenik tipleri

14 H ve 9 N alt tipi

- İnsan enfeksiyonlarından sorumlu olanlar
 - H1N1
 - H2N2
 - H3N2
 - H5N1
 - H7N7, H1N2, H9N2, H7N2, H7N3, H10N7
- Kuşlarda tüm alt tipler

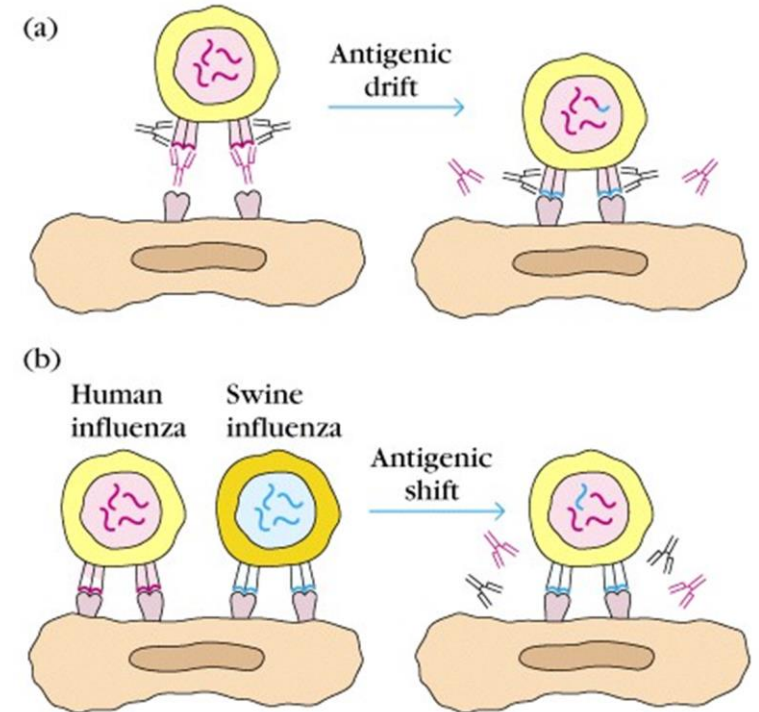
Viral antijenlerde değişiklik

- Antijenik "drift" (antijen sürüklenmesi)
- Antijenik "shift" (antijen kayması)

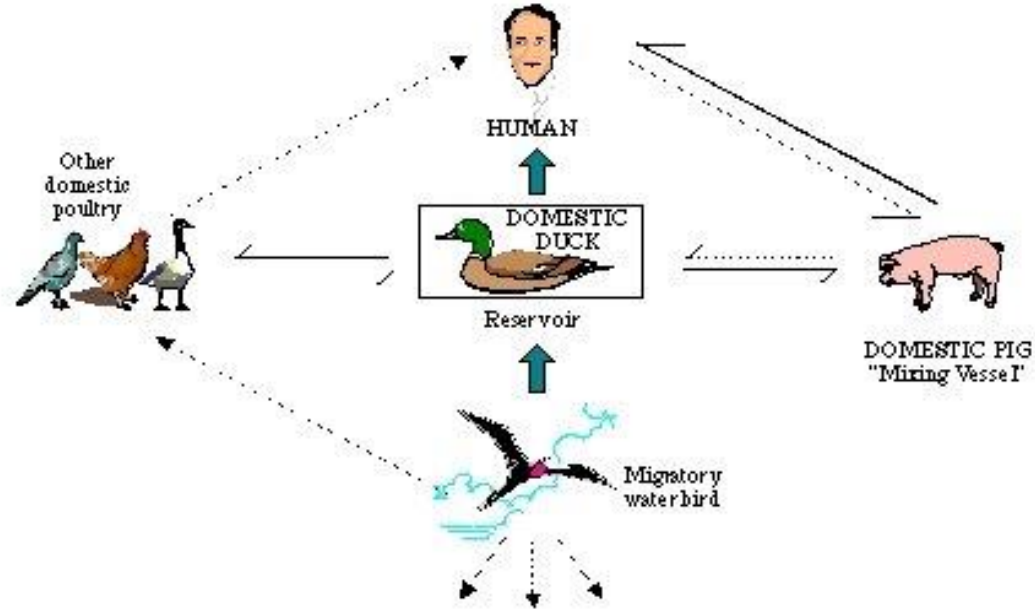


Antijenik "drift"

- Viral RNA da oluşan rastlantısal nokta mutasyonlar ile gelişir
- Yüzey glikoproteinlerindeki nokta mutasyonlarının birikmesi ile önceden toplumda dolaşanla benzer ancak farklı suşlar ortaya çıkar
 - Her yıl oluşur
 - Virüs alt tipinde deęiřime yol açmaz



Antijenik "shift"



- H ve N proteinlerindeki büyük değişiklikler
 - Virüs alt tipinde değişiklik
 - H1N1 H3N2 gibi
- Nadir
 - 10-20 yılda bir

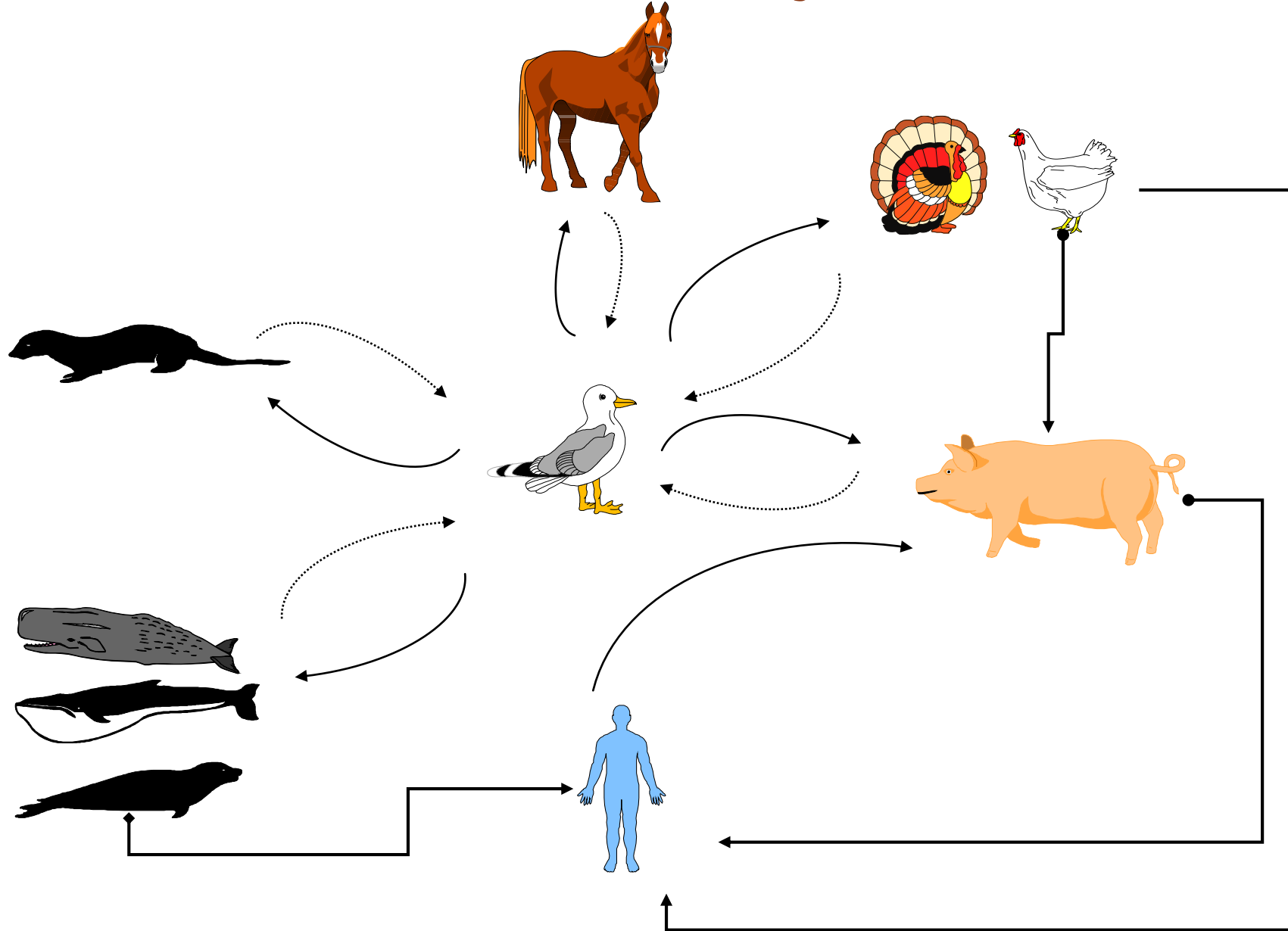
İnfluenza A virusunun önemli özelliği

- Farklı türlere özgü alt tipler, birbirinden genetik materyal alışverişine açık
- Yeni virus insana özgü virustan gen aldığında, insandan insana bulaşma özelliği kazanır

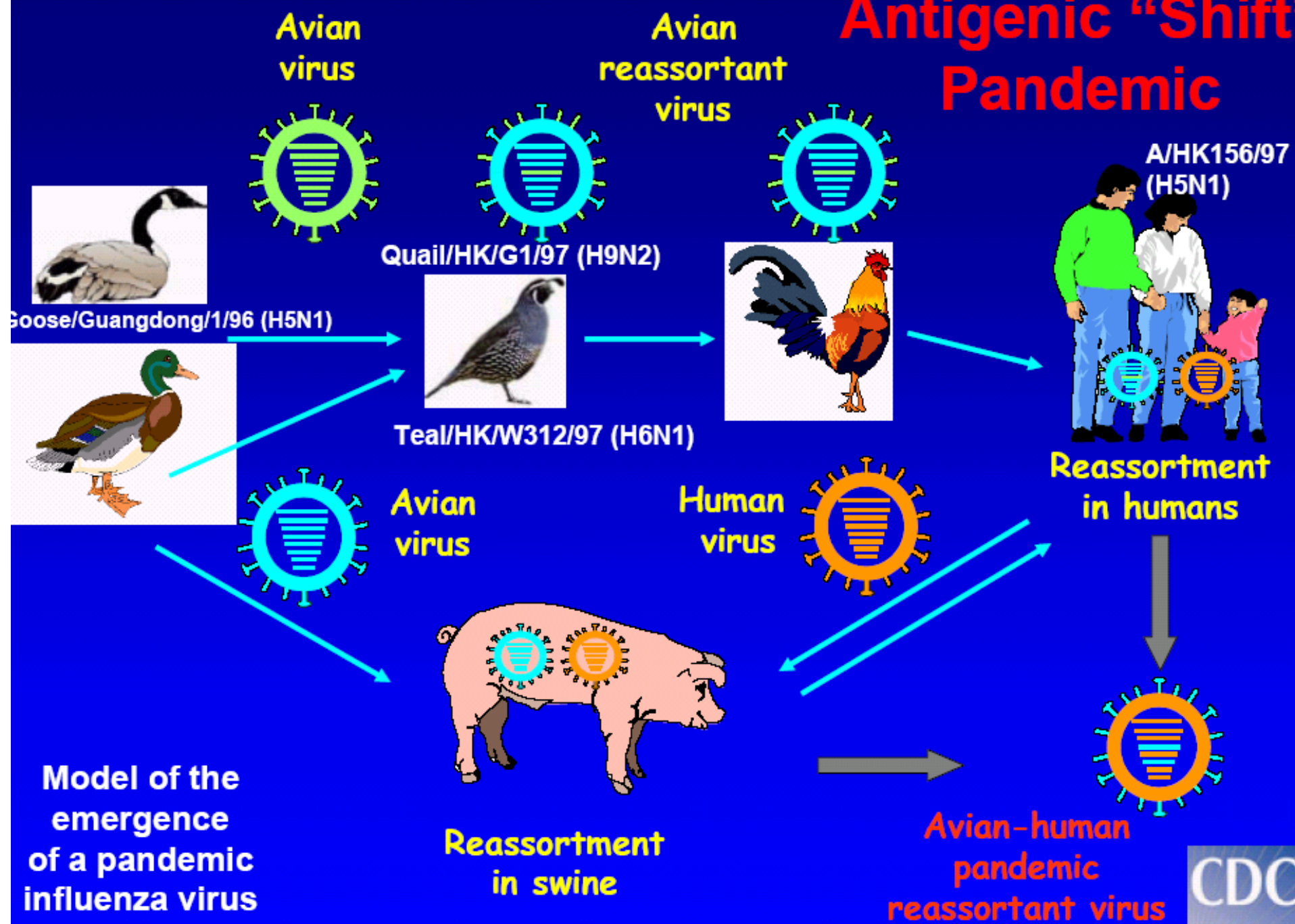
Epidemiyoloji

- Influenzae suşlarının tanımlaması
 - Tip (A,B,C)
 - Virüsün ilk izole edildiği yer
 - Virüsün ilk izole edildiği tarih
 - Antijen (HA ve NA)
- A/Bangkok/1/79/ (H3N2)

Pandemi nasıl oluşur?



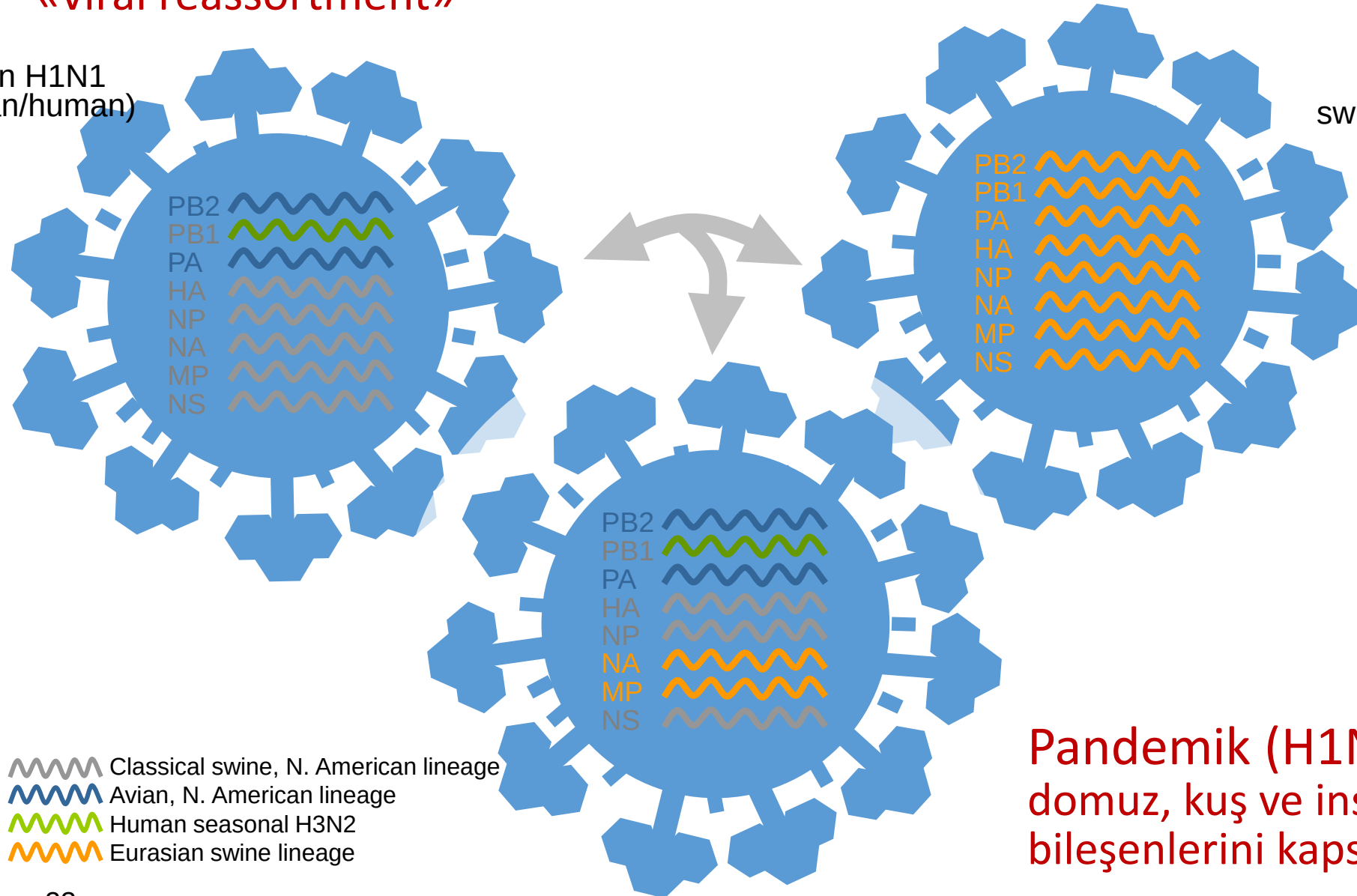
Antigenic "Shift" Pandemic



Pandemik (H1N1) 2009 virüsünün genetik kökeni: «viral reassortment»

N. American H1N1
(swine/avian/human)

Eurasian
swine H1N1



Pandemik (H1N1) 2009,
domuz, kuş ve insan viral
bileşenlerini kapsar

Virolojik Tanı

Virolojik Tanı - Amaç

- Ciddi olgularda tanı koymak
- Sürveyans
 - Enfeksiyonun yayılımını ve şiddetini izlemek
 - Sirkülasyondaki virusları belirlemek
 - Enfeksiyon ile klinik tablolar ve ölüm ilişkisini belirlemek
 - Pandeminin sağlık sistemi üzerine etkilerini izlemek
 - Virolojik değişiklikleri izlemek
 - Virus patojenitesini etkileyecek değişikliklerin saptanması
 - İlaç direncinin belirlenmesi
 - Aşı çalışmalarının yönlendirilmesi
 - Tanı testlerinin güvenilirliğinin belirlenmesi, gerekli değişikliklerin yapılması

Laboratuvar Tanı

- İnfluenza virüslerinin izolasyonu ve tiplendirilmesi
- İnfluenza antijenlerin saptanması
 - İmmünoenzimatik testler (ELİSA)
 - İmmünokromotografik testler
 - Direkt immünofloresan antikor testleri (DİFA)
- Viral nükleik asitlerin saptanması
 - "Revers transkriptase real-time PCR"

Virolojik tanı yöntemleri-salgın

- Kültür – virus izolasyonu
- Hızlı testler – Ag testleri
- NAT (RT-PCR)
- Serolojik tanı
 - Özgül antikor titresinde dört katlık artış

- **Hızlı testler ve H1N1v**

PCR ile kıyaslandığında
duyarlılık %10-70

- DFA
- ELISA

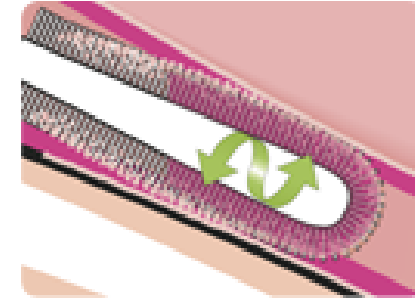
- **RT-PCR**

- Influenzae A / B
- H1N1v - spesifik

Önerilen rutin tanı yöntemi

Tanı testleri- performansı etkileyen faktörler

- Örnek tipi, kalitesi
 - Nazofarenjial örnekler
 - Fırçamsı uçlu eküvyon
- Örnek alım zamanı
 - Semptomların ilk 3-5 günü
- Hastanın yaşı
- Örnek transport süresi ve koşulları
- Örnek saklama süresi ve koşulları



Kimlere test yapılmalı?

- İnfluenza ön tanısı ile hastaneye yatırılan olgular
- İnfluenza ön tanısı olan ve ölen olgular
- Tanı ile
 - İzlem ve tedavi ya da enfeksiyon kontrolü değişecek ise
 - Yakın temaslıların durumunu değerlendirmede gerekli ise
 - Hamileler
 - İmmünsüpreseler

Tedavi gerekiyorsa, test sonucu beklenmemelidir !!!

ÖRNEKLERİN ALIMI VE LABORATUVARA ULAŞTIRILMASI

- Uygun dönemde ve uygun bölgeden alınarak, uygun koşullarda laboratuvara ulaştırılmalı
 - Pandemik influenza tanısı için örneklerin viral atılımın en yoğun olduğu hastalık semptomlarının başlangıcından sonraki ilk üç gün
 - viral atılım çocuk, immunsuprese gibi risk gruplarında uzayabilir--- belirtilerin başlangıcından sonraki yedi gün içinde de örnek alınabilir
 - Viral atılımın 7 günden fazla sürdüğü durumlar
 - örneğin oseltamivir tedavisi
 - olası direnç gelişimini de araştırmak amacıyla

Mevsimsel ve pandemik influenzanın tanısı için uygun olan yöntemler sırasıyla

- nazofaringeal sürüntü,
- burun sürüntüsü,
- nazofaringeal aspirat
- bronş aspiratı

- Sürüntü örnekleri için kullanılacak eküvyonlar PCR inhibitörü içermemeli
 - sentetik uçlu (polyester ya da dakron) olmalı ve sapı plastik ya da aliminyum olmalı
 - Pamuk uçlu, ahşap saplı eküviyonlar önerilmemekte
 - Kalsiyum alginattan yapılmış eküvyonlar ise kesinlikle kullanılmamalı
- Sürüntü örnekleri mutlaka 1-3 ml viral transport besi yeri içinde laboratuvara ulaştırılmalı
- Viral transport besi yeri içinde +4 °C'de en fazla 4 gün saklanabilmekte
- Daha uzun saklanması gereken durumlarda -80°C de

Moleküler Yöntemler:

“real- time reverse transcription- polymerase chain reaction” (rRT-PCR)”
mevsimsel influenza alt tiplerinin yanı sıra H5, H7, H9 gibi alt tipleri
saptamada da duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek

Dizi analizi?

Araştırma, salgın, yeni tipler

Virüs İzolasyonu:

Pandemik influenza enfeksiyonlarında tanı amacıyla kullanılmakta

- Mevsimsel influenza için laminar kabinde çalışmak yeterli olmasına karşın, pandemik A (H1N1) izolasyon biyo-güvenlik düzeyi 2 (BSL2) ortamda

Hızlı Testler

Mevsimsel influenza A ve B virüslerinin tanısı

- Duyarlılıkları seçilen çalışma grubuna, örnekteki virüs miktarına ve testi uygulayan kişiye göre değişebilir (%10-70)
- kullanım kolaylığı
- 15-30 dakika gibi kısa sürede sonuç
- Monoklonal antikorların kullanıldığı immunokromatografik yöntemler ile hızlı testler
 - Hasta başı ("point of care") testleri

Influenza Virus Testing Methods

Method ¹	Types Detected	Acceptable Specimens ²	Test Time
Rapid Influenza Diagnostic Tests⁴ (antigen detection)	A and B	NP ⁵ swab, aspirate or wash, nasal swab, aspirate or wash, throat swab	<15 min.
Rapid Molecular Assay [influenza viral RNA or nucleic acid detection]	A and B	NP ⁵ swab, nasal swab	15-30 minutes ⁶
Immunofluorescence, Direct (DFA) or Indirect (IFA) Florescent Antibody Staining [antigen detection]	A and B	NP ⁴ swab or wash, bronchial wash, nasal or endotracheal aspirate	1-4 hours
RT-PCR⁷ (singleplex and multiplex; real-time and other RNA-based) and other molecular assays [influenza viral RNA or nucleic acid detection]	A and B	NP ⁵ swab, throat swab, NP ⁵ or bronchial wash, nasal or endotracheal aspirate, sputum	Varies (1 to 8 hours, varies by the assay)
Rapid cell culture (shell vials; cell mixtures; yields live virus)	A and B	NP ⁵ swab, throat swab, NP ⁵ or bronchial wash, nasal or endotracheal aspirate, sputum; (specimens placed in VTM ⁸)	1-3 days
Viral tissue cell culture (conventional; yields live virus)	A and B	NP ⁵ swab, throat swab, NP ⁵ or bronchial wash, nasal or endotracheal aspirate, sputum (specimens placed in VTM ⁸)	3-10 days

Table 2: Available FDA-Cleared Rapid Influenza Diagnostic Tests (Antigen Detection Only) 1				
These tests provide results in 10-15 minutes and differentiate between influenza A and B				
Manufacturer	Product	Platform/Instrument	Approved Specimens ²	CLIA Waived ³
Abbott	Binax Now Influenza A & B Card 2	DIGIVAL™	NPS, NS direct	Yes
Becton Dickinson & Co.	BD Veritor™ Flu A + B	BD Veritor Reader	NPS, NS direct	Yes
Becton Dickinson & Co.	BD Veritor™ Flu A + B	BD Veritor Plus Analyzer	NPS, NS direct	Yes
Quidel Corp.	Sofia® Influenza A + B FIA	Sofia FIA Analyzer	NS, NPS, NPA, NPW direct, NP, NPA, NPW in VTM	Yes
Quidel Corp.	Sofia® Influenza A + B FIA	Sofia 2 FIA Analyzer	NS, NPS, NPA, NPW direct, NP, NPA, NPW in VTM	Yes
Quidel Corp.	QuickVue® Influenza A + B	N/A	NPS, NS direct	Yes
Princeton BioMeditech Corp.	BioSign® Flu A & B LABSCO Advantage Flu A & B LifeSign LLC Status Flu A & B OraSure QuickFlu Rapid A + B Polymedco Poly stat Flu A & B Sekisui Diagnostics OSOM® ULTRA Flu A & B Meridian BioScience ImmunoCard STAT Flu A&B McKesson Consult Diagnostics Influenza A&B	N/A	NS, NPS direct (waived) NPA, NPW (not waived)	Yes
Becton Dickinson & Co.	BD Veritor™ Flu A + B	BD Veritor Reader	NPW, NA, NPS in VTM	No
Becton Dickinson & Co.	BD Veritor™ Flu A + B	BD Veritor Plus Analyzer	NPW, NA, NPS in VTM	No
Remel/Thermo Fisher	XPECT™ Flu A & B	N/A	Nasal wash	No
Sekisui Diagnostics, LLC	Acucy Influenza A&B Test	The Acucy System	NPS, NS direct	Yes

Manufacturer	Product	Platform/ Instrument	Influenza Virus Types Detected	Influenza Virus Subtypes Detected	Test Time ³
Abbot	ID NOW™ Influenza A & B 2	ID NOW™ Platform	Influenza A and B	None	<15 min
BioFire, Inc. BioMerieux	FilmArray® Respiratory Panel EZ	FilmArray 2.0 EZ	Influenza A and B	H1, H1pdm09, H3	1-2 hr
Cepheid	Xpert Xpress Flu	GeneXpert Xpress	Influenza A and B	None	30-60 min
Cepheid	Xpert Xpress Flu/RSV	GeneXpert Xpress	Influenza A and B	None	30-60 min
Mesa Biotech. Inc	Accula Flu A/Flu B	Accula Dock	Influenza A and B	None	<30 min
Roche Molecular Diagnostics	Cobas® Influenza A/B Assay	Cobas® Liat® Analyzer	Influenza A and B	None	<30 min
Roche Molecular Diagnostics	Cobas® Influenza A/B & RSV Assay	Cobas® Liat® Analyzer	Influenza A and B	None	<30 min
Sekisui Diagnostics	Silaris Influenza A & B	Silaris Dock	Influenza A and B	None	<30 min
BioFire, Inc. BioMerieux	FilmArray Respiratory Panel	FilmArray® FilmArray® Torch	Influenza A and B	H1, H1pdm09, H3	1-2 hr
BioFire, Inc. BioMerieux	FilmArray Respiratory Panel 2	FilmArray 2.0®FilmArray® Torch	Influenza A and B	H1, H1pdm09, H3	30-60 min
BioFire, Inc. BioMerieux	FilmArray Respiratory Panel 2 <i>plus</i>	FilmArray®2.0 FilmArray® Torch	Influenza A and B	H1, H1pdm09, H3	30-60 min
Cepheid	Xpert Flu	GeneXpert	Influenza A and B	H1pdm09	1 hr
Cepheid	Xpert Xpress Flu/RSV	GeneXpert	Influenza A and B	None	1 hr
Cepheid	Xpert Xpress Flu	GeneXpert	Influenza A and B	None	30-60 min
Cepheid	Xpert Xpress Flu/RSV	GeneXpert	Influenza A and B	None	30-60 min
Focus Diagnostics (DiaSorin)	Simplexa™ Flu A/B & RSV Direct	Integrated Cyclor	Influenza A and B	None	<2 hr
Focus Diagnostics (DiaSorin)	Simplexa™ H1N1 2009	Integrated Cyclor	Influenza A	None	2-4 hr
GenMark Diagnostics	ePlex Respiratory Pathogen Panel	ePlex	Influenza A and B	H1, H1pdm09, H3	2 hr
Biocartis	Idylla™ Respiratory IFV-RSV Panel	Idylla	Influenza A and B	H1, H1pdm09, H3, H275Y mutation (H1N1pdm09)	30-60 min
Luminex	Aries® Flu A/B & RSV	Aries	Influenza A and B	None	1-2 hr
Luminex	Verigene Respiratory Virus Nucleic Acid Test Plus	Verigene SP	Influenza A and B	None	3.5 hr
Luminex	Verigene Respiratory Virus Nucleic Acid Test Plus	Verigene SP	Influenza A and B	H1, H1pdm09, H3	3.5 hr

Manufacturer	Product	Platform/ Instrument	Influenza Virus Types Detected	Influenza Virus Subtypes Detected	Test Time ³
Luminex	Verigene RP Flex	VERIGENE Reader VERIGENE Processor SP	Influenza A and B	H1/H1pdm09, H3	3.5 hr
Quidel	Solana Influenza A+B Assay	Solana	Influenza A and B	None	30-60 min
Qiagen GmbH	QIAStat-Dx Respiratory Panel	QIAStat-Dx Analyzer	Influenza A and B	H1, H1pdm09, H3	1 hr
BioFire Diagnostics, Inc. (BioMérieux)	FilmArray Pneumonia Panel	FilmArray, FilmArray 2.0, or FilmArray Torch	Influenza A and B	None	1 hr
CDC Influenza Division	CDC Human Influenza Virus Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel (Influenza A/B Typing Kit) ⁵	ABI 7500 Fast Dx	Influenza A and B	None	4 hr
CDC Influenza Division	CDC Human Influenza Virus Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel (Influenza A/H5 Subtyping Kit) ⁵	ABI 7500 Fast Dx	Influenza A	H5N1 (Asian lineage)	4 hr
Focus Diagnostics (DiaSorin)	Simplexa™ Flu A/B & RSV Kit	Integrated Cyclor	Influenza A and B	None	<4 hr
Focus Diagnostics (DiaSorin)	Simplexa™ Influenza A H1N1 (2009)	Integrated Cyclor	Influenza A	H1pdm09	<4 hr
GenMark Diagnostics	eSensor® Respiratory Viral Panel (RVP)	eSensor XT-8 system	Influenza A and B	H1, H1pdm09, H3	8 hr
Hologic	Panther Fusion® Flu A/B/RSV Assay	Panther	Influenza A and B	None	2-4 hr
Hologic	Prodesse PROFLU +V	Cepheid SmartCycler II	Influenza A and B	None	<4 hr
Hologic	Prodesse ProFAST +	Cepheid SmartCycler II	Influenza A	H1, H1pdm09, H3	<4 hr
Luminex	NxTAG Respiratory Viral Panel (RVP)	MagPix	Influenza A and B	H1/H1pdm09, H3	4-8 hr
IMDx	IMDx Flu A/B and RSV for Abbott m2000	Abbott m2000	Influenza A and B	None	4 hr
Quidel Corporation	Lyra Influenza A + B Assay	ABI 7500 Fast Dx,	Influenza A and B	None	2-4 hr
InDevR	FluChip-8G Influenza A+B Assay	BioRad T100 Software v1.0.9.0 or newer	Influenza A and B	Seasonal Flu A/H3N2, A/H1N1pdm09, and Non- seasonal Influenza A subtypes	6-8 hr

KLİMUD ne diyor?

Tanı yöntemleri duyarlılık ve tercih sırasına göre:

a. Nükleik asit testleri (PCR esaslı testler)

b. Hızlı antijen testleri

- İnfluenza A/B antijen testi: Mevsimsel insan influenza virusları için geliştirilmiş bir testtir. Pandemik (H1N1v) influenza A suşu için duyarlılığı %10-70 arasında bildirilmiştir. Ülkemizden bildirilmiş iki çalışmada, salgının tepe yaptığı dönemde, antijen testlerinin duyarlılıkları %60'ın üzerinde saptanmıştır(%65,7(*)-%61.6(**))
- Hızlı tanı testleri, diğer ülkelerde olduğu gibi, ülkemizde de belli koşullarda kullanılabilir. Bu testlerin pandemik influenza tanısındaki anlam ve kısıtlılıkları, güncel süzveyans verileri ışığında değerlendirilerek güncellenmeli ve bilgiler web üzerinden paylaşılmalıdır.

KLİMUD

- Hızlı antijen testi sonuçlarının yorumlanmasında dikkat edilmesi ve sonuç raporuna eklenmesi gereken önemli noktalar :
 - a. Hızlı test ile negatif sonuç alınması: İnfeksiyonun olmadığı anlamına gelmez. Daha güvenilir bir negatif sonuç için, testin daha duyarlı olan PCR yöntemi ile tekrarlanması gerekir
 - b. Hızlı test ile pozitif sonuç alınması: Hızlı testler, influenza A'nın alt tiplerinin ayırt edilmesine olanak vermez. Pozitif influenza A sonucu, mevsimsel influenza A suşları veya pandemik H1N1 kaynaklı olabilir. Salt salgın kökeninin dolaşmakta olduğu dönemlerde doğrulama ya da tiplendirme için ek test yapılmasına gerek olmamakla birlikte mevsimsel influenza kökenlerinin (H3N2 ya da H1N1) dolaşıma girmesiyle bu durum değişecektir.
 - Sonuç raporunda, yukarıdaki bilgiler ve kullanılan kitin markası yer almalıdır

- Grip aktivitesinin yüksek olduğu dönemde
 - Yüksek PPD
 - Düşük NPD

- Grip aktivitesinin düşük olduğu dönemde
 - Düşük PPD
 - Yüksek NPD

Hızlı testin pozitif olması büyük olasılıkla grip lehine iken negatif olması gribi dışlamaz.

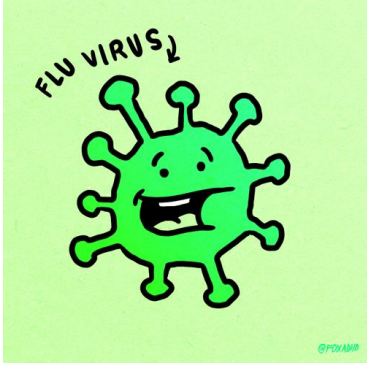
Hızlı testin pozitif olması gribin kesin varlığını göstermezken negatif olması büyük olasılıkla gribi dışlamamızı sağlar.

Özetle

- Nükleik asit testleri
 - hızlı, duyarlı ve özgüllükleri yüksek
- Hızlı testler
 - pozitif prediktif değerleri yüksek olmasına karşın, negatif prediktif değerleri düşüktür
 - influenza alt tiplerini saptayamamaktadır

Dikkat!!

- Pandemilerin gidişi çok farklı olabilir
- Virus yayıldıkça, genetik değişiklik olabilir
 - Oseltamivir R (mevsimsel H1N1)
 - Patojen hale dönüşme (H3N2, H5N1)



İlgünüz için teşekkürler....

