

Avian influenza A

Avian influenza A

Tamer Şanlıdağ, Sinem Akçalı, Elçin Akduman

İletişim / Correspondence: Tamer Şanlıdağ Adres / Address: Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Manisa

ÖZET

Avian influenza (kuş gribi), influenza A virüslerinin neden olduğu bulaşıcı bir hastalıktır. 2003 salgınından beri, yüksek patojenik avian influenza A (H5N1) virüsleri birçok güneydoğu Asya ülkesinde kümes hayvanlarında endemik düzeye ulaşmış ve yüksek mortaliteye sahip insan enfeksiyonlarına neden olmuştur. Ülkemizi de 2005 ekim ayından itibaren H5N1 virüsü etkilemeye başlamıştır. Salgınlar, etkilenen farklı bölgelerde değişik şiddetlerde devam etmektedir. Dolayısıyla, H5N1 virüsü insanlar için önemli bir tehdit unsuru olarak düşünülmektedir. Bu yazının içerisinde, özellikle insanlarda influenza H5N1 virüs enfeksiyonlarının viroloji, klinik spektrum, tanı ve tedavisi ile ilgili güncel bilgiler gözden geçirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kuş gribi, influenza, H5N1

SUMMARY

Avian influenza (bird flu) is a contagious disease of animals caused by influenza A viruses. Since their reemergence in 2003, highly pathogenic avian influenza A (H5N1) viruses have reached endemic levels among poultry in several southeast Asian countries and have caused human infections with high mortality. Since October 2005, H5N1 was confirmed in poultry in Turkey. Outbreaks are continuing with varying degrees of severity in several affected areas. Therefore, influenza H5N1 is an important threat for human being. The current knowledge of the virology, clinical spektrum, diagnosis and treatment of human influenza H5N1 virus infections is reviewed herein.

Key Words: Bird flu, influenza, H5N1

GİRİŞ

Avian influenza (kuş gribi virüsü), İnfluenza virüs tip A'nın kanatlılarda sebep olduğu solunum ve sinir sistemine ait belirtilerle seyreden bir hastalıktır. Avian influenza virüslerin düşük patojenik formu; hafif semptomlarla seyrederken, yüksek patojenik tip; kısa zamanda kümes hayvanlarına yayılıp, bu hayvanların birçok organını etkileyerek hızla ölüme neden olur. Avian influenza virüsleri türe spesifik olsa da, bazen avian ve insan influenza virüsleri arasındaki genetik reassortment yoluyla (örn:1957 ve 1968) veya saf avian influenza suşlarının insanlara adaptasyonu sonucu (örn:1918) insan influenza pandemilerine neden olmaktadır. Son dönemde kuşlardan direkt olarak insanlara avian influenza virüslerinin geçişinin bildirilmesindeki artış, birçok Asya ülkesindeki kümes hayvanlarında influenza A (H5N1) salgınları ile insan enfeksiyonlarının ilişkili olduğunu göstermektedir. Bu gelişmeler; bu virüslerin pandemi potansiyeli ile ilgili endişelerin artmasına neden olmuştur.

VİROLOJİ

İnfluenza virüsleri, Orthomyxoviridae ailesinden pleomorfik, zarflı, negatif polariteli RNA virüsleridir. Onaltı hemaglütinin (HA) ve dokuz nöraminidaz (NA) subtipi vardır (1). HA hücre yüzey sialik asit reseptörlerine bağlanarak virüsün konak hücreye girişini sağlar. Nötralizan antikorların hedeflediği en önemli antijenik determinant olması nedeniyle bugünkü aşılarda önemli bir parçasıdır. NA, nötralizan antikorlar için ikinci önemli komponenttir. Virionların agregasyonunu önleyerek, infekte hücrelerden virüsün salınımını kolaylaştırır. Üçüncü membran proteini olan M2 proteini; influenza virüslerinde az miktarda bulunmaktadır. İyon kanalı gibi görev yaparak, viral replikasyonun erken basamaklarında soyulma sırasında önemli olan virüsün iç pH'sını düzenlemektedir. Bu fonksiyon, amantadin ve rimantadin antiviral ilaçları ile bloke edilmektedir.

İnfluenza virüs genomu, sekiz segmentli, tek zin-

cirli, negatif polariteli olup on tane proteini kodlamaktadır. RNA segmentleri viral zarfta; RNA replikasyonu ve transkripsiyonundan sorumlu olan ribonükleoprotein (RNP) kompleksini oluşturan nükleoprotein (NP) ve üç viral polimeraz alt ünitesi (PA, PB1, PB2) ile birleşmiştir. Viriondaki diğer proteinler olan M2 ve nükleer eksport protein (NEP) birleşme, tomurcuklanma ve RNP'nin çekirdekten çıkışında görev yapmaktadır.

İnfluenza virüsleri; NP ve M proteinlerindeki farklılıklara göre A,B,C olarak sınıflandırılmıştır. İnfluenza B ve C virüsleri subtiplere ayrılmamıştır. Tüm avian influenza virüsleri tip A olarak sınıflandırılmıştır. İnfluenza virüsleri için standart bilimsel adlandırma; influenza tipi, konak (insan hariç), izolasyon yeri, suş numarası, izolasyon yılı ve son olarak parantez içinde influenza A subtipinden oluşmaktadır. Sadece üç HA (H 1-3) ve iki NA (N1-2) insanlarda saptanmaktadır. Bazı H5 ve H7 subtiplerinin yüksek patojenik özelliğe sahip olduğu ve ciddi hastalıklara yol açtığı bilinmektedir. Bazı influenza virüs subtipleri ilk önce düşük patojenik formdayken, mutasyonlarla yüksek patojenik forma dönüşmektedirler. H5N1, H7N3, H7N7 ve H9N2 virüsleri ile insanlarda hafif infeksiyon oluşumu gözlenmiştir (2).

BULUŞMA ve EPİDEMİYOLOJİ

İnfluenza A virüslerinin doğal rezervuarı su kuşlarıdır. Genellikle barsak sistemi hücrelerinde replike olan virüs, feçesle yüksek konsantrasyonda atılmaktadır ve sonuçta kontamine su, yemek ve çevresel materyalle diğer kuşlara fekal-oral yolla bulaş gerçekleşmektedir. Kuşlardaki klinik seyir, asemptomatik infeksiyondan, hafif solunum yolu hastalığına veya ciddi ve hızlı fatal sistemik hastalığa doğru değişir. Kümes hayvanlarının yüksek patojenitedeki avian influenza suşları ile infeksiyonu yaygın infeksiyon ile karakterizedir ve yumurta üretiminde azalma, solunum sistemi belirtileri, lakrimasyonda artma, kafada ödem, diyare, nörolojik semptomlar ve ölüm görülmektedir. İnfekte kuşlar en az 10 gün süreyle virüsü çıkartmaya devam ederler. Bir gram dışkıda bir

milyon kuşu infekte edebilecek kadar virüs bulunmaktadır (3).

İnsanlarda influenza infeksiyonu sırasında; hastalığın 24-72.saatlerinde virüs miktarı yükselir, pik yaparak (10^3 - 10^7 %50 doku kültürü infektif dozu/mL nasofaringeal yıkama sıvısı), birkaç gün içinde düşme eğilimine girer ve ortalama 5. günde tespit edilemeyecek düzeye gelir. Çocuklarda farklı olarak virüs replikasyonu hastalık belirtilerinden önce başlar ve daha uzun süre devam eder. Hastalığın 1-3. gününde virüs replikasyonu pik yapar. Semptomlar ortaya çıktıktan ortalama 7-8 gün içerisinde de virüs saptanabilir, ancak replikasyonun 21. güne kadar sürebileceği bildirilmiştir (3).

Virüsler; birinci konak olan kuşlardan kümes hayvanlarını da içeren diğer hayvanlara geçmekte ve bulaşıcı infeksiyonlara ve salgınlara neden olmaktadır. Virüsle hastalık, insanlar ve kuşlar dışında domuz, at, deniz memelileri (fok, balina) ve sansargillerde de görülmektedir. Virüslerin bulaşması ve infeksiyonlar; insan ve domuz veya tavuk ve insan gibi yeni konaklar arasında da olabilmektedir. Domuzlarla bulaş ya beslenen damlacık yoluyla veya hayvanların transportu sırasında meydana gelmektedir. Virüslerin subtiplerine spesifik tür bariyerini aşabilme ve birçok konak arasında yayılabilme özelliğini etkileyen moleküler, biyolojik ve ekolojik faktörler büyük oranda çözülememiştir. Göçmen kuşların , boy lam doğrultusundaki hareketinin, influenzanın yayılımında ve virüsün evriminin devamında anahtar rol oynadığı düşünülmektedir. Filogenetik analizler, nükleotid değişikliklerinin aminoasit değişiklikleri ile sonuçlanmadığını göstermektedir. Dolayısıyla, yaklaşık 60 yıldır su kuşlarındaki influenza virüslerinin evrimsel olarak çok değişmediği ve optimum adaptasyona ulaştıkları düşünülmektedir. Ancak, diğer yabani ve evcil kuşlara geçmeleri ile birlikte, belirgin evrimsel değişimler göstermeye başlamışlardır. İnsan influenza suşları, α 2,6 zinciri ile galaktoza bağlı sialik asit rezidülerine bağlanırken, avian ve at influenza vi-

rüsleri galaktoza α 2,3 zinciri ile bağı sialik asiti tanır (4,5,6,7,8,9,10,11,12). Dolayısıyla; insan solunum yolu temel olarak α 2,6 sialik asit-galaktoz zinciri içerirken, kuş ve atlardaki konak hücreler α 2,3 zinciri içermektedir. Domuzlardaki epitel hücreleri hem α 2,6 hem de α 2,3 zincirlerini içerdiği için hem insan hem de avian influenza virüslerine duyarlıdır (12). Sonuç olarak, domuzun avian ve insan influenza virüsü ile beraber infekte olması sonucu, avian suşlarının insan reseptörlerini tanımaya adapte olması ile pandemiler için yeni bir konak olabileceği düşünülmektedir.

İnfekte kümes hayvanları veya çıkartıları ile kontamine olmuş yüzey ve nesnelere temasın ve kontamine materyalden havaya karışan virüslerin solunmasının insana bulaşmada temel yol olduğu düşünülmektedir. Hasta hayvanların yenmesi veya H5N1 ile infekte insanlarla temasının kesin bir risk olduğu belirlenmemiştir. Özellikle, kümes hayvanlarının sık olarak beslendiği, hatta evlere kadar girip çocukların oynadığı alanlarda serbestçe dolaştığı ve besleyen kişilerce evlerinde kesim yapıldığı kırsal bölgelerde risk artmaktadır. İnsandan insana damlacık yolu ile bulaş tanımlanmamıştır. Son dönemde; revers transkriptaz- polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile yapılan çalışmalar, asemptomatik ve hafif seyirli vakaların saptanmasına olanak sağlamıştır. Sonuçlar, virüs suşlarının insanlara adaptasyonunun söz konusu olabileceğini göstermektedir. Şu ana kadar, sağlık çalışanlarına nozokomiyal geçiş riskinin düşük olduğu düşünülmektedir (13).

Influenza pandemisi üç koşulda gerçekleşebilir: yeni bir influenza virüs subtipinin ortaya çıkıp, insanları infekte etmesi, ciddi hastalığa sebep olması ve kolaylıkla insanlar arasında yayılmasıdır ki ilk iki koşulla karşı karşıya gelinmiştir. H5N1'in pandemik virüs haline geçebilmesi için iki mekanizma gerekmektedir. Birincisi; reassortment mekanizması ile insan veya domuzda ko-infeksiyon sırasında genetik materyalin insan ve avian virüsleri arasında değişimidir. İkinci me-

kanizma; adaptasyonu sağlayan mutasyonun aşamalı olarak kazanılmasıdır. Bu şekilde, virüsün insan hücrelerine bağlanabilme kapasitesi artar. Bu adapte edici mutasyonun henüz insan vakalarında ilk olarak küçük bir grupta meydana gelmesi ve insandan insana geçişle ilgili bazı kanıtlara rastlanması, muhtemelen dünyaya savunma için biraz zaman kazandırmaktadır. Veriler, insandan insana geçişin çok sınırlı olduğunu ve hastayla çok yakın teması gerektirdiğini göstermektedir, ancak yine de kesinlik kazanmamıştır. Her yeni insan vakası, virüse insanlar arasında geçiş yeteneğini geliştirme fırsatı vermektedir. 1997'de ve 2004 yılı başlarında izole edilen H5N1'e göre, şu anki virüslerin, deney hayvanlarındaki çalışmalarda daha öldürücü ve çevrede daha uzun süre canlı kalabilme yeteneğine sahip oldukları saptanmıştır. Konak grubu genişlemektedir. Ayrıca viral polimeraz genleri PA, PB1 ve PB2'nin sekansları karşılaştırıldığında 1957 ve 1968'de hemaglütinin ile birlikte reassortment sırasında PB1'in de aktarıldığı gösterilmiştir (14,15).

İnsan influenza virüsünde bulunup avian influenza virüsünde bulunmayan PA'da dört, PB1'de bir ve PB2'de beş aminoasit tanımlanmıştır. Bu aminoasitlerin tümünde veya bazılarında gerçekleşecek değişikliklerin virüsün insanlara adaptasyonunda kritik öneme sahip olabileceği düşünülmektedir. 1997 Hong Kong H5N1 virüsü ile 2004 Vietnam H5N1 virüsünün genetik dizileri, bu virüslerin bazı insanlardaki izolatlarının, PB2'deki beş aminoasit değişikliğini (1918'deki virüste tanımlandığı gibi) içerdiği saptanmıştır. Bu bulgu, ek genetik değişikliklerin, bu virüslerin insanlar arasında yayılabilmesi için gerekli olduğunu göstermektedir. Yüksek patojen H5N1'in özellikle dikkat çekmesinin sebebi, bu genetik değişikliklerin daha sık görülmesi, hızla mutasyona uğraması ve diğer hayvanları infekte eden virüslerden gen aktarımına meyilli olmasıdır.

1957 ve 1968 pandemilerinden sorumlu olan suşlar; ilk olarak güneydoğu Asya'da ve avian virüsleri ile mevcut insan influenza suşu arasında-

ki reassortment sonucunda ortaya çıkmıştır (16). 1957 Asya influenza pandemisinin etkeni H1N1 insan influenza virüsü ile beraber, H2N2 avian influenza virüsüdür. 1968'deki Hong Kong influenza pandemisine yol açan insan H2N2 suşu birlikteliğinde avian H3N2 virüsüdür. Kuştan insana geçiş sırasında HA'de aminoasit değişiklikler olmaktadır (17). Bu, HA'nin reseptör bağlanan cebini çevreleyen bölgede farklılıklara yol açmaktadır ve yeni konağa adaptasyon gerçekleşmektedir. Bu değişiklikler insan reseptörleri için spesifiteyi gösteren 226. pozisyonadaki Glu-Leu değişimini de içermektedir. 1957 ve 1968 pandemilerinde milyonlarca insanın ölmesinin sebebi; aslında virüs belirgin derecede patojen olmadığından immünite eksikliğidir. Bu hem immünite yetmezliğinin hem de yüksek virülansa sahip suşun birlikte etkili olduğu 1918 İspanyol pandemisinden farklıdır. 1918 H1N1 virüsünün; 1957 ve 1968 virüsleri gibi kuş ve insan virüsleri arasında reassortment yoluyla değil de, belki de insanlara veya domuz gibi başka bir memeli konağa adapte olmuşken kuşlardan direkt geçişi mümkün olmaktadır (18) Bu teoriyi, 1918 suşunun kuşlardaki reseptörlere tutunmadan sorumlu olan HA'nin 226. ve 228. pozisyonlarındaki aminoasit rezidülerini alıkoyması desteklemektedir (19). 1918 suşunun atalarından aldığı yapısal ve biyolojik özellikleri taşımaya devam ederken insan hücrelerini tanıma ve infekte etme özelliğini kazanması yüksek virülansını açıklamaktadır. 1918 pandemisinin yüksek mortalitesi bir miktar sekonder bakteriyel pnömoniyi tedavi edecek antibiyotiklerin olmaması ve kötü yaşam koşulları ile açıklanabilirse de, ana sebep ileri derecede hızlı ve ciddi klinik sonuçların işaret ettiği avian influenza virüslerin yüksek patojenitesiye sahip olmasıdır (20).

İnsanlarda; yüksek patojeniteye sahip influenza H5N1 virüsleri ile oluşan infeksiyonların ciddi, sıklıkla ölümcül hastalıkla ilişkili olduğu açıklık kazanmıştır. 1997 yılında Hong Kong'da kümes hayvanlarındaki influenza H5N1 salgınının ardından 18 kişide şiddetli solunum yolu hastalığı

meydana gelmiş ve 6 tanesi ölümle sonuçlanmıştır (21,22,23). 1,5 milyon tavuğun kesimi ile büyük bir pandeminin ortaya çıkması önlenmiştir. Salgın sonucunda influenza açısından kümes hayvanlarının takibi; 2001 ve 2002'de, erkenden diğer avian influenza salgınlarının saptanmasına olanak sağlamıştır. Daha sonra ilk kez 2003 şubat ayında, Hong Kong'lu bir ailede tanımlanmıştır (24). Aileden kız çocuğu; Çin'in Fujian şehrini ziyaret sırasında tanımlanamamış bir solunum yolu infeksiyonundan ölmüştür. Hong Kong'a döndükten sonra baba ve oğlunda ciddi solunum yolu hastalığı gelişmiş ve baba ölmüştür. İki hastadan da H5N1 virüsü izole edilmiştir. Oğlunun öyküsünde, seyahat sırasında kümes hayvanları ile yakın temas olduğu bilinmektedir. Güneydoğu Asya salgınlarında insan infeksiyonları 2004'ün başlarında Vietnam ve Tayland'da bildirilmiştir. Vietnam, Hanoi'de bir hastanede tedavi altına alınan 11 çocuktan 7'si ölmüştür. Şubattan marta kadar Vietnam ve Tayland'dan 35 vaka bildirilmiştir, 24'ü ölümle sonuçlanmıştır. Temmuz'da Kamboçya, Çin, Endonezya, Tayland ve Vietnam'da daha küçük çaplı salgınlar rapor edilmiştir. Ağustos'ta ekim ayları arasında da Tayland (5) ve Vietnam'dan (4) bildirilen 9 vakanın 8'i ölümle sonuçlanmıştır. Böylece, bu ülkeden bildirilen vaka sayısı, 32'si fatal olmak üzere 44'e ulaşmıştır.

Bu yazının kaleme alındığı zaman diliminde, Türkiye genelinde 31 ilde 67 kesin odak, 26 ilde ise 66 şüpheli odak saptanmıştır. Toplam itlaf edilen hayvan sayısı 1 milyon 596 bine ulaşmıştır (25). Bu süreçte insan vaka sayısı, 30 ocak 2006 tarihi itibarıyla, 21 olarak bildirilmiş, bunlardan 4 tanesi fatal seyretmiştir (26).

2004'teki kümes hayvanlarındaki salgınlardan başlangıçta etkilenen birçok ülkede virüs olmadığı bildirilse de, kümes hayvanlarının büyük oranda itlafı ile salgının bastırılması çabalarına rağmen birçok Asya ülkesinde kümes hayvanlarında ve suda yaşayan kuşlarda H5N1 virüsünün endemik düzeye ulaştığı görülmektedir. Bu ülkelerde,

kuşlardan insana geçişin sık meydana gelmesi, virüsün insanlara adaptasyonuna ve insanlar arasında yayılabilmesine fırsat tanımaktadır. Ek olarak, kümes hayvanları ve domuzlarla yakın temasta olan insanların yaşadığı bu ülkelerde avian ve insan virüslerinin devam eden yayılımı, infekte olmuş insan ve diğer domuz gibi memeli konaklarda reassortmant riskinde artışa neden olmaktadır. Çin'de domuzlarda H5N1 virüsünün izole edilmesi, ve her ne kadar düşük prevalansa sahip olsa da Vietnam'da domuzlarda H5N1 antikorlarının saptanması, bu bakımdan düşündürücüdür. (27,28) Tüm bu nedenlerle, güneydoğu Asya'da bugünkü gelişmeler; 1957 ve 1968'deki ne benzer yeni bir influenza pandemisine neden olacak suşun bu bölgeden yakın gelecekte ortaya çıkacağına dair endişeleri de desteklemektedir.

KLİNİK

Avian influenza A'nın (H5N1)'in inkübasyon dönemi 2-4 gün olarak bilinmekte, son raporlara göre 8 güne kadar çıkabileceği bildirilmektedir. Ateş, öksürük, solunum sıkıntısı ve pnömoniye ait radyolojik bulgular görülen şiddetli insan influenza infeksiyonundan ayırt edilemeyen şiddetli influenza sendromu ile karakterizedir (23,29,30). Göğüs filmlerinde yaygın, bilateral infiltrasyon, lobar kollaps, fokal konsolidasyon ve hava bronkogramları ile kendini gösterir. Primer olarak viral pnömoni olduğu ve bakteriyel süperinfeksiyon olmadığı belirtilmektedir. Bunun haricinde, özellikle çocuklarda sık olarak diyare, kusma ve karın ağrısı gibi gastrointestinal semptomlar gözlenmiştir (31,32). Bazı vakalarda, diyare diğer klinik belirtilerden önce ortaya çıkan tek semptomdur. H7 ve H9 virüsleri ile insan infeksiyonlarından farklı olarak, H5N1 ile infekte hastalarda konjunktivit belirgin değildir. Şiddetli hastalıkta ventilatör desteği gerektiren bilateral pnömoninin günler içinde hızlı gelişimi söz konusudur. 4-13 gün içerisinde akut respiratuar distress sendromu, böbrek yetmezliği, pulmoner hemoraji, pnömotoraks, pansitopeni, Reye's sendromu ve çoklu organ yetmezliği gibi komplikasyon-

lar gelişir. Santral sinir sisteminin tutulduğu vakalara da rastlanmıştır (13).

H5N1 ile infekte hastaların rutin laboratuvar test sonuçları, özellikle şiddetli vakalarda lenfopeni, CD4+/CD8+ oranında tersine dönme, trombositopeni ve serum transaminazlarında artma şeklindedir (23,29,30). Çoğu hastada sitokin ve kemokin düzeyinde artış görülmesi patogenezdaki immün aracılı patolojinin rolünü göstermektedir (24,33). Hiperglisemi (kortikosteroid kullanımına bağlı gelişmiş olabilir) ve kreatinin düzeyinde yükselme görülür. Diğer bulgular yaygın alveolar hasar ile interstisyel fibrozisi, hepatik santral lobüler nekrozu, akut renal tübüler nekrozu ve lenfoid tükenmeyi içermektedir. Gastrointestinal, hepatik, renal ve hematolojik belirtiler yaygın doku tropizmini gösterse de, solunum sistemi dışında viral replikasyon olduğuna dair kanıt bulunmamıştır. Bununla birlikte; fekal örneklerde pozitif iplikli viral RNA'nın tespit edilmesi ve virüsün izole edilmesi, gastrointestinal replikasyonu kuvvetle işaret etmektedir (32,34).

H5N1 infeksiyonları infant ve küçük çocuklarda daha yüksek ölüm oranları ile seyretmektedir. Ölüm, hastalık gelişimini takiben 9-10 gün içinde ilerleyici solunum yetmezliği nedeni ile gerçekleşmektedir. Hong Kong salgınında H5N1'le infekte hastaların ailelerinde ve sağlık çalışanları üzerindeki sero-epidemiolojik çalışmalarda hafif semptomlar gösteren ve asemptomatik seyreden infeksiyonlar bildirilmiştir (22,23). Bu çalışmalarda; 217 virüsle karşılaşmış sağlık personelinin 8'i ve 309 karşılaşmamış sağlık çalışanın 2'si H5N1 spesifik antikorlar için seropozitif bulunmuştur (35). Serokonversiyon bildirilen virüsle karşılaşmış iki hemşireden birinde infekte hastayla temastan 2 gün sonra solunum hastalığı ortaya çıkmıştır. Asemptomatik infeksiyonun varlığını göstermekten daha önemlisi, bu veriler birkaç vakayla sınırlı olsa da insandan insana nozokomiyal bulaşı göstermektedir. 2004'te Tayland ve Vietnam'daki H5N1 ile infekte hastalarla ilgilenen sağlık çalışanlarındaki sero-epidemiolojik

çalışmalarda, çalışma sırasında Vietnamlılarda uygun infeksiyon kontrol yöntemleri olmamasına rağmen insandan insana geçişi gösteren bir delile rastlanmamıştır (36,37,38). 2004'te Tayland'daki salgın sırasında, epidemiyolojik çalışmalar H5N1 infeksiyonundan öldüğü düşünülen bir çocuktan, kümes hayvanları ile temas öyküsü olmayan ve uzun süre korunmadan kızının bakımını yapan annesine insandan insana geçiş olduğunu düşündürmüştür (39). Çocuğun bir halasının da, en son kümes hayvanları ile temasının 17 gün önce olması ve bunun beklenen 2-10 günlük inkübasyon periyodundan daha uzun olması nedeniyle aynı yolla infekte olmuş olabileceği belirtilmiştir. İnfluenza H5N1'in insandan insana etkin geçişini gösteren deliller olmasa da, son yıllarda H5N1 virüslerinin nispeten hızlı evrim göstermesi nedeniyle infeksiyon riski açısından uyarılar ve ayrıntılı araştırmalar söz konusu olmaya devam etmektedir.

LABORATUVAR TANISI

Tanının başarısı, örneğin kalitesine, transportuna ve saklama koşullarına bağlıdır. Örnekler, semptomların ortaya çıkışını takiben 3 gün içinde alınmalıdır. Nazal örneklerle göre farengeal örneklerde virüs daha yüksek oranda saptanabilir.

Memeliler ve kuşlardan, üst solunum yoluna ait, nazal, trakeal ve boğaz sürüntü örnekleri, fekal örnekler, ayrıca çevresel örnekler incelenebilir. Ölü kuşlar tespit edildiğinde trakeal örnekler, bronkoalveolar lavaj, akciğer biyopsi örneği ve de beyin, dalak, kalp, akciğer, böbrek ve karaciğerden alınan örnekler birlikte incelenmelidir. Örnekler alındıktan sonra, eğer hemen işlenmeyecekse -70°C veya daha düşük ısılarda dondurulmalıdır(73) Antibiyotik ve antimikotik içeren uygun viral transport besiyeri kullanılması tavsiye edilir. Hank'ın balanslı tuzlu su solüsyonu, hücre kültürü besiyeri, fosfat tamponlu tuzlu su, triptoz fosfat besiyeri ve beyin kalp infüzyon buyyon kullanılabilir. Sığır serum albumini gibi proteinler virüslerin stabilizasyonu için eklenme-

lidir. Örnek alımında polyester veya pamuk eküvyon çubukları kullanılır (40).

Tanıda altın standart virüs izolasyonudur. Bunun yanında, RT-PCR ile viral nükleik asitin taranması veya immünokromatografik veya immunofloresan yöntemlerle virüs antijeninin aranması mümkündür. Ek olarak, viral antijenlere karşı oluşan nükleoprotein gibi antikorları arayan ELISA testleri yapılabilir. İnfluenza virüslerinin ileri subtiplendirilmesi veya subtip spesifik antikorların aranması referans laboratuvarlarda yapılmaktadır. İnfeksiyon kontrolü ve eş zamanlı epidemiyolojik araştırmaların yapılabilmesi için subtipin acilen rutin laboratuvarlarca saptanabilmesi gereklidir. Ancak etkilenen ülkelerde tanı olanakları kısıtlıdır ve referans laboratuvarlara bağımlıdır. Bu durum, salgınların eşzamanlı tanımlanmasında ve uygun önlemlerin alınmasında gecikmelere neden olmaktadır. Dolayısıyla, tanılacak olanakları artırmaya yönelik çabalar, pandemiden korunma ve kontrolde önemlidir (41).

Virüs izolasyonu

Avian influenza virüsleri; yumurta embriyosunda veya Madin Darby Canine Kidney (MDCK) veya Rhesus Monkey Kidney (LLC-MK2) hücreleri kullanılarak hücre kültüründen izole edilebilir. Güvenlik sebebiyle, yüksek patojenitede avian influenza virüslerinin izolasyonu için biyogüvenlik derecesi 3 ve üzerinde laboratuvar koşulları gerekmektedir. Hücre kültüründeki sitopatik etkiler non-spesifiktir. İdentifikasyon için; nükleoproteine karşı monoklonal antikorlarla immünofloresan boyama yapılabilir. RT-PCR ile veya hemaglutinasyon inhibisyon ve nöraminidaz inhibisyon testleri ile HA ve NA subtiplendirmesi yapılabilir. İnsan infeksiyonlarında, avian influenza virüsleri en çok boğaz ve nazal sekresyonlar ve bronkoalveolar lavaj gibi solunum örneklerinden veya konjonktival sürüntü örneklerinden izole edilmiştir (23,30,42). Rapor edilen bir H5N1 infeksiyonu vakasında, virüs ayrıca serum, serebrospinal sıvı ve rektal sürüntüden de izole edilmiştir (32).

Antijen arama

Direkt immüno Floresan veya hızlı immüno kromatografik yöntemler kullanılır. Bununla birlikte, avian influenza hastalarda düşük sensitivite nedeniyle bu testlerin kullanımı sınırlıdır (23,24). Tip A ve B, ayrıca influenza A subtiplerini ayırt etmede yeterli değildir. Spesifik hızlı antijen tarama testlerinde gelişmeler devam etmektedir (43).

Seroloji

Hemagglütinasyon inhibisyon (HI) testleri insan influenza virüslerine karşı oluşan antikorların saptanmasında altın standarttır. Ancak, insanlarda dahil olmak üzere memelilerde avian influenza virüslerine karşı oluşan antikorları saptamada yetersizdir (44,45,46). Virüs izolasyonu ile infeksiyonunun kesinlik kazandığı vakalarda bile başarısız sonuç elde edilen çalışmalar vardır. Bunun olası sebepleri bazı avian virüslerin zayıf immünojenitesi ve düşük titredeki veya daha az tutunmuş antikorların saptanmasındaki düşük duyarlılıktır (45,46,47,48). 1997 Hong Kong salgınında HI ile mikronötralizasyon karşılaştırıldığında, ikinci yöntem daha duyarlı bulunmuştur. H5N1/97'den elde edilen rekombinant HA kullanılarak yapılan indirekt ELISA yönteminin en az mikronötralizasyon testi kadar duyarlı olduğu, spesifitedeki düşüklüğün ise tüm HA'lerdeki ortak epitoplara karşı çapraz reaksiyona bağlı olduğu düşünülmüştür. Bu gözlemlere dayanarak, nötralizasyon testleri insanlarda avian influenza virüslerine karşı gelişen antikorların saptanmasında tercih edilen yöntemlerdir. Antikorlar, semptomların gelişmesinden 14 gün veya sonra saptanabilir ve 20 gün üzerinde 1:640'a eşit veya daha fazla titreler görülür (49). HI testinin dezavantajları doğal olarak serumda var olan nonspesifik inhibitörlerin uzaklaştırılması gereksinimi, testin her yapılışında antijen standardizasyonunun yapılması ve test sonuçlarının okunmasının uzmanlık gerektirmesidir. Nöraminidaz inhibisyon (NI) testinin bir avantajı serumda çok az miktarda NA'a karşı nonspesifik inhibitörler bulunmasıdır. HI testi, NI testi ve ELISA epidemiyolojik ve immunolojik ve de ay-

rıca aşı çalışmalarında kullanılmaktadır. (41)

Revers Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

RT-PCR, nükleik asitlerin saptanmasına yönelik duyarlı ve spesifik yöntemlerdir. Kültür veya antijen tarama testleri ile karşılaştırıldığında birçok viral patojenin tanısında duyarlılığı yükseltmiştir. Özellikle real-time PCR teknolojisi kullanılırken, örnek alındıktan sonra saatler içinde güvenilir bir subtip spesifik tanı sonucu elde edilebilir (23,29,30). RT-PCR yönteminin dezavantajı; kontaminasyona duyarlı olması ve yanlış pozitif sonuç riskidir. Bu risk, PCR hazırlığı ve amplifikasyon için laboratuvarın fiziki olarak ayrılması gibi doğru önlemlerin alınması ve amplikonların taşınması ile oluşan kontaminasyonun önlenmesi için Urasil-N-glikozilaz sisteminin kullanılması ile minimuma indirilebilir. Ek olarak; RT PCR'da internal primer kullanımı; yetersiz nükleik asit ekstraksiyonu, cDNA sentezi veya amplifikasyona bağlı yanlış negatif sonuçların önlenmesi için gerekmektedir. PCR'ın avantajlarından birisi; virüs genomu çok az miktarda olsa da saptayabilmesi, bir diğeri ise virüs tipinin, PCR ürününün sekans çalışması ile saptanabilmesine olanak sağlamasıdır.

Arkadaki tabloda; örnek olarak influenza A virüs matriks geninin ve avian H5 ve H7 virüs HA geninin belli bölgelerine spesifik primer ve problemler kullanılarak elde edilmiş sekans dizileri izlenmektedir (Tablo-1) (50).

Tablo 1. İnfluenza A ve avian H5 ve H7 virüslerine ait primer ve prob dizaynları

Spesifite	Primer/prob	Sekans (5'-3')
Influenza	M+25	AGA TGA GTC TTC TAA CCG AGG TCG
A virüs	M-124	TGC AAA AAC ATC TTC AAG TCT CTG
	M+64	FAM-TCA GGC CCC CTC AAA GCC GA-TAMRA
Avian H5	H5+1456	ACG TAT GAC TAT CCA CAA TAC TCA G
	H5+1685	AGA CCA GCT ACC ATG ATT GC
	H5+1637	FAM-TCA ACA GTG GCG AGT TCC CTA GCA-TAMRA
Avian H7	H7+1244	ATT GGA CAC GAG ACG CAA TG
	H7+1342	TTC TGA GTC CGC AAG ATC TAT TG
	H7+1281	FAM-TAA TGC TGA GCT GTT GGT GGC A-TAMRA

TEDAVİ VE KORUNMA

Antiviral tedavi

Kuş gribi tedavisinde nöraminidaz inhibitörlerinden; oseltamivir ve zanamivir kullanılmaktadır. Etkileri erken uygulanmasına (belirtilerin ortaya çıkışından sonraki 48 saat içinde) bağlıdır (30,51). Bu durumda, sağkalımı arttırmaktadırlar. Dolayısıyla erken tanı, tedavide çok önemlidir. Zanamivir, inhalasyon yolu ile kullanılmaktadır. Bu nedenle yaşlılarda kullanılması zordur ve bronkospazma neden olabilmektedir. Dolayısıyla, oral olarak kullanılabilen oseltamivir tercih edilir. İki ilaç için de tedavi sırasında direnç gelişimi bildirilmiştir. Bu durum, nöraminidaz ve hemaglutininin aktif kısımlarında meydana gelen mutasyonlarla ilişkilidir.

M2 inhibitörleri olan amantadin ve rimantadinin tedavi etkinliği net değildir. Amantadinin insan influenzasındaki tedavi etkinliği, güvenilir klinik çalışmaların azlığı nedeniyle belirgin değildir, fakat yetişkin ve çocuklarda 1 günde ateşte düşme ve klinikte gerileme gözlenmiştir (51). 1997 Hong Kong salgınında H5N1 ile infekte birçok

kişi amantadin ile tedavi edilmişse de, virüse karşı aktivitesi hakkında anlamlı sonuçlar çıkarmak için çok az bir sayıdır (23). Bu salgında ilk hastadan izole edilen virüsün in vitro duyarlılık testlerinde, amantadine normal bir duyarlılık izlenmiştir (21). Her iki ilacın da en önemli dezavantajı hızlı direnç gelişimidir. Bu direnç, tek nükleotid değişiklikleri sonucunda M2 proteinindeki aminoasit değişimiyle meydana gelir. Bu değişim 26,27,30,34 ve özellikle de 31. kodonda görülen aminoasit değişiklikleridir (52,53). Dolayısıyla, yüksek direnç oranının saptanması, amantadinin bir tedavi seçeneği olmasının zor olduğunu göstermiştir.

Nöraminidaz inhibitörleri için en önemli temel sorunlar, birçok ülke için sınırlı olan üretim kapasiteleri ve yüksek fiyatlarıdır. Şu anda, üretim kapasitesi 4 katına çıkarılmış olsa da, dünya nüfusunun %20'sini tedavi etmeye yetecek oseltamiviri üretmek için on yıla ihtiyaç duyulmaktadır. Çünkü oseltamivirin yapımı oldukça kompleks ve zaman alıcıdır.

Antivirallerle birlikte steroid kullanımının yararı

nın ileri incelemelerle değerlendirilmesi gerekmektedir. Ayrıca immünomodülatör ilaçların da yararlı olabileceği ileri sürülmüştür (30).

Çoğu fatal pnömoninin virüsün etkisine bağlı olduğu gözlenmiş ancak bakteriyel infeksiyonlarla komplike olabileceği için geç dönemde gelişen pnömoniler açısından antibiyotiklerin hayat kurtarıcı olabileceği düşünülmüştür.

Şu anda test edilen bir diğer kimyasal ajan; Ro6408802 olarak da bilinen karboksilik bileşim (3,4R,5S)-4-asetamido-5-amino-3-(1-etilpropoksi)-1-sikloheksan-1-karboksilik asittir. Bu bileşik; nöraminidaz aktif bölgesinin üç boyutlu yapısına tam anlamıyla uymakta ve enzimi tamamen inhibe etmektedir. Şu anda prelinik ve klinik ilaç denemeleri aşamasındadır. İnflanzanın tedavisi için etkili yeni bir kemoterapötik yaklaşım olarak ümit vaad etmektedir (54).

İnfeksiyon kontrolü ve profilaksi

Avian influenza ile infekte kuşlar feçesle ve diğer sekresyonlarla yüksek miktarda virüs çıkarak toz, toprak, su, kafesler, aletler ve çevreyi direkt olarak kontamine etmektedir. Avian influenza toprak, su veya kontamine gereçlerde haftalarla aylar arasında, ısı ve neme bağlı olarak infeksiyöz özellikte kalabilir. Kontamine gübrede düşük ısılarda en az 3 ay canlı kalabildiği bilinmektedir. 0°C'de 30 gün, suda 22°C'de 4 gün canlı kalabilir. 37°C'de, örneğin feçesde 6 gün canlı kalabildiği saptanmıştır. Sudaki viral titreleri incelendiğinde, 17°C'de 21-34,5 günde, 28°C'de 5-17 günde azalma izlenmiştir (55). Virüs 56°C'de 3 saatte, veya 60°C'de 30 dakikada ölür. Formalin ve iyot bileşiklerine duyarlıdır.

İnfeksiyonun kontrolünde, kümes hayvanları ile direkt veya kontamine çevre ile temasın önlenmesi gereklidir (30,56,57). 1997 Hong Kong H5N1 salgımında vaka-kontrol çalışmaları; hastalık ortaya çıkmadan önceki hafta canlı kümes hayvanı satılan çiftlik ve dükkanlarına gidilmesinin bir risk faktörü olduğunu fakat kümes hayvanı eti veya ürünlerinin yenmesinin herhangi bir

risk faktörü olmadığını göstermiştir (57). Güneydoğu Asya'da bugünkü H5N1 ile infekte olan ördeklerin sağlıklı olmalarına rağmen uzun zaman periyodları boyunca bol miktarda virüs ekskrete ettikleri gösterilmiştir. Bu ülkelerde, birçok ördek sürüsünün yaşadığı havuz ve kanallardaki sular kırsal kesimde temizlik ve içilmede kullanılmaktadır. Buna rağmen insanlarda hastalık görülmemesi, infekte ördeklerin çıkartıları ile kontamine suların insanlar için bir bulaş kaynağı olmasının pek mümkün olmadığını düşündürmektedir (32,58). Aslında, kontamine su ile temasın su kuşları arasında en önemli bulaş yolu olduğu bilinmektedir.

H5N1 influenza virüsünün insandan insana geçişinin sınırlı sayıda olsa da, infekte hastayla, korunmadan uzun süre temas sonucu olabileceği rapor edilmiştir (39,49,56). İnfekte kişilerde diare ortaya çıkabildiği ve potansiyel bir geçiş yolu olabileceği için, infeksiyon kontrolünde bu yol gözardı edilmemelidir (30,31,32). İnsanlardaki ekskresyon şekilleri ve infektivite periyotları net değildir. 2-10 günlük inkübasyon döneminde ekskrete edilip edilmediği bilinmemektedir (23,30). Şüpheli kuşlarla, ortamlarla ve hastalarla temasın önlenmesi ve temas sırasında maske, koruyucu elbise, gözlük ve eldiven kullanılması şu anki bilgiler ışığında infeksiyon kontrolünde önemlidir.

Profilakside, nöraminidaz inhibitörleri kullanımı önemlidir (51). Kanada ve Hollanda'daki H7 salgınlarında koruyucu olarak kullanılmışlarsa da (56,59), şu anda güneydoğu Asya'daki salgınlarda finansal ve bölgesel sebeplerle böyle bir uygulama mantıklı değildir. Profilakside, monoklonal antikor kullanımı ileri araştırma gerektirmektedir.

En etkin infeksiyon kontrolü, infeksiyon kaynağını ortadan kaldırmaktır (56,59). Ancak şu anki güneydoğu Asya salgımındaki coğrafi yaygınlık düşünülürse, sadece infekte hayvanların yok edilmesi salgını önlemeyecektir (60). İnfekte bölgelerin iyi gözlenmesi, lojistik kapasiteleri ve etkilenen bölgeye giriş-çıkışların (örneğin kanatlıların pisliklerine basan küçük ve büyükbaş hayvanlar

mekanik vektör olarak hareket edebilir) kontrolü de başarıda önemlidir.

Aşılama

İnsan influenza virüs aşularının önemli kısmı, yumurta embriyosunda inaktif virüslerin üretilmesiyle yapılır. Yüksek patojen avian influenza virüslerine karşı aşı üretimi yüksek biyogüvenlik gerektirmesi ve embriyonik yumurtalarda virüs patojenitesi nedeniyle yüksek miktarda virüs elde edilemediği için zordur (61,62). Bu nedenle; revers genetik tekniklerin kullanımı, rekombinant hemaglütininin üretilmesi ve DNA aşuları denemektedir (51,61,62,63). Plazmid temelli revers genetik kullanılarak önemli virülans belirlicilerinin değiştirildiği deneysel H5N1 aşuları etkili bulunmuştur (64,65,66). Ancak pandemiye neden olabilecek avian influenza virüsüne karşı aşı henüz bulunmamıştır. Aşının, pandemik virüse çok benzer olması gerektiğinde, geniş çaplı bir aşı üretimi, yeni virüs ortaya çıkıp pandemi ilan edilmeden pek mümkün görünmemektedir. Şu anki, dünya çapında üretim kapasitesi, bir pandemi sırasındaki gereksinim için yeterli görülmemektedir.

PANDEMİYE HAZIRLIK VE DİREKTİFLER

Kümes hayvanlarında yüksek patojenik avian influenza virüsü salgınlarının sıklığında artış ve virüsün kümes hayvanlarından insanlara direkt geçişi; güneydoğu Asya'daki H5N1 salgınının genişlemesiyle sonuçlanmış ve bu durum yakın bir zamanda influenza pandemisi olacağı hakkındaki korkuları arttırmıştır. Pandemi için gerekli üç koşuldan ikisi gerçekleşmiştir: insanlarda immünite gelişmemiş yeni bir antijenik suşun ortaya çıkışı ve bu suşun şiddetli hastalıklara sebep olabileceği insanlara geçişi. Şu anda birçok güneydoğu Asya ülkesinde kümes hayvanlarında endemik seviyeye ulaşmıştır. Mutasyon ve genetik reassortment ile insanlara ve ara memeli konaklara adaptasyon olasılığı artmaktadır. Pandemiye önlemeye yönelik planlar, antiviral ilaçların ve dünya genelinde sayıları gittikçe artan ülkelerde geliştirilen aday aşuların stoklanması ve hızlı aşı üretimi için alternatif yöntemler geliştirilmesi ile

aşı dozlarını azaltabilecek potansiyel yöntemler geliştirilmesini içermektedir (61,62,63,67,68).

Olası H5N1 pandemisine karşı bu yapılan hazırlık çabalarının önemine rağmen, dünya genelinde gelecekte, yeni influenza virüslerinin ve insanda infeksiyon yapabilecek diğer patojen türlerin erken tanısına olanak sağlayacak daha yapısal ve uzun dönemli önlemler gerekmektedir. Ana hedefler, hastalık kontrolü ve zorlukları ile ilgili bilgilerin artırılması, aşı çalışmalarının ve pandemi hazırlıklarının hızlandırılmasıdır (69). Salgınların kaynağı olan ülkelerde halk sağlığını korumaya yönelik altyapı çalışmaları yapılmalı, erken tanıya olanak sağlayacak laboratuvar olanakları geliştirilmeli, klinik, epidemiyolojik ve teknik bilgilerin aktarımı sağlanmalıdır (41). Böylece, etken hızla saptanabilir ve aşı planlaması yapılabilir. Sonuç olarak, bu ülkelerdeki tanı olanaklarının geliştirilmesi, antiviral profilaksi ve diğer koruyucu önlemler pandemi kontrolünde başarı şansını arttıracaktır (70,71).

Kaynaklar

1. Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, Bestebroer T M, Herfst S and Smith D et al.: Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol* 2005; 79: 2814-2822.
2. de Jong M D, Tran T H: Avian influenza A (H5N1). *J Clin Virol* 2006; 35: 2-13.
3. World Health Organization Writing Group : Nonpharmaceutical interventions for pandemic influenza, international measures. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 81-87.
4. Connor R , Kawaoka Y, Webster R G and Paulson J C: Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates. *Virology* 1994; 205: 17-23.
5. Gambaryan A S, Tuzikov A B, Piskarev V E, Yamnikova S S, Lvov D K and Robertson J S et al: Specification of receptor-binding phenotypes of influenza virus isolates from different hosts using synthetic sialylglycopolymers: non-egg-adapted human H1 and H3 influenza A and influenza B viruses share a common high binding affinity for 6_-sialyl(N-acetyl)lactosamine). *Virology* 1997; 232:345-350.
6. Matrosovich M N, Gambaryan A S, Teneberg S, Piskarev V E, Yamnikova S S and Lvov D K et al.: Avian influenza A viruses differ from human viruses by recognition of sialyloligosaccharides and gangliosides and by a higher conservation of the HA receptor-binding site. *Virology* 1997; 233: 224-234.
7. Matrosovich M N, Matrosovich T Y, Gray T, Roberts N

- A and Klenk H D: Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 4620-4624.
8. Rogers G N and D'Souza B L: Receptor binding properties of human and animal H1 influenza virus isolates. *Virology* 1989; 173: 317-322.
9. Rogers G N and Paulson J C: Receptor determinants of human and animal influenza virus isolates: differences in receptor specificity of the H3 hemagglutinin based on species of origin. *Virology* 1983; 127-361-373.
10. Rogers G N, Paulson J C, Daniels R S, Skehel J J, Wilson I A and Wiley D C: Single amino acid substitutions in influenza haemagglutinin change receptor binding specificity. *Nature* 1983; 304: 76-78.
11. Couceiro J N, Paulson J C and Baum L G: Influenza virus strains selectively recognize sialyloligosaccharides on human respiratory epithelium; the role of the host cell in selection of hemagglutinin receptor specificity. *Virus Res* 1983; 29: 155-165.
12. Ito T, Couceiro J N, Kelm S, Baum L G, Krauss S and Castrucci M R et al.: Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *J Virol* 1998; 72: 7367-7373.
13. The Writing Committee of the World Health Organization (WHO) Consultation on Human Influenza A/H5: Avian Influenza A (H5N1) Infection in Humans. *N Engl J Med* 2005; 353: 1374-85.
14. Belshe Robert B: The origins of pandemic influenza- lessons from the 1918 virus. *N Engl J Med* 2005; 353: 2209-2211.
15. Kawaoka Y, Krauss S and Webster R G: Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics. *J Virol* 1989; 63: 4603-4608.
16. Scholtissek C, Rohde W, Von Hoyningen V and Rott R: On the origin of the human influenza virus subtypes H2N2 and H3N2. 1978; *Virology* 87: 13-20.
17. Bean W J, Schell M, Katz J, Kawaoka Y, Naeve C and Gorman O et al.: Evolution of the H3 influenza virus hemagglutinin from human and nonhuman hosts. *J Virol* 1992; 66: 1129-1138.
18. Reid A H, Taubenberger J K and Fanning T G: Evidence of an absence: the genetic origins of the 1918 pandemic influenza virus. *Nat Rev Microbiol* 2004; 2: 909-914.
19. Taubenberger J K, Reid A H, Krafft A E, Bijwaard K E and Fanning T G: Initial genetic characterization of the 1918 "Spanish" influenza virus. *Science* 1997; 275: 1793-1796.
20. Mills C E, Robins J M and Lipsitch M: Transmissibility of 1918 pandemic influenza. 2004; *Nature* 432: 904-906.
21. Subbarao K, Klimov A, Katz J, Regnery H, Lim W and Hall H et al.: Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science* 1998; 279: 393-396.
22. Chan P K: Outbreak of avian influenza A(H5N1) virus infection in Hong Kong in 1997. *Clin Infect Dis* 2002; 34 (Suppl. 2): S58-S64.
23. Yuen K Y, Chan P K, Peiris M, Tsang D N, Que T L and Shortridge K F et al.: Clinical features and rapid viral diagnosis of human disease associated with avian influenza A H5N1 virus. *Lancet* 1998; 351: 467-471.
24. Peiris J S, Yu W C, Leung C W, Cheung C Y, Ng W F and Nicholls J M et al.: Re-emergence of fatal human influenza A subtype H5N1 disease. *Lancet* 2004; 363: 617-619.
25. <http://www.saglik.gov.tr>
26. <http://www.who.int> Avian influenza - situation in Turkey-update 6.
27. Chen H, Deng G, Li Z, Tian G, Li Y and Jiao P et al.: The evolution of H5N1 influenza viruses in ducks in southern China. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 10452-10457.
28. Choi Y K, Nguyen T D, Ozaki H, Webby R J, Puthavathana P and Buranathal C et al.: Studies of H5N1 influenza virus infection of pigs by using viruses isolated in Vietnam and Thailand in 2004. *J Virol* 2005; 79: 10821-10825.
29. Chotpitayasonondh T, Ungchusak K, Hanshaoworakul W, Chunsuthiwat S, Sawanpanyalert P and Kijphati R et al.: Human disease from influenza A (H5N1) Thailand, 2004. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 201-209.
30. Tran T H, Nguyen T L, Nguyen T D, Luong T S, Pham P M and Nguyen V C et al.: Avian influenza A (H5N1) in 10 patients in Vietnam. *N Engl J Med* 2004; 350: 1179-1188.
31. Apisarnthanarak A, Kitphati R, Thongphubeth K, Patoomanunt P, Anthonont P and Auwanit W et al.: Atypical avian influenza (H5N1). *Emerg Infect Dis* 2004; 1: 1321-1324.
32. de Jong M D, Bach V C, Phan T Q, Vo M H, Tran T T and Nguyen B H et al.: Fatal avian influenza A (H5N1) in a child presenting with diarrhea followed by coma. *N Engl J Med* 2005; 352: 686-691.
33. To K F, Chan P K, Chan K F, Lee W K, Lam W Y and Wong K F et al.: Pathology of fatal human infection associated with avian influenza A H5N1 virus. *J Med Virol* 2001; 63: 242-246.
34. Uiprasertkul M, Puthavathana P, Sangsiriwut K, Pooruk P, Srisook K and Peiris M et al.: Influenza H5N1 replication sites in humans. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 1036-1041.
35. Bridges C B, Lim W, Hu-Primmer J, Sims L, Fukuda K and Mak K H et al.: Risk of influenza A (H5N1) infection among poultry workers, Hong Kong, 1997-1998. *J Infect Dis* 2002; 185: 1005-1010.
36. Apisarnthanarak A, Erb S, Stephenson I, Katz J M, Chitaganpitch M and Sangkitporn S et al.: Seroprevalence of anti-H5 antibody among Thai health care workers after exposure to Avian influenza (H5N1) in a tertiary care center. *Clin Infect Dis* 2005; 40: e16-e18.
37. Liem N T and Lim W: Lack of H5N1 avian influenza transmission to hospital employees, Hanoi, 2004. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 210-215.
38. Schultsz C, Dong V C, Chau N V V, Le N T H, Lim W and Thanh T T et al.: Avian influenza H5N1 and healthcare workers. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 1158-1159.
39. Ungchusak K, Auewarakul P, Dowell S F, Kitphati R, Auwanit W and Puthavathana P et al.: Probable person-to-person transmission of avian influenza A (H5N1). *N Engl J Med* 2005; 352: 333-340.

40. Cox N, Webster R G, Krauss S, Guan Y, Hay A, Yu K, Shortridge K, Peiris M, Kida H, Brown I, Stöhr K :Manual on animal influenza diagnosis and surveillance. WHO/CDC/CSR/NCS 2002; 5: 1-99.
41. Hien T T, de Jong M and Farrar J: Avian influenza-a challenge to global health care structures. *N Engl J Med* 2004; 351: 2363-2365.
42. Fouchier R A, Schneeberger P M, Rozendaal F W, Broekman J M, Kemink S A and Munster V et al.: Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 1356-1361.
43. Xu X, Jin M, Yu Z, Li H, Qiu D and Tan Y et al.: Latex agglutination test for monitoring antibodies to avian influenza virus subtype H5N1. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 1953-1955.
44. Beare A S and Webster R G: Replication of avian influenza viruses in humans. *Arch Virol* 1991; 119: 37-42.
45. Hinshaw V S, Webster R G, Easterday B C and Bean Jr W J: Replication of avian influenza A viruses in mammals. *Infect Immun* 1981; 34: 354-361.
46. Kida H, Ito T, Yasuda J, Shimizu Y, Itakura C and Shortridge K F et al.: Potential for transmission of avian influenza viruses to pigs. *J Gen Virol* 1994; 75: 2183-2188.
47. Lu B L, Webster R G and Hinshaw V S: Failure to detect hemagglutination-inhibiting antibodies with intact avian influenza virions. *Infect Immun* 1982; 38: 530-535.
48. Rowe T, Abernathy R A, Hu-Primmer J, Thompson W W, Lu X and Lim W et al.: Detection of antibody to avian influenza A (H5N1) virus in human serum by using a combination of serologic assays. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 937-943.
49. Katz J M, Lim W, Bridges C B, Rowe T, Hu-Primmer J and Lu X et al.: Antibody response in individuals infected with avian influenza A (H5N1) viruses and detection of anti-H5 antibody among household and social contacts. *J Infect Dis* 1999; 180: 763-1770.
50. Spackman E, Senne D A, Myers T J, Bulaga L L, Garber L P, Perdue M L, Lohman K, Daum L T., and Suarez D L.: Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 3256-3260.
51. Nicholson K G, Wood J M and Zambon M: Influenza. *Lancet* 2003; 362: 1733-1745.
52. Li K S, Guan Y, Wang J, Smith G J, Xu K M and Duan L et al.: Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. *Nature* 2004; 430: 209-213.
53. Puthavathana P, Auewarakul P, Charoenying P C, Sangsiriwut K, Pooruk P and Boonnak K et al.: Molecular characterization of the complete genome of human influenza H5N1 virus isolates from Thailand. *J Gen Virol* 2005; 86: 423-433.
54. www.medicalecology.org/diseases/influenza
55. Avian influenza: Is there a risk to water supplies? *Health Stream Article-Issue* 2005; 40-December.
56. Koopmans M, Wilbrink B, Conyn M, Natrop G, Van der Nat H and Vennema H et al.: Transmission of H7N7 avian influenza A virus to human beings during a large outbreak in commercial poultry farms in the Netherlands. *Lancet* 2004; 363: 587-593.
57. Mounts A W, Kwong H, Izurieta H S, Ho Y, Au T and Lee M et al.: Case-control study of risk factors for avian influenza A (H5N1) disease, Hong Kong, 1997. *J Infect Dis* 1999; 180: 505-508.
58. Hulse-Post D J, Sturm-Ramirez K M, Humberd J, Seiler P, Govorkova E A and Krauss S et al.: Role of domestic ducks in the propagation and biological evolution of highly pathogenic H5N1 influenza viruses in Asia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 10682-10687.
59. Tweed S A, Skowroski D M, David S T, Larder A, Petric M and Lees W et al.: Human illness from avian influenza H7N3, British Columbia. *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 2196-2199.
60. Chen H, Smith G J, Zhang S Y, Qin K, Wang J and Li K S et al.: Avian flu: H5N1 virus outbreak in migratory waterfowl. *Nature* 2005; 436: 191-192.
61. Stephenson I, Nicholson K G, Wood J M, Zambon M C and Katz J M: Confronting the avian influenza threat: vaccine development for a potential pandemic. *Lancet Infect Dis* 2004; 4: 499-509.
62. Wood J M and Robertson J S: From lethal virus to life-saving vaccine: developing inactivated vaccines for pandemic influenza. *Nat Rev Microbiol* 2004; 2: 842-847.
63. Webby R J, Perez D R, Coleman J S, Guan Y, Knight J H and Govorkova E A et al.: Responsiveness to a pandemic alert: use of reverse genetics for rapid development of influenza vaccines. *Lancet* 2004; 363: 1099-1103.
64. Li S, Liu C, Klimov A, Subbarao K, Perdue M L and Mo D et al.: Recombinant influenza A virus vaccines for the pathogenic human A/Hong Kong/97 (H5N1) viruses. *J Infect Dis* 1999; 179: 1132-1138.
65. Lipatov A S, Webby R J, Govorkova E A, Krauss S and Webster R G: Efficacy of h5 influenza vaccines produced by reverse genetics in a lethal mouse model. *J Infect Dis* 2005; 191: 1216-1220.
66. Takada A, Kuboki N, Okazaki K, Ninomiya A, Tanaka H and Ozaki H et al.: Avirulent Avian influenza virus as a vaccine strain against a potential human pandemic. *J Virol* 1999; 73: 8303-8307.
67. Schwartz B and Gellin B: Vaccination strategies for an influenza pandemic. *J Infect Dis* 2005; 191: 1207-1209.
68. Webby R J and Webster R G: Are we ready for pandemic influenza?. *Science* 2003; 302: 1519-1522.
69. Stohr K: The global agenda on influenza surveillance and control. *Vaccine* 2003; 21: 1744-1748.
70. Ferguson N, Cumming D A, Cauchemez S, Fraser C, Riley S and Meeyai A et. Strategies for containing an emerging influenza pandemic in Southeast Asia. *Nature* 2005; 437: 209-214.
71. Longini Jr IM, Nizam A, Xu S, Ungchusak K, Hanshaworakul W and Cummings D A et al.: Containing pandemic influenza at the source. *Science* 2005; 309: 1083-1087.