

Avian İnfluenza Tip A Virüsleri: Etiyoloji, Teşhis ve Korunma*

Banur BOYNUKARA Ziya İLHAN Abdalbaki AKSAKAL
İsmail Hakkı EKİN Timur GÜLHAN Hasan SOLMAZ

Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji AD, Van, Türkiye

Geliş tarihi: 16.03.2009

Kabul Tarihi: 24.03.2009

ÖZET

Avian influenza tip A virüs infeksiyonları Uluslararası Salgın Hastalıklar Ofisi (OIE) tarafından en tehlikeli insan ve hayvan hastalıkları grubunda sınıflandırılmaktadır. Son yüzyılda birçok infeksiyöz hastalık eradike veya kontrol edilmiş olmasına rağmen, özellikle H5N1 alt tipi başta olmak üzere avian influenza tip A virüs infeksiyonlarının 21. yüzyılın en önemli halk sağlığı problemlerinden biri olduğu kabul edilmektedir. Bu derlemede, yazılı kaynaklardaki son gelişmeler değerlendirilerek avian influenza tip A virüslerine ait bilgiler sunulmuştur.

Anahtar Kelimeler

Avian İnfluenza Tip A, Etiyoloji, Epidemiyoloji, Teşhis, Korunma

Avian Influenza Type A Viruses: Etiology, Diagnosis and Prophylaxis

SUMMARY

Avian influenza type A virus infections has been classified by the Office International Epizootica (OIE) as the most dangerous human and animal infections. Although during recent years many infectious diseases have been eradicated or controlled, avian influenza type A virus infections, H5N1 in particular, are still considered to be the most threatening infections for public health. In this review, the recent developments concerning avian influenza type A viruses are summarized.

Key Words

Avian Influenza Type A, Etiology, Epidemiology, Diagnosis, Prophylaxis

GİRİŞ

Son yüzyılda birçok infeksiyöz hastalık eradike veya kontrol edilmiş olmasına rağmen, özellikle H5N1 alt tipi başta olmak üzere avian influenza (AI) tip A virüs infeksiyonlarının 21. yüzyılın en önemli halk sağlığı problemlerinden biri olduğu kabul edilmektedir (Hampson 2006; Juckett 2006; Kida 2008). Sadece geçen yüzyılda AI virüsleri 4 farklı pandemi oluşturarak, tüm dünyada çok sayıda insan ve kanatlı hayvanın ölümüne neden olmuştur (Wu ve Yan 2006).

AI tip A virüs infeksiyonları Uluslararası Salgın Hastalıklar Ofisi (OIE) tarafından en tehlikeli insan ve hayvan hastalıkları grubunda sınıflandırılmaktadır. Hastalık 19. yüzyılın sonlarından itibaren bilinmekte olup, tavuk vebası ile ilgili ilk raporlar İtalyan Eduardo Perrencito tarafından sunulmuştur. Bunu takip eden 100 yıllık süreçte, zaman zaman patojenitesi yüksek avian influenza (HPAI) patotipindeki tip A virüslerinin neden olduğu çeşitli salgınlar yaşanmıştır. Bu salgınların bir kısmı etkili bir şekilde kontrol altına alınmış olmakla birlikte, birçoğu önemli ekonomik kayıplara neden olmuştur. 1959-1998 yılları arasında hastalığın öneminin 19. yüzyıla göre 100 kat arttığı ve bu süreçte 23 milyon kanatlının hastalıktan etkilendiği bildirilmektedir. 2000'li yıllara gelindiğinde ise salgınlar dikkat çekici bir düzeyde artış göstermiştir (Capua ve Alexander 2004; Hampson 2006; Knossow ve Skehel 2006).

Etiyoloji

Orthomyxoviridae familyasında yer alan influenza virüsleri pleomorfik, zarflı, negatif polariteli ve tek iplikli RNA karakterinde genetik madde taşıyan etkenlerdir. İnfluenza virüsleri iki önemli internal yapı olan nükleoprotein (NP) ve matriks (M) proteinlerindeki farklılıklara göre A, B ve C olmak üzere 3 tipe ayrılmaktadır. Doğal infeksiyonlarda insanlardan daha çok B ve C, ayı balıklarından B, domuzlardan ise C tipi izole edilmiştir (Palese ve Young 1982; Hampson 2006; Şanlıdağ ve ark 2006).

Kanatlılarda influenza A virüsleri sadece doğal infeksiyonlara neden olmaktadır. Bu virüsler; göçmen kuşlar, yabani kanatlılar, kafes kuşları, tavuk, ördek ve hindi gibi birçok kanatlı türü ile insan, domuz, kedi, köpek, at, mink ve balina gibi çeşitli memelilerden izole edilmiş olmakla birlikte, göçmen su kuşları etkenin doğal konakçısıdır (Juckett 2006; Capua ve Alexander 2007; Ivanov ve ark 2008).

H5N1 alt tipi başta olmak üzere, AI tip A virüs infeksiyonlarına karşı alınan önlemlerin etkisiz kalmasında, virüsün sahip olduğu yüksek mutasyon yeteneğinin katkısı büyüktür. İnfluenza A virüslerinin genomik RNA'sı oldukça küçük olup, 8 segmentten oluşmaktadır. Bunların da 11 farklı yüzeysel ve internal proteini [hemaglutinin (H), neuraminidaz (N), nükleoprotein (NP), polimeraz kompleks proteinler (PB1, PB2 ve PA), matriks 1 ve 2 protein (M1 ve M2) ve non-strüktürel protein (NS1)] kodladığı bildirilmektedir (Webster ve ark 1992; Tollis ve Di Tirani 2002; Knossow ve Skehel 2006; Rameix-Welti ve ark 2009). Bunlardan H, N ve M2 proteinlerinin yüzeysel; NP, PB1, PB2, PA ve M1'in ise internal proteinler oldukları ifade edilmiştir (Tollis ve Di Tirani 2002). Bir hücrede iki farklı AI virüsü üreyebilmekte ve bu esnada RNA parçaları virüsler arasında yer değiştirebilmektedir. Ortaya çıkan bu yeni partikül, kendine has özellikleri olan yeni bir influenza A virüsü alt tipi olarak fonksiyon yapabilmektedir. Birçok alt tipin (H5N1, H5N2 ve H3N2 gibi) bu şekildeki rekombinasyonlarla oluştuğu ifade edilmiştir (Webster ve ark 1992; Tollis ve Di Tirani 2002). Evcil kanatlılardan sıklıkla izole edilen H9N2 alt tipinin genetik olarak H5N1 ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Tollis ve Di Tirani 2002). Farklı konakçılardan izole edilen AI tip A virüsleri kullanılarak internal proteinleri kodlayan gen grubunun, filogenetik analizlerinde, tüm alt tiplerde fazla miktarda mutasyonların olduğu saptanmıştır. Bu mutasyonların daha çok H daha az olarak da N gen bölgesinde olduğu bildirilmektedir (Chen ve ark 2004; Muzaffar ve ark 2006; Wu ve Yan 2006; Capua ve Alexander 2007).

Yüzye glikoproteinlerinin antijenik yapıları dikkate alındığında influenza A virüsleri, H ve N alt tiplerine ayrılmaktadır. Günümüzde 16 H (H1-16) ve 9 N (N1-N9) alt tipi tanımlanmıştır. Her influenza A virüsü 1 adet H ve 1 adet N alt tipinin kombinasyonundan oluşmaktadır. H glikoproteinini konak hücre yüzeyindeki sialik asit yapılarına bağlanarak, virüsün konak hücrelere girişini sağlamaktadır. İnsan influenza virüsleri, α 2,6 zinciri ile galaktoza bağlı sialik asit rezidülerine bağlanırken; kanatlı ve equide orijinli izolatlar galaktoza α 2,3 zinciri ile bağlı sialik asit yapısına bağlanmaktadır. Kısaca; insan solunum yolu hücreleri temel olarak α 2,6 sialik asit-galaktoz zincir yapısı içerirken, kanatlı ve equidelerdeki konak hücreler α 2,3 zinciri içermektedir. Domuzlardaki epitel hücreleri ise α 2,6 ve α 2,3 zincirlerini birlikte barındırmaktadır. Bu nedenle domuzlar, hem insan hem de kanatlı orijinli suşlara duyarlıdır (Kida ve ark 1994; Şanlıdağ ve ark 2006).

Influenza A virüslerinin virulens özelliklerinin belirlenmesinde en önemli protein olan H yüzey molekülü, başlangıçta tek bir polipeptit ön molekülü olarak (HA0) sentezlenmektedir. Sentezlenen HA0 molekülü proteaz enzimleri tarafından HA₁ ve HA₂ alt ünitelerine ayrılmaktadır (Webster ve ark 1992; Tollis ve Di Tirani 2002). H molekül yoğunluğunun N molekülüne oranı 8:1 olup, bu moleküller koruyucu başışıklığın oluşmasında, viral partikülün en önemli antijenik determinantları olarak kabul edilmektedir (Wiley ve Skehel 1987). Diğer bir yüzey molekülü olan M2 proteini, iyon kanalı gibi görev yaparak, viral replikasyonun erken dönemlerindeki soyulma sırasında virüsün iç pH'sını düzenlemektedir. Bu fonksiyon amantadin ve rimantadin gibi antiviral ilaçlar tarafından bloke edilebilmektedir (Şanlıdağ ve ark 2006).

Influenza A virüsleri çeşitli fiziksel ve kimyasal ajanlara duyarlıdır. Etkenler, 56°C'de 3 saatte, 60°C'de ise 30 dakikada inaktif olmaktadır. Formalin, aldehit, gluteraldehit, hidrojen peroksit, sodyum hidroksit, iyot, fenol ve fenollü bileşikler başta olmak üzere, birçok kimyasal madde ve dezenfektana duyarlıdır (Şanlıdağ ve ark 2006; De Benedicts ve ark 2007).

Influenza virüslerinin izolasyonu embriyolu tavuk yumurtaları başta olmak üzere çeşitli kanatlılara ait embriyolu yumurtalar ile MDCK ve LLC-MK2 gibi hücre kültürlerinde yapılmaktadır (Arda ve ark 2002; Playford ve Dwyer 2002; Şanlıdağ ve ark 2006).

Günümüze kadar, çoğunluğu göçmen kuşlardan olmak üzere çeşitli kanatlı türlerinden virüsün toplam 144 farklı alt tipi izole edilmiştir (Olsen ve ark 2006; Swayne 2007; Capua ve Alexander 2008). Tarihsel olarak 1902 yılında ilk izole edilen AI virüs alt tipinin H7N7 olduğu bildirilmektedir (Tollis ve Di Tirani 2002).

Influenza A virüsleri çeşitli kanatlı türleri ve özellikle tavuklar için letalitesine göre iki patotipe ayrılmaktadır. Bunlar patojenitesi yüksek avian influenza (HPAI) ve patojenitesi düşük avian influenza (LPAI) virüsleridir (Swayne 2007). HPAI virüsleri, birçok organı etkileyerek sistemik infeksiyonla sonuçlanan, yüksek morbidite ve mortalite ile seyreden bir hastalık tablosu oluşturmaktadır. LPAI virüslerinin ise daha çok evcil kanatlılardan izole edildiği, hafif solunum sistemi infeksiyonu ve yumurta veriminde düşme ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (Tumpey ve ark 2005). H5 ve H7 alt tipleri, duyarlı kanatlılar için HPAI virüsleri olarak kabul edilmekte ve kanatlılarda %100 ölüm oluşturmaktadır. Ancak H5 ve H7 izolatların tamamının, tüm kanatlı hayvanlar için yüksek patojenik özellikte olmadığı bildirilmektedir (Tollis ve Di Tirani 2002; Capua ve Alexander 2004; Alexander 2008).

Son yıllarda AI tip A virüslerinin neden olduğu infeksiyonların artması, hastalığın tanımlanması ve bildiriyle ilgili kuralların yeniden düzenlenmesini gerekli kılmıştır. Daha önceki yıllarda sadece HPAI patotipindeki virüs infeksiyonları bildiri zorunlu iken, 2005 yılında OIE tarafından yapılan düzenleme ile o zamana kadar LPAI patotipinde olan H5 ve H7 alt tiplerinin neden olduğu infeksiyonlar da bildiri zorunlu hastalıklar kapsamına alınmıştır (Alexander 2008).

Birçok araştırmacı AI tip A virüslerinin mutasyon yeteneklerinin fazla olduğunu bildirmektedir (Webster ve ark 1992; Chen ve ark 2004; Muzaffar ve ark 2006). HPAI virüslerinin, LPAI virüslerinin bir mutasyonu (özellikle HA0 gen bölgesindeki mutasyon) veya genetik rekombinasyonu sonucu oluştuğu bilinmektedir (Rott 1992; Garcia ve ark 1996; Dugan ve ark 2008). Her alt tipin

gelecekte göstereceği mutasyonun farklı düzeylerde olacağı bildirilmektedir. Örneğin, mutasyon eğiliminin H2'den H4'e ve H5'den H7'ye doğru fazla olmayacağı, buna karşın H11'den H14'e doğru ise daha fazla olacağı ifade edilmektedir. Hemaglutinin alt tipleri (H1-H6) dikkate alındığında, mutasyona en yakın alt tipin H5 olduğu ifade edilmektedir (Wu ve Yan 2006; Dugan ve ark 2008).

H ve N gen bölgelerinin sekans analizleriyle izolatların tiplendirilmesi ve geçirdikleri mutasyonlar hakkında bilgiler elde edilebilmektedir (Dugan ve ark 2008). Doğal konakçılardan izole edilen AI tip A virüslerinin moleküler tekniklerle yapılan çalışmalarda, Avrasya (Eurasian lineage) ve Amerika (American lineage) olarak 2 gen grubuna ayrıldıkları saptanmıştır (Thomas ve ark 2005; Wu ve Yan 2006).

AI tip A virüsleri arasındaki mutasyon ve rekombinasyonu tetikleyen faktörlerin neler olduğu tam olarak açıklanamamakla birlikte (Capua ve Alexander 2007), kanatlı hayvanların geçirdiği seleksiyon ya da mutasyonun bu konuda etkili olduğu sanılmaktadır. LPAI ve HPAI virüsler kullanılarak yapılan deneysel çalışmalarda, LPAI virüsü ile infekte edilen bir konakçıda, etkenin bu konağa adapte olabilmesi ve HPAI patotipindeki bir virüse dönüşebilmesi için tek bir gen bölgesinde oluşan mutasyonun yeterli olduğu bildirilmektedir. Ortaya çıkan bu mutantın yeni infeksiyon ya da salgınlara neden olabileceğine dikkat çekilmektedir. Bu nedenle, AI tip A virüs infeksiyonlarıyla mücadelede, farklı canlılardan izole edilen suşların mutasyon düzeylerinin izlenebilmesi için veteriner ve beşeri hekimlikten elde edilen bilgilerin birlikte analiz edilmesinin, oldukça önemli olduğu bildirilmektedir (Garcia ve ark 1996; Tollis ve Di Tirani 2002; Thomas ve ark 2005; Capua ve Alexander 2008).

Son zamanlarda HPAI tip A virüs infeksiyonlarının evcil kanatlı hayvanlarda daha sık görülmesi ve etkenin bu hayvanlardan insanlara direkt bulaşması, bu infeksiyonlara olan ilginin artmasına ve böylece de konuyla ilgili bilimsel çalışmaların daha fazla yapılmasına neden olmuştur. Bu konuda bilim çevrelerini endişelendiren en önemli konu, Asya orijinli HPAI patotipindeki H5N1 alt tipinden köken alan ve insanlarda pandemilere neden olabilecek yeni bir izolatın ortaya çıkma tehlikesidir. Beklenen pandemi için üç koşuldan ikisinin gerçekleştiğine dikkat çekilmektedir. Bunlardan biri AI tip A virüsleriyle infekte olan insanlarda koruyucu düzeyde doğal aktif başışıklığın gelişmemesi, diğeri de özellikle Güney Doğu Asya Ülkeleri başta olmak üzere dünyanın bazı bölgelerinde etkenin artık endemik bir seviyeye ulaşmış olmasıdır (Chen ve ark 2005; Şanlıdağ ve ark 2006; Capua ve Alexander 2008).

İlk HPAI tip A virüs salgını H5 alt tipi tarafından 1959 yılında İskoçya'da yaşanmıştır. Bu tarihten sonra HPAI patotipindeki H5 veya H7 alt tipleri tarafından Güney Afrika (1961), İngiltere (1963, 1979, 1991), Kanada (1966), Avustralya (1976, 1985, 1992, 1995, 1997), Almanya (1979), İrlanda (1983-1984), Pensilvanya (1983-1984), Meksika (1993-1995), Pakistan (1994-1995), Hong Kong (1997) ve İtalya'da (1997-1998, 1999-2000) çeşitli salgınlar görülmüştür (Alexander 2000). 1959-2006 yılları arası dikkate alındığında, HPAI tip A virüslerinin 25 farklı salgına neden olduğu görülmektedir. Bu 47 yıllık zaman diliminin ilk 34 yılında (1959-1992) yaklaşık 3 yılda bir salgın görüldükçe (toplam 11 salgın), 1992-2006 yılları arasında ise her yıl bir salgın yaşanmıştır (Capua ve Alexander 2007; Alexander 2008).

Influenza A virüslerinin neden olduğu epidemiler incelendiğinde, daha çok varyant suşlar tarafından oluşturulduğu, salgınların ağırlıklı olarak Güney Yarım Küredeki ülkelerden başlayarak, dünyanın diğer bölgelerine yayıldığı ve hastalığın nem oranının yüksek olduğu, kış aylarında daha fazla görüldüğü dikkati çekmektedir. Aynı yıl içinde yaşanan epidemilerin alt tiplerin antijenik değişimlerinden, yaklaşık 10-50 yıllık periyotlarda görülen pandemilerin ise yeni alt tiplerin ortaya çıkmasından ileri geldiği bildirilmiştir (Hampson 2006; Alexander 2008; Capua ve Alexander 2008).

Epidemiyoloji

AI tip A virüslerinin kompleks biyolojilerinin anlaşılabilmesi için konakçı adaptasyonu, bulaşma, infektivite, doku tercihi, lezyonlar ve hastalık oluşturmaları gibi birçok kriter dikkate alınmaktadır (Swayne 2007).

Özellikle göçmen su kuşları (kaz ve kuğu gibi) başta olmak üzere diğer bazı yabani kanatlılar, gerek HPAI gerekse LPAI virüslerinin endemik taşıyıcısıdır (Tollis ve Di Tirani 2002; Tumpey ve ark 2005). İnfluenza A virüslerinin yabani kanatlılardan ilk izolasyonu *Sterna hirundo*'dan 1961 yılında yapılmıştır (Alexander 2000). AI tip A virüsleri taşıyıcı hayvanlara bulaştıktan sonra özellikle sindirim sistemi başta olmak üzere, solunum sistemine de lokalize olmaktadır. Etken; taşıyıcı, rezervuar ya da hasta hayvanların dışkı ve diğer sekresyonlarıyla fazla miktarda çıkarılarak; su, kafes, alet ve ekipmanlar, toz, toprak ve çevreyi yoğun olarak kontamine etmektedir (Tumpey ve ark 2005; Juckett 2006; Olsen ve ark 2006; Şanlıdağ ve ark 2006; Song ve ark 2009). Evcil kanatlılar başta olmak üzere diğer tüm kanatlı hayvanlara bulaşma direkt ve indirekt yollarla olmaktadır. Rezervuar veya taşıyıcı hayvanların bir bölgeden başka bir bölgeye ya da ülkeye ulaşmasıyla etken, geniş bir coğrafyaya yayılmaktadır (Capua ve Alexander 2007).

Dışkı, AI tip A virüslerinin duyarlı hayvanlara bulaşmasında en önemli araçlardan biridir. Etkenin, 10⁷ adet virüs partikülü içeren 1 gram dışkıda 44 günden fazla, düşük ısılardaki dışkı örneklerine ise en az 3 ay canlı kaldığı bildirilmektedir (Tumpey ve ark 2005; Şanlıdağ ve ark 2006; Capua ve Alexander 2007). Dışkı ile kontamine olmuş içme suları, yumurta, kafes ve diğer ekipmanlarla indirekt bulaşma olmaktadır. Suyun pH'sı, tuz oranı ve sıcaklığı influenza A virüslerinin aktivitelerini fazlaca etkilemektedir. İnfluenza virüsleri göl sularında 22°C'de 4 gün, 0°C'de ise 30 günden fazla canlı kalabilmektedir. Sudaki virüsün titreleri dikkate alındığında; 17°C'de 21-34 günde, 28°C'de ise 5-17 günde azalmaların olduğu saptanmıştır. Hayvan yoğunluğunun fazla olduğu sulak alanlarda, özellikle de aynı suyu içen hayvanlar arasında etken, fekal-oral yolla kolaylıkla bulaşabilmektedir. Yapılan çalışmalarda sulak alanlarda yaşayan kuşlarda prevalansın çok yüksek olduğu tespit edilmiştir (Stallknecht ve ark 1990; Delogu ve ark 2003; Olsen ve ark 2006; Şanlıdağ ve ark 2006). Sadece ördeklerde olmak üzere, bazı yıllarda LPAI virüslerinin kış aylarında prevalansı artabilmektedir. Bu da, bulaşmanın sadece su ile olduğu durumlarda, kış süresince suların donması ve dolayısıyla virüsün canlılığını uzun süre devam ettirebilmesi ile açıklanmıştır (Webster ve ark 1992). AI tip A virüslerinin kanatlı hayvanlara bulaşmasında insan ve fomitler de önemli roller üstlenmektedir (Tollis ve Di Tirani 2002).

Çok sayıda araştırmacı, *Anseriformes* takımında bulunan *Anatidae* familyası ile *Charadriiformes* takımında bulunan yabani kuşların, influenza A virüslerinin doğal konakçıları olduğunu belirtmektedir. Göçmen su kuşlarından H5 ve H7 alt tipleri de dahil olmak üzere 16 farklı H alt tipinin izole edildiği ve bu hayvanların AI tip A virüsleri için en önemli rezervuarlar oldukları bildirilmesine karşın (Capua ve Alexander 2004; Şanlıdağ ve ark 2006; Webster ve ark 2006; Kıda 2008), su kuşlarının AI tip A virüs alt tiplerinin tamamı için aynı derecede rezervuar olmadıklarına dikkat çekilmektedir (Alexander 2000; Capua ve Alexander 2008). Kuşlar dünyanın kurak bölgeleri hariç her tarafa yayılmış olup, kıtalararası uçabilmektedir. AI tip A virüslerinin ülkeler ve kıtalararası yayılması kuşlar aracılığıyla olmaktadır (Alexander 2000; Delogu ve ark 2003; Olsen ve ark 2006).

Özellikle tavuk ve hindiler başta olmak üzere, evcil kanatlı hayvanlar HPAI ve LPAI virüsleri tarafından infekte edilebilmektedir. Evcil kanatlılara etkenin bulaştırılmasında, primer taşıyıcı olan ördeklerin önemli rolü bulunmaktadır. Memeli hayvanların ise kanatlılar için potansiyel hastalık kaynakları oldukları bildirilmektedir (Wood ve ark 1996).

LPAI H9N2 ile HPAI H5N1 alt tiplerinin çeşitli kanatlı hayvanlarda, özellikle 2003 yılından itibaren oluşturdukları infeksiyonlar ve izolasyon oranları dikkate alındığında, her iki etkenin yayılma özellikleri ve epidemiyolojilerinin diğer alt tiplerden farklı bir seyir gösterdiğine dikkat çekilmektedir (Capua ve Alexander 2007). Evcil kanatlılardan sıklıkla izole edilen H9N2 alt tipinin, genetik olarak H5N1 ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (Tollis ve Di Tirani 2002). Her iki alt tip potansiyel zoonoz ajan olarak kabul edilmekte ve bunların dünyanın birçok bölgesinde endemik olarak buldukları rapor edilmektedir (Capua ve Alexander 2008). Hong Kong'da 1999 yılında iki insandan ilk kez H9N2 alt tipinin izole edilmesi ve son zamanlarda bu virüsün özellikle Pakistan, İran, Çin, Hindistan ve bazı Asya ülkelerinde geniş çaplı ve önemli kayıplara neden olan infeksiyonlardan sorumlu tutulması, bu

durumu destekler niteliktedir (Alexander 2008; Nagarajan ve ark 2009; Perelman 2009).

H5N1'in göçmen su kuşları tarafından taşınmasıyla ilgili olarak, bu hayvanların bazı türlerinin (*Anas platyrhynchos*, *Anas falcata*, *Anas poecilorhyncha*, *Aythya ferina*, *Passer montanus* ve *Podiceps cristatus* gibi) asemptomatik taşıyıcılık yaptıkları saptanmıştır (Feare ve Yasue 2006). Genetik olarak bu izolata benzer oldukları saptanan çeşitli H5N1 suşları; Güney Kore, Vietnam, Japonya, Tayland, Kamboçya, Laos, Endonezya, Malezya, Kazakistan, Moğolistan, Romanya, Hırvatistan, Yunanistan, Bulgaristan, Almanya ve Fransa'daki değişik klinik vakalardan izole edilmiştir. Ülkemizde 2006 yılı Ocak ayında, Ağrı-Doğubeyazıt'ta kuş gribinden ölen insanlara ait H5N1 izolatlarının yapılan filogenetik analizlerinde, bunların da söz konusu suşa oldukça benzer oldukları bildirilmiştir (Akpınar ve Saatci 2006). Günümüzde; HPAI patotipindeki bu H5N1 alt tipinin, Asya'nın güney doğusunda endemik bir seyir gösterdiği ve bu bölgeden orijin alan bir pandemiye neden olabileceğine dikkat çekilmektedir (Chen ve ark 2005). Çünkü virüs, yüksek mutasyon yeteneği sayesinde bazı memeli hayvanlar ve insanlara adaptasyon yeteneğini gün geçtikçe artırmaktadır (Şanlıdağ ve ark 2006).

1997 yılına kadar H5 virüsünün insanlarda infeksiyona neden olarak ölüm oluşturduğuna dair bir kanıt bulunmamaktadır (Webster ve ark 2006). Bu tarihten itibaren, virüsün konakçılarda infeksiyon oluşturma bakımından mutasyon geçirerek birçok yeni memeli ve kanatlı türünde infeksiyon oluşturmaya başladığı düşünülmektedir (Alexander 2007). Virüs, insanlara genellikle infekte kuşlarla direkt temas veya kuşlar tarafından kontamine edilen yüzeylerle indirekt olarak bulaşmaktadır (Rott 1992). Hong Kong'da 1997 yılında 3 tavuk çiftliğinde başlayan ve hayvanların %75'inin (yaklaşık 6500 tavuk) ölümüne neden olan H5N1 izolatının insanlara da bulaşarak, 18 insandan 6'sının ölümüne neden olduğu rapor edilmiştir (Chen ve ark 2004). Bu durum, AI tip A virüslerinin kanatlı hayvanlardan insanlara bulaşmasının ilk kez laboratuvar bulgularıyla doğrulanmış olması nedeniyle tüm kamuoyu dikkatinin influenza virüs infeksiyonları üzerine çekilmesine neden olmuştur (Wu ve Yan 2006). Vietnam, Tayland ve Kamboçya'da 2003 yılında 130'dan fazla insanda H5N1 alt tipine bağlı infeksiyon teşhisi konulmuş ve bunların yarısından fazlasının öldüğü rapor edilmiştir (Webster ve ark 2006). 1959 yılından 2008 yılına kadar Türkiye'deki 4 vaka da dahil olmak üzere dünyada influenza virüs infeksiyonu teşhisi konulan toplam 417 kişiden 179'u (%42.9) hastalıktan ölmüştür. İnsanlardan H5N1 başta olmak üzere H7N2, H7N3, H7N7 ve H9N2 alt tipleri izole edilmektedir (Capua ve Alexander 2008; Morgan ve ark 2009).

Son yıllarda AI tip A virüslerinin evcil kanatlı hayvanlardan insanlara direkt olarak bulaştığı tespit edilmiştir (Tollis ve Di Tirani 2002; Hampson 2006; Juckett 2006). İnfluenza A virüslerinin insanlara bulaşması bakımından, tavukların ara konakçı olabilecekleri, yumurta ile virüsün taşınma ihtimalinin mutlaka dikkate alınması gerektiği, yumurtlamadan önce ve sonra yumurtalarını AI virüsleri ile kontamine olabileceği bildirilmiştir (Matrosovich ve ark 1999).

Domuzların kanatlı orijinli AI tip A virüslerinin insanlara bulaşması bakımından ara konakçı olarak rol oynadığı bildirilmektedir (Kıda ve ark 1994; Juckett 2006; Webster ve ark 2006). Yapılan deneysel çalışmalarda domuzların çeşitli alt tiplerle infekte olduğu (Kıda ve ark 1994) ve bu hayvanlardan H4N6, H9N2, H1N1 ve H3N2 gibi alt tiplerin izole edildiği ifade edilmiştir. Domuzlardan çok farklı alt tipler izole edildiğinden bu hayvanlara influenza virüsleri bakımından "kokteyl kabı" yakıştırması yapılmıştır. Gelecekte insanlarda oluşacak muhtemel salgınlarının, domuzlardan bulaşan AI tip A virüsleriyle olabileceğine dikkat çekilmektedir (Tollis ve Di Tirani 2002).

İnfluenza A virüslerinin henüz insandan insana bulaşmadığı, ancak gelecekte virüsün insanlara adapte olacak şekilde mutasyon geçirerek, insandan insana bulaşabileceğinden endişe edilmektedir (De La Barrera ve Reyas-Teran 2005; Webster ve ark 2006). Oluşan her yeni insan vakasında etken, insandan insana geçiş yeteneğini geliştirme fırsatı bulmaktadır. HPAI H5N1 virüsü, insandan insana bulaşma konusunda diğer alt tiplerden farklı bir durum arz etmektedir. Bu alt tip, diğerlerine göre mutasyona daha meyillidir ve kanatlı orijinli suşlara ait gen parçalarını daha sorunsuz bir şekilde kabul edebilmektedir (Şanlıdağ ve ark 2006).

H5N1 patotipindeki Asian H5N1 alt tipinin; epidemiyolojik, ekolojik, kültürel, sosyal ve ekonomik olarak farklı olan 3 kıtadaki insan ve çeşitli hayvanlarda görülmesi, bu görüşü desteklemektedir (Capua ve Alexander 2007).

Deneysel çalışmalarda inkübasyon süresi değişmekle birlikte, duyarlı hayvanlardaki doğal infeksiyonlarda bu süre yaklaşık 2-4 gündür. AI tip A virüsleri tarafından oluşturulan infeksiyonların şiddeti ve semptomlar; etkenin alt tipine, konakçının yaşına, türüne, bakteriyel (*Pasteurella* spp, *Mycoplasma* spp, *Escherichia coli* gibi) ve viral etkenler (infeksiyöz bronşitis virüsü, avian pneumovirüs ve newcastle hastalığı virüsü gibi) tarafından infekte olup olmadığına, bunlara karşı bağışıklık durumuna, immun yetmezlik haline ve çok çeşitli çevresel faktörlere (amonyak fazlalığı, toz, sıcak veya soğuk hava gibi) göre değişmektedir (Arda ve ark 2002; Alexander 2008; Kida 2008; Song ve ark 2009).

Klinik ve nekropsiz bulguları

H5N1 virüsleri duyarlı kanatlılarda birkaç gün içinde %100 ölüm oluşturabilmektedir. Önemli klinik bulgular arasında aşırı gözyaşı ve burun akıntısı, sinüzitis, baş bölgesi ve yüzde ödem, yumurtanın iç ve dış kalitesinin bozulması ve yumurtlamamanın tamamen durması sayılabilir. Bunlara ek olarak özellikle baş bölgesi ve vücudun diğer bölgelerinde siyanoz ile birlikte deride ödem, sinüsler ve periorbital dokularda şişlik, burun ve gözyaşı akıntısı, gözlerin tamamen kapanması, şiddetli solunum sistemi semptomları, ishal ve nadiren sinirsel belirtiler görülmektedir. İnfeksiyonun başlangıcından birkaç gün sonra ortaya çıkan glottis ödemi, asfeksiye bağlı ölüm oluşturabilmektedir. Akut dönemi atlatan hayvanlarda dönme, ataksi, yürümeye güçlük ve ayakta duramama gibi sinirsel bulgular dikkati çekmektedir (Arda ve ark 2002; Tollis ve Di Tirani 2002; Alexander 2008).

Kanatlı hayvanlardaki AI tip A virüs infeksiyonlarında dikkati çeken en önemli nekropsiz bulguları arasında, ölüm sertliğinin çabuk şekillenmesi ve deri altında açık sarı renkte berrak bir sıvının bulunması sayılabilir (Arda ve ark 2002). Karkas şiddetli septisemiye bağlı olarak kırmızı renktedir. Deri, derialtı, kalp, karaciğer, akciğer, böbrek ve dalak gibi çeşitli iç organlarda hemorajik bölgeler dikkati çekmektedir. H5N1 patotipindeki H5N1 alt tipi ile doğal infekte kaz, ördek, kuğu, flamingo, balıkçıl ve karabaş martı gibi yabani su kuşlarına ait materyallerin makroskopik incelenmesinde; hayvanların bir kısmının akciğerlerinde ödem, hava keselerinin duvarında kalınlaşma, dalak, karaciğer ve böbreklerde büyüme, iç organlarda ve akciğerde kanama ve asites belirlenmiştir. Ancak, perakut seyreden ve H5N1 patotipindeki alt tiplerin neden olduğu infeksiyonlarda bu bulgular görülmez (Arda ve ark 2002; Chen ve ark 2004; Swayne 2007).

H5N1 ve LPAI virüsleri, infekte ettikleri hayvanlarda farklı dokulara affinite göstermeleri nedeniyle değişik lezyonlar oluşturmaktadır. H5N1 grubundaki etkenler deri, beyin, adrenal bezler, pankreas, kalp ve diğer iç organlarda yangı, hemoraji ve nekroz ile karakterize lezyonlara neden olmaktadır. LPAI virüsleri ise hafif veya orta derecede solunum, ürogenital ve enterik infeksiyonlar oluşturmakla birlikte, sekonder infeksiyonlar bu tablunun ağırlaşmasına neden olabilmektedir (Mo ve ark 1997).

H5N1 virüsleri, infekte bir hayvandan duyarlı bir hayvana, LPAI virüslerine göre daha az bulaşmaktadır. Bu durum, H5N1 tip A virüsleriyle infekte olan hayvanların çok kısa sürede ölmeleri ve etkeni uzun süre etrafa bulaştıramamalarıyla açıklanmıştır (Mo ve ark 1997).

Teshis

Yapılan deneysel çalışmalar, influenza A virüslerinin canlılıklarının sıcaklık, pH ve ortamın tuz oranıyla direkt ilişkili olduğunu göstermiştir (Stallknecht ve ark 1990; De Benedictis ve ark 2007). Bu nedenle gerek AI virüs infeksiyonlarının laboratuvar teshisi, gerekse değişik klinik materyallerdeki virüslerin ortaya konulması bakımından transport mediumların bileşimi, pH'si, tuz oranı ve ortamın ısısı oldukça önem arz etmektedir. Konuyla ilgili çalışmalar incelendiğinde farklı transport mediumların kullanıldığı görülmektedir. Transport mediumlarda çözücü solüsyon olarak; Hank balanslı tuzlu su solüsyonu, hücre kültürü besiyeri, fosfat tamponlu tuzlu su, triptoz fosfat besiyeri ve beyin kalp infüzyon sıvı besiyeri gibi oldukça farklı vasatlar kullanılmaktadır. Transport mediumlara geniş spektrumlu antibiyotik ve antimikotik ajanların katılması

tavsiye edilmektedir. Materyal alımında ahşap veya polyester eküvyonlar tercih edilmektedir (Munster ve ark 2005; Şanlıdağ ve ark 2006). Bunların bir kısmı ticari (Munster ve ark 2005; Runstadler ve ark 2007), çoğunluğu ise manual olarak hazırlanmaktadır (Widjaja ve ark 2004; Gaidet ve ark 2007).

Yazılı kaynaklar incelendiğinde, AI tip A virüsleriyle ilgili gerek epidemiyolojik, gerekse teşhise yönelik çalışmaların çoğunda materyal olarak dışkı ya da kloakal svap örneklerinin kullanıldığı görülmektedir (Chen ve ark 2005; Munster ve ark 2005; Gaidet ve ark 2007; Runstadler ve ark 2007). Dışkıda bulunan influenza A virüslerinin canlı kalabilme süreleri virüsün tipine, dışkının fiziksel durumuna ve ortamın ısısına göre değişmektedir. Canlı hayvanlardan materyal olarak üst solunum yollarına ait nazal ve tracheal örnekler kullanılmaktadır. Ölü hayvanlardan ise bu materyallerle birlikte akciğer, karaciğer, kalp, dalak, böbrek ve beyin incelenilmektedir. Diğer yandan, çevresel örnekler de izolasyon amacıyla kullanılmaktadır. Kısa süre içinde analiz edilmeyecek materyallerin -70°C veya daha düşük ısı derecelerinde saklanması tavsiye edilmektedir (Şanlıdağ ve ark 2006). Pensilvanya'da 1983-1985 yılları arasında görülen ve H5N2 alt tipinin neden olduğu salgında, hindilere ait dışkı örnekleri 4°C'de bekletildiğinde 35 gün, 25°C'de bekletildiğinde 2 gün etkenin infektivitesini koruduğu, nemli ortamlar ve düşük ısı derecesindeki dışkıda 105 gün canlı kaldığı bildirilmiştir. Bir gram dışkı örneğinde 10⁷ adet infektif virüs partikülünün olması halinde etkenin 45 günden daha uzun bir süre canlılığını koruduğu belirtilmiştir. Virüsün direkt güneş ışığına maruz bırakılan dışkı örneklerinde 32-35°C'de 30 dk, 25-32°C'de ise 4 günde inaktive olduğu ifade edilmiştir. Ortam ısısının 4 ile 37°C arasında kalması bazı AI tip A virüslerinin suda 200 günden daha fazla canlı kaldıkları rapor edilmiştir (Stallknecht ve ark 1990; De Benedictis ve ark 2007).

AI tip A virüs infeksiyonu olan hayvanlardan sekonder etken olarak farklı bakteri ve virüsler izole edilmektedir. Bakteriyel etkenler arasında daha çok *Escherichia coli*, *Riemerella antipestifer*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Pasteurella multocida*, *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*, viral etkenler arasında ise newcastle hastalığı virüsü, infeksiyöz bronşitis virüsü ve avian pneumovirüs sayılabilir (Capua ve ark 2000; Gronosova ve ark 2008).

Gerek Avrupa Birliği Yönetmeliği gerekse OIE, AI tip A virüs infeksiyonlarının teşhisinde öncelikli olarak konvansiyonel virolojik yöntemleri önermekte ve bunları "gold-standart" olarak kabul etmektedir. Konvansiyonel yöntemlerin dezavantajları arasında pahalı olmaları, laboratuvar çalışmaları sırasında daha çok önlem almayı gerektirmeleri, özellikle bir salgın esnasında kısa sürede teşhise imkan vermemeleri sayılabilir (Playford ve Dwyer 2002; Alexander 2008).

Son zamanlarda çeşitli klinik materyallerde direkt virüs RNA'sını belirlemeye yönelik birçok metod geliştirilmiştir. AI tip A virüslerinin kısa sürede ve doğru bir şekilde teşhis edilmesi, gerekli önlemlerin bir an önce alınarak insanlar için tedaviye başlanması, sanitasyon aşamasına geçilmesi ve belki de en önemlisi infeksiyonun yayılmasına fırsat vermeden kontrol altına alınması bakımından, bu metodların geliştirilmiş olması son derece önemlidir (Playford ve Dwyer 2002; Alexander 2008; Morgan ve ark 2009).

Farklı PCR (one-step, two step, nested ve multiplex-PCR gibi), ekstraksiyon (fenol kloroform ve farklı ticari kitlerle yapılan ekstraksiyon yöntemleri gibi) ve görüntüleme (agaroz jel elektroforezis ve prob hibridizasyon gibi) yöntemleri uygulanarak yapılan çalışmalarda, influenza A virüslerinin M, H, NP ve NS bölgelerine spesifik farklı primerler kullanılmaktadır (Wright ve ark 1995; Playford ve Dwyer 2002; Ellis ve ark 2004; Widjaja ve ark 2004). Tercih edilen primerlere göre etkenler, tip ya da alt tip düzeyinde identifiye edilebilmektedir (Playford ve Dwyer 2002). Son yıllarda birçok laboratuvar reverse transcriptase-polymerase chain reaction (PCR) ve real-time PCR (RT-PCR) ve real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RRT-PCR) metodlarını daha çok tercih etmektedir. Doğru primerler kullanıldığında, real-time esasına dayanan metodlarla çeşitli klinik materyallerde direkt olarak genomik RNA kısa sürede ortaya konulabilmekte, alt tiplerin ayrımları yapılabilmekte ve elde edilen c-DNA örnekleri sekans analizinde kullanılabilmektedir (Starick ve ark 2000; Alexander 2008). Teshis amacıyla kullanılan

RT-PCR yönteminin ise AI tip A virüslerinin genomik materyalinin saptaması bakımından duyarlı ve spesifik bir metod olduğu bildirilmektedir (Starick ve ark 2000; Spackman ve ark 2002; Runstadler ve ark 2007). Ayrıca, virüs izolasyonunun bölgesel referans laboratuvarlarda yapılma zorunluluğu bulunmaktadır. Klinik materyallerin durumuna da bağlı olarak RT-PCR yönteminin sensitivitesinin "gold-standart" olarak kabul edilen klasik virüs izolasyon yöntemlerinden daha yüksek olduğu ifade edilmektedir (Wright ve ark 1995; Playford ve Dwyer 2002; Ellis ve ark 2004). Diğer yandan materyallerin kalitesi, transport mediumun niteliği ve taşıma şartları gibi durumlar RT-PCR için kültür yöntemine göre daha az önem arz etmektedir. Değişik klinik materyallerde bulunan influenza A virüsleri, RT-PCR ile kültür yöntemine göre daha uzun süre bekletilmiş materyallerde pozitif sonuç vermektedir. Bu durum, viral RNA'nın kültür edilebilen virüs partiküllerinden daha dayanıklı olması ile açıklanmıştır (Cherian ve ark 1994). RRT-PCR yönteminin sensitivitesinin, H5N1 alt tipine ait virüs RNA'sını belirlemeye yönelik diğer ticari hızlı teşhis yöntemlerinden daha yüksek olduğu ve yaklaşık 4 saatte sonuç alındığı bildirilmektedir (Juckett 2006).

AI virüs infeksiyonlarıyla ilgili olarak çeşitli materyallerdeki viral antijenleri kısa sürede saptayabilen farklı hızlı test kitleri geliştirilmiştir. Bunlar daha çok insanlara yönelik olarak kullanılmaktadır. Bu ticari kitler tüm influenza virüs antijenlerini saptayabilmekle birlikte, rutin teşhiste daha çok H5 ve H7 alt tipi için kullanılmaktadır (Yuen ve ark 1998; Alexander 2008). Bu kitler son yıllarda giderek artan bir oranda çeşitli kanatlı türlerinde de kullanılmaya başlamıştır. Günümüzde özellikle ABD'de kanatlı hayvanlardaki AI tip A virüslerinin saptanmasına yönelik olarak çok ticari Directigen Flu A kiti kullanılmaktadır (Booth ve ark 2006). Kit, nükleoproteine spesifik monoklonal antikorlar içerdiğinden, influenza A virüslerini saptayabilmektedir. Bu kit, memelilerdeki infeksiyonları belirlemeye yönelik olarak geliştirilmesine ve bazı türlerde sensitivitesinin farklılık göstermesine rağmen, kümes hayvanları dahil bir çok farklı kanatlı hayvan türünde tercih edilmektedir. Bu ve diğer antijen saptamaya yönelik kitlerin en önemli avantajları, AI tip A virüslerini yaklaşık 10-15 dakika içinde ortaya koyabilmeleridir. En önemli dezavantajları ise, virüsleri alt tip düzeyinde tanımlama imkanı olmaması, pahalı olmaları ve sensitivitelelerinin bireysel değerlendirmelerde düşük olmasıdır (Alexander 2008).

Çeşitli klinik materyallerde, viral antijenlerin hızlı tanısı amacıyla immunofloresans esasına dayanan testler de kullanılmaktadır. Bu yöntemler sensitivitelelerinin düşük olmasının yanı sıra, influenza tip A ve tip B virüslerini de ayıramamaktadır (Yuen ve ark 1998; Playford ve Dwyer 2002; Alexander 2008; He ve ark 2009).

AI tip A virüslerinin indirekt teşhisinde çeşitli serolojik testlerden yararlanılmaktadır. Bu amaçla daha çok hemagglütinasyon (HA), hemagglütinasyon inhibisyon (HI), neuraminidaz inhibisyon (NI), agar jel presipitasyon (AGP), virüs nötralizasyon (VN), çeşitli ELISA yöntemleri ve floresans antikor (FA) teknikleri kullanılmaktadır. İzolatların identifikasyon ve tiplendirilmesinde referans test olarak HI ve NI testlerinden yararlanılmaktadır (Alexander 2000; Akpınar ve Saatci 2006; Capua ve Alexander 2007). Tüm influenza virüsleri, benzer matriks ve nükleokapsid antijenlerine sahip olduklarından, AGP ve FA testlerinin de aralarında bulunduğu çeşitli testlerle bu antijenlere karşı sentezlenen antikorlar saptanabilmektedir (Cherian ve ark 1994; Alexander 2008). İzolatların tiplendirilmesinde en çok HI testi kullanılmaktadır. Tavuk, koyun ve ferret (dağ gelinciği) gibi hayvanlarda hazırlanan spesifik anti-serumlar kullanılarak yapılan HI testinin referans tiplendirme metodu olduğu kabul edilmektedir (Playford ve Dwyer 2002).

Tedavi

Kanatlı hayvanlardaki AI tip A virüs infeksiyonlarının kemoterapötik maddelerle tedavileri önerilmemektedir (Arda ve ark 2002). Tedavi insanlarda uygulanmaktadır. Bu amaçla daha çok neuraminidaz inhibitörü olarak fonksiyon yapan oseltamivir (Tamiflu) ve zanamivir (Relenza) kullanılmaktadır. Ancak bu ilaçların, hastalığın ilk 48 saati içinde kullanılması tavsiye edilmektedir. Oseltamivir günde 2 kez, 75 mg dozunda tedavi amacıyla veya aynı dozda 7-10 gün profilaksi amacıyla

kullanılmaktadır (Playford ve Dwyer 2002; Juckett 2006; Morgan ve ark 2009).

Korunma

AI tip A virüs infeksiyonlardan korunmada, virüsle direkt veya indirekt temasın önlenmesi, bir salgını takiben eğer mümkünse sürünün ortadan kaldırılmasıyla eradikasyona gidilmesi önem arz etmektedir (Arda ve ark 2002). Bununla birlikte, hastalık çıkan bölgelerde etkeni almamış hayvanlar da dahil olmak üzere tüm kanatlıların toplu olarak imha edilmesi, son zamanlarda etik olarak sorgulanmaya başlamış ve halihazırda uygulanan kontrol programlarının düzenlenmesini gerekli kılmıştır. Bu duruma örnek olarak, 1997 yılında Hong Kong'da yaşanan ve 6 kişinin ölümüne de neden olan HPAI H5N1 salgınından sonra, Hong Kong'daki tüm evcil kanatlıların imha edilmesi gösterilebilir (Webster ve ark 2006). Bu noktadan hareketle, AI tip A virüslerinin evcil kanatlı hayvanların yaşam alanlarına gerekli biyogüvenlik önlemleri alınarak hiç bulaştırılmamasının, en önemli koruma yöntemi olduğu bildirilmektedir (Thomas ve ark 2005; De Benedictis ve ark 2007). Hastalık çıkan bir bölgede genel idari ve lokal hijyenik önlemlerin birlikte uygulanması gerekmektedir. Etken giyecekler, yumurta yuvalarına, araç-gereçlere ve nakil araçlarına bulaşabilmektedir. Bu nedenle, hastalık çıkan küçük bir aile işletmesinde veya büyük bir entegre ortamın ve her türlü eşyanın kontamine olduğu düşünülmelidir. Bu durumda işletmedeki tüm yüzeyler ve önemli eşyalar iyice temizlenip, sonra etkili kimyasallarla dezenfekte edilmelidir. Bazı malzemeler ise temizlenip, dezenfektanlarla muamele edildikten sonra işletmeden uzaklaştırılarak imha edilmelidir. Ölü, enfekte ve taşıyıcı hayvanlar ile o bölgede bulunan tüm kanatlılar CO ve CO₂ gazı ile ötenazi edilmelidir (Arda ve ark 2002; Van Den Berg ve Houdart 2008). CO ve CO₂ gazları Belçika'da 2003 yılında, HPAI H7N7 alt tipinin neden olduğu epidemide kullanılmıştır (Van Den Berg ve Houdart 2008). Dezenfeksiyon amacıyla formalin ve iyot bileşikler başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Şanlıdağ ve ark 2006).

AI virüs infeksiyonlarına karşı korunmada, en ekonomik yolun aşılama olduğu bildirilmektedir (Fasina ve ark 2007). Korunma, hem humoral hem de hücresele bağışıklıkla sağlanmaktadır. Etkenin H, N, M1, M2 ve NP proteinlerine karşı nötralizan antikorlar oluşmakla birlikte, korunmada esas rolü H ve N moleküllerine spesifik antikorlar üstlenmektedir. Korunmada en etkili yolun inaktif aşılarla aşılama olduğu ve özellikle HPAI patotipindeki virüs infeksiyonlarına karşı etkili bir aşı geliştirilmesinin öncelik arz ettiği bildirilmektedir (Hampson 2006; Szécsi ve ark 2006). Diğer yandan hastalığı geçiren hayvanlar uzun bir süre bağışık kalmakta ve aynı virüs alt tipi ile re-infeksiyona karşı dirençli olmaktadır (Arda ve ark 2002).

AI tip A virüslerine karşı gelişen humoral immün yanıtın gücü hayvanın türüne bağlı olarak değişimle birlikte, tavukların diğer evcil kanatlı türlerinden daha güçlü bir immün yanıt oluşturdukları bildirilmektedir (Brugh ve ark 1979; Tollis ve Di Tirani 2002). Yapılan deneysel çalışmalarda, alt tipler arasındaki çapraz korumadan daha çok, her alt tipin homologu olan izolata karşı eprüvasyonda koruyucu düzeyde bir bağışıklığın geliştiği, diğer alt tiplere karşı ise koruyuculuğu olmayan humoral bir yanıtın oluştuğu bildirilmiştir (Stone 1987; Tollis ve Di Tirani 2002). Bu durum, aşı geliştirme çalışmalarında dikkate alınması gereken ciddi bir ayrıntı olarak günümüzde de önemini korumaktadır (Tollis ve Di Tirani 2002).

İnfluenza A virüslerine karşı gelişen hücresele bağışıklıkla ilgili yeterli sayıda çalışma bulunmamaktadır. Farelerde yapılan deneysel çalışmalarda hem H hem de N moleküllerinin hücresele immün yanıtı uyardıkları bildirilmiştir. Effektör hücre olarak sitotoksik T lenfositlerinin görev aldığı hücresele korunmada, LPAI virüslerinin yayılmalarının başarılı bir şekilde engellendiği bildirilmekle birlikte, aynı durumun HPAI virüsleri için geçerli olmadığına dikkat çekilmiştir (Tollis ve Di Tirani 2002). Soe ve Webster (2001), humoral bağışıklıktan farklı olarak, alt tipler arasında hücresele bağışıklık mekanizmasıyla gerçekleşen bir çapraz korumanın olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar, H9N2 alt tipiyle tavuklarda yaptıkları deneysel çalışmada, eprüvasyondan sonra hayvanlarda H5N1 alt tipinin oluşturduğu klinik semptomlara benzer semptomların oluşmadığını, ancak hayvanların dışkılarıyla virüs saçmaya devam ettiklerini bildirmişlerdir.

AI tip A virüs infeksiyonlarından korunmada en etkili yolun aşılama olduğu bildirilmekle birlikte (Szécsi ve ark 2006), aşı ile korumanın en önemli dezavantajları arasında, alt tipler arasında yeterli düzeyde çapraz korumanın olmaması ve hastalığın indirekt tanısı bakımından doğal infekte ve aşılu hayvanların ayırımının yapılamaması sayılabilir (Tollis ve Di Tirani 2002; Capua ve Alexander 2004; Capua ve Alexander 2007; Perelman 2009). Aşılamanın gerekli olmadığını düşünen bazı araştırmacılar farklı gerekçeler ileri sürmektedir. Örneğin, HPAI patotipindeki bir alt tipe karşı aşılama tavuklara canlı bir influenza virüsü bulaştığında, hayvanın vücudunda etkenler arasında gerçekleşecek genetik madde transferiyle yeni alt tipler oluşacak ve bunlar da dışkı ile etrafa yayılabilecektir. Bu durum, geniş bölgelerde aşı uygulamayı sınırlandıran olumsuzlukların başında gelmektedir. Buna rağmen günümüzde daha çok tavuk ve hindiler başta olmak üzere, kanatlı hayvanlar AI tip A virüs infeksiyonlarına karşı hem LPAI hem de HPAI patotipinde H5 ve H7 infeksiyonlarına karşı aşılama yapılmaktadır. ABD'de 1970'li yıllardan itibaren H5 ve H7 alt tipleri hariç, LPAI virüs infeksiyonlarına karşı inaktif aşı uygulaması yapılmaktadır (Tollis ve Di Tirani 2002). İnaktif aşılar daha çok etkenlerin embriyolu yumurtalarda üretilip, formol veya propiolakton ile inaktive edildikten sonra uygun bir adjuvantla kombine edilmesiyle hazırlanmaktadır (Brugh ve ark 1979; Tollis ve Di Tirani 2002). Ichinohe ve ark (2006) AI tip A virüs infeksiyonlarına karşı H1N1 ve H3N1 alt tiplerini yeni bir adjuvant (surf clam microplates) ile kombine ederek farelerde deneysel bir çalışma yapmışlardır. Araştırmacılar sonuç olarak, aşının farelere intranasal olarak uygulanması sonrası koruyucu düzeyde immün yanıt oluşturduğunu bildirmişlerdir.

Özellikle hindilere uygulanan inaktif H9N2 ve H6N2 aşılardan başarılı sonuçlar alındığı bildirilmiştir. Günümüzde inaktif tüm hücre H6N2 ve H9N2 aşılı İtalya'da lisans almış aşılardan oluşmaktadır. Yine İtalya'da HPAI patotipindeki H7N3 alt tipinden hazırlanan inaktif başka bir aşı LPAI patotipindeki H7N1 alt tipine karşı başarıyla kullanılmaktadır. Bu ülkede uygulanan diğer bir aşılama programında ise ilk kez marker aşı kullanılarak, doğal infekte ve aşılu hayvanların ayırımının yapılabilmesi amaçlanmıştır (Tollis ve Di Tirani 2002). Meksika'da 1998 yılından itibaren H5 hemagglütini içeren rekombinant çiçek aşısı LPAI H5N2'ye karşı uygulanmaktadır (Capua ve ark 2000). HPAI H5N2 alt tipinden hazırlanan inaktif tüm hücre aşısı yine Meksika'da (Garcia ve ark 1998), aynı özellikteki H7N3 aşısı ise Pakistan'da (Tollis ve Di Tirani 2002) yoğun olarak kullanılmaktadır.

Çin'de H5N1 suşundan hazırlanan ve tavuklara tek doz olarak uygulanan inaktif bir aşının 10 aydan fazla koruma sağladığı, aynı aşının ördek ve kazlar için de immunojenik olduğu ifade edilmiştir. Diğer yandan, rekombinant başka bir aşının ise tavukları, H5N1 ile yapılan epruvasyona karşı 40 haftadan fazla koruduğu rapor edilmiştir (Qiao ve ark 2006).

AI tip A virüs infeksiyonlarından korunmada deneysel olarak uygulanan ilk nükleik asit aşılardan biri, Fyan ve ark. (1993) tarafından geliştirilen ve H7 geninin klonlanmasıyla elde edilen aşıdır. Aşının H7 alt tipi ile yapılan epruvasyon denemelerinde başarılı sonuçlar verdiği bildirilmiştir. H5 ve H7 ile yapılan başka bir DNA aşısı geliştirme çalışmasında, aşının HPAI patotipindeki H5 ve H7 suşlarına karşı güçlü bir koruma sağladığı ifade edilmiştir (Kodihalli ve ark 2000). Farelerde yapılan başka bir aşı geliştirme çalışmasında ise virüsün kimyasal yapısı taklit edilerek hazırlanan rekombinant aşının H, N ve M2 proteinlerini nötralize eden antikor sentezini uyatarak, farelerde yeterli düzeyde koruma sağladığı bildirilmiştir (Szécsi ve ark 2006).

Sonuç olarak; günümüzün en önemli halk sağlığı problemlerinden biri olarak kabul edilen AI tip A virüs infeksiyonlarıyla mücadelede birçok faktör birlikte dikkate alınmalıdır. Yüksek mutasyon yeteneğine sahip olmaları nedeniyle antijenik yapılarının sürekli değişime eğiliminde olan influenza A virüslerinden korunmada, aşı uygulamalarından çok, bulaşmada en önemli rolü üstlenen göçmen kuşlarla direkt ve indirekt temasın kesilmesi oldukça önem arz etmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu projeye desteklerinden dolayı sayın Alper İŞERİ'ye (Roche Diagnostik) teşekkür ederiz

KAYNAKLAR

- Akpınar E, Saatci E (2006).** Avian Influenza in Turkey-Will It Influence Health in All Europe?. *Croat Med J*, 47, 7-15.
- Alexander DJ (2000).** A Review of Avian Influenza in Different Bird Species. Proceedings of The ESVV Symposium on Animal Influenza Viruses, Gent 1999. *Vet Microbiol*, 74, 3-13.
- Alexander DJ (2007).** An Overview of the Epidemiology of Avian Influenza. *Vaccine*, 25, 5637-5644.
- Alexander DJ (2008).** Avian Influenza Diagnosis. *Zoonoses Public Health*, 55, 6-23.
- Arda M, Minbay A, Aydın N, Akay Ö, İzgür M, Yardım H, Esenalp ÖM, Erdeğer J, Akan M (2002).** Kanatlı Hayvan Hastalıkları. I. baskı, Medisan Yayınları, Ankara.
- Booth S, Baleriola C, Rawlinson WD (2006).** Comparison of Two Rapid Influenza A/B Test Kits With Reference Methods Showing High Specificity and Sensitivity for Influenza A Infection. *J Med Virol*, 78, 619-622.
- Brugh M, Beard CW, Stone HD (1979).** Immunization of Chickens and Turkeys against Avian Influenza with Monovalent and Polyvalent Oil Emulsion Vaccines. *Am J Vet Res*, 40, 165-169.
- Capua I, Alexander DJ (2004).** Avian Influenza: Recent Developments. *Avian Pathol*, 33, 393-404.
- Capua I, Alexander DJ (2007).** Avian Influenza Infectious in Birds-a Moving Target. *Influenza Other Respir Viruses*, 1 (1), 11-18.
- Capua I, Alexander DJ (2008).** Ecology, Epidemiology and Human Health Implications of Avian Influenza Viruses: Why Do We Need to Share Genetic Data? *Zoonoses Public Health*, 55, 2-15.
- Capua I, Marangon S, Dalla Pozza M, Santucci U (2000).** Vaccination for Avian Influenza in Italy. *Vet Rec*, 147 (26), 751.
- Chen H, Deng G, Li Z, Shi J, Shinya K, Deng G, Qi Q, Tian G, Fan S, Zhao H, Sun Y, Kawakami Y (2004).** The Evolution of H5N1 Influenza Viruses in Ducks in Southern China. *PNAS*. 101 (28), 10452-10457.
- Chen H, Smith GJD, Zhang SY, Qin K, Wang J, Li KS, Webster RG, Peiris JSM, Guan Y (2005).** H5N1 Virus Outbreak in Migratory Waterfowl. *Nature*, 436, 191-192.
- Cherian T, Bobo L, Steinhoff MC, Karron RA, Yolken RH. (1994).** Use of PCR-Enzyme Immunoassay for Identification of Influenza A Virus Matrix RNA in Clinical Samples Negative for Cultivable Virus. *J Clin Microbiol*, 32, 623-628.
- De Benedictis P, Beato MS, Capua I. (2007).** Inactivation of Avian Influenza Viruses by Chemical Agents and Physical Conditions: A Review. *Zoonoses Public Health*, 54, 51-68.
- De La Barrera CA, Reyes-Teran G (2005).** Influenza: Forecast for a Pandemic. *Arch Med Res*, 36, 628-636.
- Delogu M, De Marco MA, Donatelli I, Campitelli L, Catelli E (2003).** Ecological Aspects of Influenza A Virus Circulation in Wild Birds of the Western Palearctic. *Vet Res Commun*, 1, 101-106.
- Dugan VG, Chen R, Spiro DJ, Sengamalay N, Zaborsky J, Ghedin E, Nolting J, Swayne DE, Runstadler JA, Happ GM, Sene DA, Wang R, Slemons RD, Holmes EC, Taubenberger JK (2008).** The Evolutionary Genetics and Emergence of Avian Influenza Viruses in Wild Birds. *PLoS Pathog*, 4 (5), 1-9.
- Ellis TM, Bousfield RB, Bissett LA, Dyrting KC, Luk GSM, Tsim ST, Sturm-Ramirez K, Webster RG, Guan Y, Peiris JSM (2004).** Investigation of Outbreaks of Highly Pathogenic H5N1 Avian Influenza in Waterfowl and Wild Birds in Hong Kong in Late 2002. *Avian Pathol*, 33 (5), 492-505.
- Fasina FO, Meseko AC, Joannis TM, Shitto, AI, Ularo HG, Egbuji NA, Sulaiman LK, Onyekonwu NO (2007).** Control Versus No Control: Options for Avian Influenza H5N1 in Nigeria. *Zoonoses Public Health*, 54, 173-176.
- Feare CJ, Yasue M (2006).** Asymptomatic Infection with Highly Pathogenic Avian Influenza H5N1 in Wild Birds: How Sound is the Evidence?. *Viral J*, 3 (96), 1-4.
- Fyan EF, Robinson HL, Webster RG (1993).** Use of DNA Encoding Influenza Haemagglutination as an Avian Influenza Vaccine. *DNA Cell Biol*, 12, 785-789.
- Gaidet N, Dodman T, Caron A, Balanca G, Desvaux S, Goutard F, Cattoli G, Lamarque F, Hagemeijer W, Monicat F (2007).** Avian Influenza Viruses in Water Birds, Africa. *Emerg Infect Dis*, 13 (4), 626-629.
- Garcia A, Johnson H, Srivastava DK, Jayawardene DA, Wehr DR, Webster RG (1998).** Efficacy of Inactivated H5N2 Influenza Vaccines Against Lethal A/Chicken/Queretaro/19/95 Infection. *Avian Dis*, 42, 248-256.
- Garcia M, Crawford JM, Latimer JW, Rivera-Cruz E, Perdeu ML (1996).** Heterogeneity in the Haemagglutinin Gene and Emergence of the Highly Pathogenic Phenotype Among Recent H5N2 Avian Influenza Viruses from Mexico. *J Gen Virol*, 77, 1493-1504.

- Gronesova P, Ficova M, Mizakova A, Kabat P, Trnka A, Betakova T (2008). Prevalence of Avian Influenza Viruses, *Borrelia garinii*, *Mycobacterium avium*, and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Waterfowl and Terrestrial Birds in Slovakia, 2006. *Avian Pathol*, 37, 537-543.
- Hampson AW (2006). Avian Influenza: A Pandemic Waiting in the Wings. *Emerg Med Australas*, 18, 420-429.
- He F, Du Q, Ho Y, Kwang J (2009). Immunohistochemical Detection of Influenza Virus Infection in Formalin-Fixed Tissues with Anti-H5 Monoclonal Antibody Recognizing FFWTILKP. *J Virol Methods*, 155 (1), 25-33.
- Ichinohe T, Watanabe I, Tao E, Ito S, Kawaguchi A, Tamura S, Takahashi H, Sawa H, Moriyama M, Chiba J, Komase K, Suzuki Y, Kurata T, Sata T, Hasegawa H (2006). Protection Against Influenza Virus Infection by Intranasal Vaccine with Surf Clam Microparticles (SMP) as an Adjuvant. *J Med Virol*, 78 (7), 954-963.
- Ivanov Y, Bayraktar R, Ende MV (2008). Kuş Gripi Survey El Kitabı (Türkiye'de Kuş Gribine Karşı Hazırlık ve Müdahale İçin Teknik Projesi TR 06.A1/SV), Dumat Ofset. Ankara.
- Juckett G (2006). Avian Influenza: Preparing for a Pandemic. *Am Fam Physician*, 74 (5), 783-790.
- Kida H, Ito T, Yasuda J, Shimizu Y, Itakura C, Shortridge KF, Kawaoka Y, Webster RG (1994). Potential for Transmission of Avian Influenza Viruses to Pigs. *J Gen Virol*, 75, 2183-2188.
- Kida H (2008). Ecology of Influenza Viruses in Nature, Birds, and Mammals Including Humans. VIII. *Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı)*, 07-09 Ekim, Van-Türkiye.
- Knossow M, Skehel JJ (2006). Variation and Infectivity Neutralization in Influenza. *Immunology*, 119, 1-7.
- Kodihalli S, Kobasa DL, Webster RG (2000). Strategies for Inducing Protection Against Avian Influenza A Virus Subtypes with DNA Vaccines. *Vaccine*, 18, 2592-2599.
- Matrosovich M, Zhou N, Kawaoka Y, Webster R (1999). The Surface Glycoproteins of H5 Influenza Viruses Isolated from Humans, Chickens, and Wild Aquatic Birds Have Distinguishable Properties. *J Virol*, 73 (2), 1146-1155.
- Mo IP, Brugh M, Fletcher OJ, Rowland GN, Swayne DE (1997). Comparative Pathology of Chickens Experimentally Inoculated with Avian Influenza Viruses of Low and High Pathogenicity. *Avian Dis*, 41, 125-136.
- Morgan O, Kuhne M, Nair P, Verlander NO, Preece R, McDougal M, Zambon M, Reacher M (2009). Personal Protective Equipment and Risk for Avian Influenza (H7N3). *Emerg Infect Dis*, 15 (1), 59-62.
- Munster VJ, Wallensten A, Baas C, Rimmelzwaan GF, Schutten M, Olsen B, Osterhaus ADME, Fouchier RAM (2005). Mallards and Highly Pathogenic Avian Influenza Ancestral Viruses, Northern Europe. *Emerg Infect Dis*, 11 (10), 1545-1551.
- Muzaffar SB, Ydenberg RC, Jones IL (2006). Avian Influenza: An Ecological and Evolutionary Perspective for Waterbird Scientists. *Waterbirds*, 29 (3), 243-257.
- Nagarajan S, Rajukumar K, Tosh C, Ramaswamy V, Purohit K, Saxena G, Behera P, Pattnaik B, Pradhan HK, Dubay SC (2009). Isolation and Pathotyping of H9N2 Avian Influenza Viruses in Indian Poultry. *Vet Microbiol*, 133, 154-163.
- Olsen B, Munster VJ, Wallensten A, Waldenström J, Osterhaus ADME, Fouchier RAM (2006). Global Patterns of Influenza A Virus in Wild Birds. *Science*, 312, 384-388.
- Palese P, Young JF (1982). Variation of Influenza A, B and C Viruses. *Science*, 215, 1468-1474.
- Perelman B (2009). Using Inactivated Vaccines to Control Low Pathogenic AI. *World Poultry*, 2 (25), 30-31.
- Playford EG, Dwyer DE (2002). Laboratory Diagnosis of Influenza Virus Infection. *Pathology*, 34, 115-125.
- Qiao C, Tian G, Jiang Y, Li Y, Shi J, Yu K, Chen H (2006). Vaccines Developed for H5 Highly Pathogenic Avian Influenza in China. *Ann N Y Acad Sci*, 1081, 182-192.
- Rameix-Welti MA, Tomoiu A, Dos Santos Alfonso E, van der Werf S, Naffakh N (2009). Avian Influenza A Virus Polymerase Association with Nucleoprotein, but Not Polymerase Assembly, Is Impaired in Human Cells during the Course of Infection. *J Virol*, 83, 1320-1331.
- Rott R (1992). The Pathogenic Determinant of Influenza Virus. *Vet Microbiol*, 33, 303-310.
- Runstadler JA, Happ GM, Slemmons RD, Sheng ZM, Gundlach N, Petruela M, Senne D, Nolting J, Evers DL, Modrell A, Huson H, Hills S, Rothe T, Marr T, Taubenberger JK (2007). Using RRT-PCR Analysis and Virus Isolation to Determine the Prevalence of Avian Influenza Virus Infections in Ducks at Minto Flats State Game Refuge, Alaska, During August 2005. *Arch Virol*, 152, 1901-1910.
- Şanlıdağ T, Akçalı S, Akduman E (2006). Avian Influenza. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 36 (4), 229-240.
- Soe SH, Webster RG (2001). Cross-reactivity, Cell Mediated Immunity and Protection of Chickens from Lethal H5N1 Influenza Virus Infection in Hong Kong Poultry Markets. *J Virol*, 75, 2516-2525.
- Song D, Lee C, Kang B, Jung K, Oh T, Kim H, Park B, Oh J (2009). Experimental Infection of Dogs with Avian Origin Canine Influenza Virus (H3N2). *Emerg Infect Dis*, 15, 56-58.
- Spackman E, Senne DA, Myers TJ, Bulaga LL, Garber LP, Perdue LM, Lohman K, Daum LT, Suarez DL (2002). Development of a Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay for Type A Influenza Virus and the Avian H5 H7 Hemagglutinin Subtypes. *J Clin Microbiol*, 40, 3256-3260.
- Stallknecht DE, Kearney MT, Shane SM, Zwank PJ (1990). Effects of pH, Temperature and Salinity on Persistence of Avian Influenza Viruses in Water. *Avian Dis*, 34, 412-418.
- Starick E, Römer-Oberdörfer A, Werner O (2000). Type and Subtype Specific RT-PCR Assays for Avian Influenza A Viruses (AIV). *J Vet Med B*, 47, 295-301.
- Stone HD (1987). Efficacy of Avian Influenza Oil-Emulsion Vaccines in Chickens of Various Ages. *Avian Dis*, 31, 483-490.
- Swayne DE (2007). Understanding the Complex Pathobiology of High Pathogenicity Avian Influenza Viruses in Birds. *Avian Dis*, 51, 242-249.
- Szécsi J, Boson B, Johnson P, Dupeyrot L, Matrosovich M, Klenk HD, Klatzmann D, Volchkov V, Cosset FL (2006). Induction of Neutralizing Antibodies by Virus-like Particles Harboring Surface Proteins from Highly Pathogenic H5N1 and H7N1 Influenza Virus. *Virol J*, 3(70), 1-7.
- Thomas ME, Bouma A, Eker HM, Fonken AJM, Stegeman JA, Nielen M (2005). Risk Factors for the Introduction of High Pathogenicity Avian Influenza Virus into Poultry Farms During the Epidemic in the Netherlands in 2003. *Prev Vet Med*, 69, 1-11.
- Tollis M, Di Trani LD (2002). Recent Development in Avian Influenza Research: Epidemiology and Immunoprophylaxis. *The Vet J*, 164, 202-115.
- Tumphey TM, Alvarez R, Swayne DE, Suarez DL (2005). Diagnostic Approach for Differentiating Infected from Vaccinated Poultry on the Basis of Antibodies to NS1, the Nonstructural Protein of Influenza A Virus. *J Clin Microbiol*, 43 (2), 676-683.
- Van Den Berg T, Houdart P (2008). Avian Influenza Outbreak Management: Action at Time of Confirmation, Depopulation and Disposal Methods; the "Belgian Experience" During the H7N7 Highly Pathogenic Avian Influenza Epidemic in 2003. *Zoonoses Public Health*, 55, 54-64.
- Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y (1992). Evolution and Ecology of Influenza A Viruses. *Microbiol Rev*, 56, 152-179.
- Webster RG, Peiris M, Chen H, Guan Y (2006). H5N1 Outbreaks and Zoonotic Influenza. *Emerg Infect Dis*, 12 (1), 3-8.
- Widjaja L, Krauss S, Webby RJ, Xie T, Webster RG (2004). Matrix Gene of Influenza A Viruses Isolated from Wild Aquatic Birds: Ecology and Emergency of Influenza A Viruses. *J Virol*, 78, 8771-8779.
- Wiley DC, Skehel JJ (1987). The Structure and Function of the Haemagglutinin Membrane Glycoprotein of Influenza Virus. *Annu Rev Biochem*, 56, 365-394.
- Wood GW, Banks J, Strong I, Parsons G, Alexander DJ (1996). An Avian Influenza Virus of H10 Subtype that is Highly Pathogenic for Chickens but Lacks Multiple Basic Amino Acids at the Haemagglutinin Cleavage Site. *Avian Pathol*, 25, 799-806.
- Wright KE, Wilson GAR, Novosad D, Dimock C, Tan D, Weber JM (1995). Typing and Subtyping of Influenza Viruses in Clinical Samples by PCR. *J Clin Microbiol*, 33, 1180-1184.
- Wu G, Yan S (2006). Mutation Trend of Haemagglutinin of Influenza A Virus: A Review from a Computational Mutation Viewpoint. *Acta Pharmacol Sin*, 27 (5), 513-526.
- Yuen KY, Chan PKS, Peiris M, Tsang DNC, Que TL, Shortridge KF, Cheung PT, To WK, Ho ETE, Sung R, Cheng AFB (1998). Clinical Features and Rapid Viral Diagnosis of Human Disease Associated with Avian Influenza A H5N1 Virus. *Lancet*, 351, 447-471.